



Геномные изменения вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*), связанные с адаптацией к размножению в перевиваемой культуре клеток

© Мазлум А.¹, Иголкин А.С.¹, Зиняков Н.Г.¹, ван Шалквик А.², Власова Н.Н.¹

¹ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ), 600901, Владимирская обл., Владимир, мкр. Юрьевец, Россия;

²Ветеринарный институт Ондерстепорта, 100 Олд Саутпен Роад, Ондерстепорт 0110, Южно-Африканская Республика

Введение. Возбудитель африканской чумы свиней (*Suidae*) (АЧС) – крупный (175–215 нм) двухцепочечный ДНК-вирус, относящийся к семейству *Asfarviridae*. К настоящему времени секвенирован и подробно проанализирован только геном штамма BA71V, адаптированного к клеточной культуре Vero.

Целью данной работы явился сравнительный анализ полногеномного сиквенса исходного изолята вируса АЧС Odintsovo 02/14 и 2 штаммов, полученных на уровне 30 и 50 пассажей и адаптированных к росту в клеточной культуре CV-1.

Материал и методы. В работе использованы различные варианты вируса АЧС: исходный изолят Odintsovo 02/14 и 2 штамма адаптированного вируса: ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50. Библиотеку последовательностей конструировали с использованием набора «Nextera XT DNA library preparation kit» («Illumina», США).

Результаты. Длина геномов штаммов ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50 составила 186 529 и 186 525 п.н. соответственно. Всего между исходным и адаптированными вариантами обнаружены 78 однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNP); кроме того, установлено наличие крупноразмерной делеции величиной 2947 п.н. в правом (3'-концевом) вариабельном регионе у обоих адаптированных штаммов.

Обсуждение. Возбудитель АЧС как ДНК-содержащий вирус может не иметь высокого мутационного статуса. Однако в данном исследовании повторно установлено, что адаптация этого инфекционного агента к росту в перевиваемой культуре клеток (КК) приводит к появлению крупноразмерной делеции в 3'-вариабельной области генома.

Заключение. В связи с недостаточной изученностью данной проблемы необходимо проведение дополнительных исследований, что позволит подтвердить имеющиеся данные относительно влияния каждой из описанных мутаций на характер размножения вируса и степень его вирулентности.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней; полногеномное секвенирование; адаптированные вирусы; перевиваемая культура клеток

Для цитирования: Мазлум А., Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., ван Шалквик А., Власова Н.Н. Геномные изменения вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*), связанные с адаптацией к размножению в перевиваемой культуре клеток. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(3): 211-216. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-50>

Для корреспонденции: Мазлум Али, канд. биол. наук, ведущий ветеринар, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ), 600901, Владимирская обл., Владимир, мкр. Юрьевец, Россия. E-mail: ali.mazloum6@gmail.com

Участие авторов: Мазлум А. – концепция и дизайн исследования, проведение лабораторных исследований, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Иголкин А.С. – написание текста, редактирование статьи; Зиняков Н.Г. – проведение лабораторных исследований; ван Шалквик А. – сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Власова Н.Н. – концепция и дизайн исследования, проведение лабораторных исследований, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста, редактирование статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.02.2021
Принята к печати 11.05.2021

Changes in the genome of African swine fever virus (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*) associated with adaptation to reproduction in continuous cell culture

Ali Mazloum¹, Alexey S. Igolkin¹, Nikolay G. Zinyakov¹, A. van Schalkwyk², Natalia N. Vlasova²

¹FSBI «Federal Centre for Animal Health» («ARRIAH»), 600901, Vladimir region, Vladimir, Yuryevets microdistrict, Russia;

²Onderstepoort Veterinary Institute, 100 Old Soutpan road, Onderstepoort 0110, South Africa

Introduction. African swine fever virus (ASFV) is a large, double-stranded DNA virus in the *Asfarviridae* family. It is the causative agent of African swine fever (ASF). Only the genome of BA71V strain, adapted to Vero cell culture, was fully analyzed.

The **aim** of this study was analyzing the complete genome sequence of two strains of adapted to the growth in CV-1 cell culture (CC) ASFV obtained after 30 and 50 passages, in comparison to the parental virus.

Material and methods. ASFV isolate Odintsovo 02/14 (parental), ASFV adapted variants ASFV/ARRIAH/CV-1/30 and ASFV/ARRIAH/CV-1/50 were all used to extract genomic DNA (gDNA). Sequencing library was constructed using the «Nextera XT DNA library preparation kit» («Illumina», USA).

Results. Genomes of ASFV/ARRIAH/CV-1/30 and ASFV/ARRIAH/CV-1/50 consisted of 186 529 bp and 186 525 bp, respectively. Total 78 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified between the parental Odintsovo 02/14 and the two high passaged strains, as well as a 2947 bp large-size deletion in the 3' variable region of adapted viruses was detected.

Discussion. ASFV as a DNA-containing virus may not have a very high level of mutation, but this is the second study showing that adaptation to growth in continuous CC leads to large deletions in the genome of the virus.

Conclusion. Mutations in the protein-coding regions of the genome can be synonymous and non-synonymous, i.e. leading to amino acid substitution. Additional research is needed to understand the influence of the mutations described in the adaptation process on the reproduction of the virus and its virulence.

Keywords: African swine fever virus; complete genome sequencing; adapted viruses; continuous cell culture

For citation: Mazloum Ali, Igolkin A.S., Zinyakov N.G., van Schalkwyk A., Vlasova N.N. Changes in the genome of African swine fever virus (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*) associated with adaptation to reproduction in continuous cell culture. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(3): 211-216.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-50>

For correspondence: Mazloum Ali, Ph.D. (Biol.), Leading Veterinarian, FSBI «Federal Center for Animal Health» («ARRIAH»), 600901, Vladimir region, Vladimir, Yuryevets microdistrict, Russia. E-mail: ali.mazloum6@gmail.com

Information about the authors:

Mazloum Ali, <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>

Igolkin A.S., <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Zinyakov N.G., <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

van Schalkwyk A., <https://orcid.org/0000-0003-4761-8767>

Vlasova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>

Contribution: Mazloum A. – research concept and design, performing of the laboratory research, collection and processing of the material, statistical processing, writing of the text; Zinyakov N.G. – performing of the laboratory research; Igolkin A.S. – writing of the text, editing of the article; van Schalkwyk A. – collection and processing of the material, statistical processing, writing of the text; Vlasova N.N. – performing of the laboratory research, collection and processing of the material, statistical processing, writing of the text, editing of the article.

Acknowledgement. The study has no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 16 February 2021

Accepted: 11 May 2021

Введение

Возбудителем африканской чумы свиней (*Suidae*) (АЧС) является крупный (175–215 нм) содержащий двухцепочечную ДНК вирус, относящийся к семейству *Asfarviridae*. Вызываемая им инфекция представляет собой высококонтагиозное заболевание с выраженным геморрагическим синдромом и высоким уровнем смертности у домашних свиней (*Sus scrofa domestica*) и диких кабанов (*Sus scrofa*).

Для изучения основ патогенности и иммуногенности вируса АЧС необходимо проведение сравнительного анализа биологических свойств возбудителя и структуры его генов. Патоген обладает способно-

стью к размножению в первичных культурах клеток (КК) свиней: лейкоцитов, альвеолярных макрофагов и т.д. Однако эти культуры трудно стандартизировать, поскольку их характеристики варьируют в зависимости от особенностей используемого животного. Это значительно затрудняет получение генетически однородного образца вируса, пригодного для анализа. Для решения этой проблемы различные изоляты вируса АЧС были адаптированы к росту в перевиваемой КК, в частности Georgia 2007/1 и BA71 – в культуре Vero. В результате такого адаптационного процесса получены штаммы ASFV-G/V и BA71V [1, 2], постепенно утратившие вирулентные свойства. Необходи-

мо отметить, что полногеномное секвенирование было проведено только для вируса BA71V [2].

Поскольку в ходе адаптации к росту в перевиваемых КК вирулентность возбудителя снизилась [3], целью данной работы являлся сравнительный анализ полногеномного сиквенса 2 штаммов вируса АЧС, полученных на уровне 30 и 50 пассажей в культуре клеток CV-1, с генетическим материалом исходного изолята.

Материал и методы

Первичную и перевиваемую культуры клеток CV-1 выращивали в питательной среде Игла с добавлением 20% бычьей фетальной сыворотки (FBS) в соответствии с методическими рекомендациями [4].

С целью выделения геномной ДНК (гДНК) использовали различные варианты вируса АЧС: исходный изолят Odintsovo 02/14 и 2 штамма адаптированного вируса ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50. Генетический материал выделяли фенол-хлороформным методом, а осадок гДНК элюировали в воде, не содержащей нуклеаз [5]. Библиотеку последовательностей секвенирования конструировали с использованием набора «Nextera XT DNA library preparation kit» («Illumina»). Секвенирование нового поколения (next-generation sequencing, NGS) проводили с применением набора реагентов «MiSeq reagent kit v2» на настольном секвенаторе MiSeq («Illumina», США). Анализ результатов осуществляли в программном обеспечении CLC Genomics Workbench v9.5.2 («Qiagen», Aarhus, Дания; www.clcbio.com); открытые рамки считывания (ОРС) были предсказаны и вычислены при помощи программы GATU.

Полученные последовательности генома анализировали и сравнивали со структурой гДНК штамма FR682468.1 ASFV/Georgia 2007/1. Полные последовательности были депонированы в GenBank с номерами доступа MW528217 и MW528218.

Для построения выравнивания и обнаружения точечных мутаций в виде однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNPs) использовали программу CLC Genomics Workbench v9.5.2.

Результаты

В ФГБУ ВНИИЗЖ были детально изучены биологические и генетические характеристики изолята вируса АЧС ASFV Odintsovo 02/14 [6], поэтому данную его разновидность использовали для адаптации к росту в перевиваемой культуре фибробластоподобных псевдодиплоидных клеток африканской зелёной мартишки (*Cercopithecus aethiops*) (CV-1).

В ходе проведённых экспериментов получены штаммы вируса АЧС, которые обладали способностью к репродукции в непермиссивной КК CV-1. Определены биологические свойства и полноразмерная последовательность геномов этих штаммов, полученных на уровне 30 и 50 пассажей и адаптированных к клеточной культуре (ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50 соответственно). Иссле-

дования выявили существенное снижение вирулентности изолята ASFV/ARRIAH/CV-1/30 (~ <20 %), однако его геном в постадаптационный период не был удовлетворительно охарактеризован [3].

В процессе опытов удалось установить характер влияния адаптации возбудителя АЧС к росту в перевиваемой КК на структуру его генома, а также выявить мутации, возникшие в результате адаптационного процесса. Установлено, что длина ДНК у штаммов ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50 составила 186 529 и 186 525 п.н. соответственно. Между исходным и адаптированными вариантами обнаружены различия, проявившиеся в наличии у последних 78 однонуклеотидных полиморфизмов, а также значительной делеции (2947 п.н.) в 3'-концевом варибельном регионе между 181 980–184 929 п.н. Аналогичная делеция ранее описана в геноме штамма BA71V – другого адаптированного к росту в культуре Vero варианта вируса [2].

Наблюдаемые различия в размере последовательности полных геномов анализируемых штаммов ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50, составили лишь 4 п.н., тогда как у Georgia 2007/1 (189 344 п.н.) и Odintsovo 02/14 (189 122 п.н.) они составляли 222 п.н. Разность длины геномов исходного изолята и его адаптированных вариантов превышала 2590 п.н. (2,9 kb), что указывает на наличие крупноразмерной делеции в генетических последовательностях обоих штаммов вируса.

Из 78 SNPs между родительским штаммом Odintsovo 02/14 и двумя адаптированными штаммами 13 располагаются внутри межгенных областей, а 5 удалить также связаны с повторяющимися нуклеотидами гомополимера. Находящиеся внутри ОРС 8 SNP охарактеризованы как синонимичные, а 52 – как несинонимичные. Данные обо всех 60 синонимичных и несинонимичных SNP приведены в **табл. 1**.

Как видно из таблицы, большинство ($n = 36$) несинонимичных SNP являются консервативными заменами аминокислотных остатков, тогда как 14 олигонуклеотидных полиморфизмов привели к появлению в определённой последовательности белка незаряженной или иной заряженной аминокислоты.

Из несинонимичных олигонуклеотидных полиморфизмов 2 вызвали образование в гене стоп-кодона, что, в свою очередь, не позволяет осуществить полноценный белковый синтез либо полностью блокирует построение предсказанного белка (**табл. 2**). Результаты анализа влияния нуклеотидных замен с появлением стоп-кодона или с проявлением неконсервативного замена аминокислот в различных белковых последовательностях вируса АЧС приведены в **табл. 2**; в ней также указаны белки, отсутствующие из-за делеции 2,9 kb в составе генома.

Представленные результаты наглядно демонстрируют, что большинство замен аминокислотных остатков происходило в геноме адаптированных вариантов ASFV/ARRIAH/CV-1/50 и/или ASFV/ARRIAH/CV-1/30, за исключением мутаций, которые были уникальными для генома изолята Odintsovo 02/14 (в таблице выделены серым цветом).

Таблица 1. Гены различных штаммов вируса африканской чумы свиней, кодирующие белки с синонимичными и несинонимичными однонуклеотидными полиморфизмами

Table 1. Genes of different strains of the African swine fever virus encoding proteins with synonymous and non-synonymous single nucleotide polymorphisms

Ген, кодирующий белок Protein encoding gene	Штамм вируса Virus strain				Предсказанные аминокислотные замены в белке* Predicted amino acid substitutions in the protein*
	Georgia 2007/1	Odintsovo 02/14	ASFV/ARRIAH/CV-1/30	ASFV/ARRIAH/CV-1/50	
<i>ASFV_G_ACD_00270</i>	R	R	R	K	R16K
<i>ASFV_G_ACD_00270</i>	R	R	R	K	R20K
<i>MGF-360-11L</i>	F	F	F	F	F120F
<i>MGF-360-14L</i>	L	L	L	F	L118F
<i>A104R</i>	T	T	T	I	T22I
<i>MGF-360-15R</i>	R	R	R	K	R60K
<i>A859L</i>	S	S	S	F	S244F
<i>A859L</i>	Y	Y	Y	F	Y614F
<i>A859L</i>	F	F	F	F	F684F
<i>F317L</i>	S	S	S	F	S206F
<i>F77R</i>	Q	Q	Q	Q	Q65Q
<i>F1055L</i>	I	I	I	F	I596F
<i>ASFV_G_ACD_00760</i>	L	L	L	I	L24I
<i>K205R</i>	S	S	S	S	S192S
<i>EP1242L</i>	Y	Y	Y	F	Y817F
<i>EP1242L</i>	S	S	S	F	S998F
<i>EP1242L</i>	L	L	L	F	L1145F
<i>EP84R</i>	L	L	L	F	L37F
<i>EP153R</i>	L	L	L	F	L10F
<i>EP364R</i>	C	C	C	G	C158G
<i>M1249L</i>	P	P	L	P	P1055L
<i>M1249L</i>	P	P	S	P	P1093S
<i>M1249L</i>	P	P	L	P	P1248L
<i>C257L</i>	L	L	L	F	L176F
<i>C962R</i>	T	T	T	N	T643N
<i>C962R</i>	L	L	L	L	L645L
<i>B962L</i>	L	L	L	F	L228F
<i>B318L</i>	I	I	I	F	I170F
<i>B318L</i>	L	L	L	F	L294F
<i>B354L</i>	I	I	I	I	I101I
<i>B125R</i>	D	D	D	E	D27E
<i>G1340L</i>	D	D	D	E	D979E
<i>0174L</i>	S	S	S	F	S75F
<i>0174L</i>	S	S	S	F	S121F
<i>NP1450L</i>	L	L	L	F	L446F
<i>NP419L</i>	N	N	N	S	N414S
<i>H359L</i>	A	A	A	T	A225T
<i>H359L</i>	I	I	I	F	I247F
<i>E301R</i>	D	D	D	E	D162E
<i>E199L</i>	F	S	F	F	F133S
<i>I267L</i>	S	S	S	F	S65F
<i>ASFV_G_ACD_01990</i>	F	F	F	F	F48F
<i>DP60R</i>	F	F	F	F	F27F
<i>DP60R</i>	V	V	V	F	V28F

Примечание. Аминокислота, предсказанная для каждого штамма, а также её положение указаны в столбце «Предсказанные аминокислотные замены в белке»; там же указаны позиции, затронутые в штаммах ASFV/ARRIAH/CV-1/30 либо Odintsovo 02/14. Синонимичные полиморфизмы выделены светло-серым цветом; изменения нуклеотидов, приведшие к аминокислотным заменам, отмечено тёмно-серым цветом; * – первая буква представляет аминокислоту у исходного гена (цифры указывают на позицию в аминокислотной последовательности белка), вторая буква представляет аминокислоту после мутации.

Note. The amino acid predicted for each strain and its position are listed in the column «Predicted amino acid substitutions in the protein»; the positions affected in ASFV/ARRIAH/CV-1/30 or Odintsovo 02/14 strains are also listed there. Synonymous polymorphisms are highlighted in light gray; nucleotide changes that led to amino acid substitutions are marked in dark gray; * – the first letter represents the amino acid of the wild type gene (the numbers indicate the position in the amino acid sequence of the protein), and the second letter represents the amino acid after the mutation.

Таблица 2. Список предсказанных аминокислотных замен с изменениями заряда или образованием стоп-кодона

Table 2. List of predicted amino acid substitutions with either charge changes or generation of stop-codon

Ген, кодирующий белок Protein encoding gene	Штамм вируса Virus strain				Предсказанные аминокислотные замены в белке* Predicted amino acid substitutions in the protein*
	Georgia 2007/1	Odintsovo 02/14	ASFV/ARRIAH/CV-1/30	ASFV/ARRIAH/CV-1/50	
<i>MGF_110_1L</i>	W	W	W	Стоп-кодон Stop-codon	Стоп-кодон в позиции 197 Stop-codon at position 197
<i>MGF_360_8L</i>	E	E	E	K	E70K
<i>MGF-505-7R</i>	D	D	D	N	D204N
<i>MGF_505_6R</i>	E	E	E	K	E378K
<i>MGF_505_6R</i>	E	E	E	K	E475K
<i>F334L</i>	M	M	M	K	M145K
<i>F1055L</i>	D	D	D	N	D576N
<i>F1055L</i>	E	E	E	K	E575K
<i>EP1242L</i>	D	D	D	N	D700N
<i>C717R</i>	D	D	D	N	D313N
<i>B318L</i>	Q	Q	Q	K	Q277K
<i>B354L</i>	E	E	E	Стоп-кодон Stop-codon	Стоп-кодон в позиции 218 Stop-codon at position 218
<i>NP419L</i>	D	D	D	N	D322N
<i>E199L</i>	G	E	G	G	G127E
<i>E24R</i>	D	D	D	N	D86N
<i>DP96R</i>	D	G	D	D	D64G
<i>I7L</i>	+	+	Делеция 2947 п.н. (979 аминокислот) Deletion of 2947 bp (979 amino acids)	Делеция 2947 п.н. (979 аминокислот) Deletion of 2947 bp (979 amino acids)	Отсутствие белка No protein
<i>I8L</i>	+	+			
<i>ASFV_G_ACD_001870</i>	+	+			
<i>I9L</i>	+	+			
<i>I10L</i>	+	+			
<i>I11L</i>	+	+			
<i>MGF_360-18R</i>	+	+			

Примечание. Мутации, уникальные для генома штамма Odintsovo 02/14, обозначены серым цветом; * – первая буква представляет аминокислоту у исходного гена (цифры указывают на позицию в аминокислотной последовательности белка), вторая буква представляет аминокислоту после мутации.

Note. Mutations unique to the genome of the Odintsovo 02/14 isolate are marked in gray; * – the first letter represents the amino acid of the wild type gene (the numbers indicate the position in the amino acid sequence of the protein), and the second letter represents the amino acid after the mutation.

Обсуждение

При определённых условиях возбудитель АЧС как ДНК-содержащий вирус может не иметь высокой изменчивости генома, однако, поскольку на настоящий момент эффективная вакцинопрофилактика при АЧС не разработана, значительное место в изучении данного вируса занимают исследования основ его патогенности и иммуногенности. При этом основным инструментом служит выявление взаимосвязи проявления тех или иных биологических свойств патогена и особенностей структуры его генома.

Поскольку ранее установлено, что адаптация возбудителя АЧС к росту в перевиваемой культуре клеток приводит к значительным изменениям в генетическом материале и снижению вирулентности [3, 7], наиболее информативным подходом в изучении механизмов патогенности вируса АЧС следует признать анализ происходящих при его адаптации изменений в геноме. Указанные предпосылки обуславливают необходимость получения варианта вируса, адаптированного к росту в перевиваемой КК.

В представленной работе наглядно продемонстрировано, что адаптация патогена к росту в перевиваемой культуре CV-1 ведёт к появлению крупноразмерной делеции в 3'-вариабельной области. Сравнительный анализ полногеномных последовательностей исходного штамма и адаптированных вариантов позволил также выявить 78 олигонуклеотидных полиморфизмов, которые влияли на предсказанную аминокислотную последовательность кодируемого белка или не оказывали подобного влияния. Лишь 2 олигонуклеотидные замены (в генах *MGF_110_1L* и *B354L*) имели результатом образование стоп-кодонов, что даёт основание исключить возможность полноценного синтеза кодируемых ими белков при инфицировании объектов вирусом штамма ASFV/ARRIAH/CV-1/50.

Заключение

Таким образом, наряду с обнаружением значительного количества SNP у 2 адаптированных вариантов вируса АЧС наиболее значимой модификацией в геномах ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/

CV-1/50 была крупноразмерная делеция в 2947 п.н. в правой (3'-вариабельной) области обоих штаммов в участке между 181 975–184 920 п.н. Подобная делеция также описана в геноме другого штамма – BA71V, также адаптированного к росту в перевиваемой КК, где были затронуты те же 7 предсказанных белков (см. табл. 2). Однако ввиду недостаточной на сегодняшний день изученности этого вопроса и малого количества исследований для подтверждения характера влияния каждого из описанных изменений на репликацию вируса, его иммуногенность и степень проявления вирулентных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., et al. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to Vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2324–32. <https://doi.org/10.1128/jvi.03250-14>
2. Rodríguez J.M., Moreno L.T., Alejo A., Lacasta A., Rodríguez F., Salas M.L. Genome sequence of african swine fever virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0142889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142889>
3. Мазлум А., Зиняков Н.Г., Першин А.С., Шевченко И.В., Жуков И.Ю., Федосеева Д.Н., и др. Анализ изменений генетической структуры и биологических свойств вируса африканской чумы свиней при адаптации к перевиваемой культуре клеток. *Ветеринария сегодня.* 2018; (4): 21–5. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-4-27-21-25>
4. Мазлум А., Шарипова Д.В., Гаврилова В.Л. Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезенки свиней. Владимир; 2019.
5. Szpara M.L., Tafuri Y.R., Enquist L.W. Preparation of viral DNA from nucleocapsids. *J. Vis. Exp.* 2011; (54): 3151. <https://doi.org/10.3791/3151>
6. Elsukova A.A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A., Puzankova O.S., Zhukov I.Y., Pershina A.S., et al. Biological properties of African swine fever virus Odintsovo 02/14 isolate and its genome

analysis. *Int. J. Env. Agricult. Res.* 2017; 3(10): 26–37. <https://doi.org/10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-OCT-2017-15>

7. Tabares E., Olivares I., Santurde G., Garcia M.J., Martin E., Carnero M.E. African swine fever virus DNA: deletions and additions during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Arch. Virol.* 1987; 97(3): 333–46. <https://doi.org/10.1007/bf01314431>

REFERENCES

1. Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., et al. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to Vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2324–32. <https://doi.org/10.1128/jvi.03250-14>
2. Rodríguez J.M., Moreno L.T., Alejo A., Lacasta A., Rodríguez F., Salas M.L. Genome sequence of african swine fever virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0142889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142889>
3. Mazloun A., Zinyakov N.G., Pershin A.S., Shevchenko I.V., Zhukov I.Yu., Fedoseeva D.N., et al. Analysis of changes in African swine fever virus genetic structure and biological properties during adaptation to continuous cell culture [Анализ изменений генетической структуры и биологических свойств вируса африканской чумы свиней при адаптации к перевиваемой культуре клеток]. *Veterinariya segodnya.* 2018; (4): 21–5. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-4-27-21-25> (in Russian)
4. Mazloun A., Sharipova D.V., GavriloVA V.L. Guidelines for the isolation and titration of African swine fever virus in porcine spleen cell culture [Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезенки свиней]. Владимир; 2019. (in Russian)
5. Szpara M.L., Tafuri Y.R., Enquist L.W. Preparation of viral DNA from nucleocapsids. *J. Vis. Exp.* 2011; (54): 3151. <https://doi.org/10.3791/3151>
6. Elsukova A.A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A., Puzankova O.S., Zhukov I.Y., Pershina A.S., et al. Biological properties of African swine fever virus Odintsovo 02/14 isolate and its genome analysis. *Int. J. Env. Agricult. Res.* 2017; 3(10): 26–37. <https://doi.org/10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-OCT-2017-15>
7. Tabares E., Olivares I., Santurde G., Garcia M.J., Martin E., Carnero M.E. African swine fever virus DNA: deletions and additions during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Arch. Virol.* 1987; 97(3): 333–46. <https://doi.org/10.1007/bf01314431>