

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-104>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



## Анализ полногеномной последовательности изолята вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*), выделенного от дикого кабана (*Sus scrofa*) на границе Российской Федерации и Монголии

Мазлум А., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Власова Н.Н., Аронова Е.В., Пузанкова О.С., Гаврилова В.Л., Шевченко И.В.

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

**Введение.** Возбудитель африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*) (АЧС) – двухцепочечный ДНК-вирус размерами 175–215 нм. На сегодняшний день известно 24 его генотипа. Кластеризация вирусов АЧС II генотипа проводится путём изучения ограниченного числа выбранных областей генома. Несмотря на относительно высокую скорость накопления замен в геноме этого инфекционного агента по сравнению с другими ДНК-содержащими вирусами, число известных геномных молекулярных маркёров для изолятов II генотипа до настоящего времени недостаточно для детальной субкластеризации.

**Целями** данной работы являлись сравнительный анализ изолята вируса АЧС ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 и определение дополнительных молекулярных маркёров, использование которых возможно при кластеризации вируса II генотипа.

**Материал и методы.** В работе использован изолят вируса АЧС ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020. Библиотеку последовательностей конструировали с использованием набора Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina, США) с помощью методики секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS).

**Результаты.** Длина генома исследуемого изолята составила 189 380 п.н., число открытых рамок считывания (ОРС) – 189. При сравнении с референтным геномом Georgia 2007/1 у варианта обнаружены 33 однонуклеотидных полиморфизма (ОНП). Из них 13 локализируются в межгенных областях 10 приводят к изменению аминокислотных последовательностей кодируемых белков и 10 – оказывают влияние на ОРС генов вируса АЧС.

**Обсуждение.** По данным анализа межгенных областей ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 группируется отдельно от нескольких изолятов из Польши и 3 – из Китайской Народной Республики (КНР), поскольку не содержит тандемных повторов (tandem repeat sequences, TRS). В то же время при построении филогенетического дерева на основании секвенирования гена *DP60R* данный изолят оказался объединённым с таковыми из КНР и Польши. При этом филогенетический анализ полногеномных последовательностей подтвердил результаты предшествующих исследований по кластеризации вирусов АЧС II генотипа, а вариант ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 оказался распределённым в группу с изолятами из Китая.

**Заключение.** Идентифицирована новая вариабельная область генома вируса АЧС – ген *DP60R*, кластеризация по которому дала результат, аналогичный таковому при анализе полноразмерных геномов. Можно предполагать, что дальнейшие работы по групповому распределению изолятов вируса АЧС, базирующиеся на изучении последовательности этого гена, позволят выявить значимость данной генной структуры для научных изысканий в отношении эволюции инфекционного агента и путей его распространения.

**Ключевые слова:** африканская чума свиней (АЧС), полногеномное секвенирование, генетический анализ, филогенетический анализ

**Для цитирования:** Мазлум А., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Власова Н.Н., Аронова Е.В., Пузанкова О.С., Гаврилова В.Л., Шевченко И.В. Анализ полногеномной последовательности изолята вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*), выделенного от дикого кабана (*Sus scrofa*) на границе Российской Федерации и Монголии. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(2): 153-164. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-104>

**Для корреспонденции:** Мазлум А., канд. биол. наук, научный сотрудник референтной лаборатории по АЧС, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ), 600901, Владимирская обл., Владимир, мкр. Юрьевец, Россия. E-mail: [ali.mazloum6@gmail.com](mailto:ali.mazloum6@gmail.com)

**Участие авторов:** Мазлум А. – концепция и дизайн исследования, проведение лабораторных исследований, сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста статьи; Иголкин А.С. – написание текста и редактирование статьи; Шотин А.Р. – проведение лабораторных исследований, сбор и обработка материала; Зиняков Н.Г. – проведение лабораторных исследований; Власова Н.Н. – проведение лабораторных исследований; сбор и обработка материала, написание текста и редактирование статьи; Аронова Е.В. – проведение лабораторных исследований; Пузанкова О.С. – проведение лабораторных исследований; сбор и обработка материала; Гаврилова В.Л. – проведение лабораторных исследований; сбор и обработка материала; Шевченко И.В. – проведение лабораторных исследований, написание текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт средств гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на реализацию отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1054).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.02.2022  
Принята в печать 23.03.2022  
Опубликована 30.04.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-104>

## Analysis of the whole-genome sequence of an ASF virus (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*) isolated from a wild boar (*Sus scrofa*) at the border between Russian Federation and Mongolia

Ali Mazloun, Alexey S. Igolkin, Andrey R. Shotin, Nikolay G. Zinyakov, Natalia N. Vlasova, Elena V. Aronova, Olga S. Puzankova, Vera L. GavriloVA, Ivan V. Shevchenko

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

**Introduction.** The causative agent of African swine fever (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*) (ASF) is a double-stranded DNA virus of 175–215 nm. To date, 24 of its genotypes are known. Clustering of ASF genotype II isolates is carried out by examining a limited number of selected genome markers. Despite the relatively high rate of mutations in the genome of this infectious agent compared to other DNA viruses, the number of known genome molecular markers for genotype II isolates is still insufficient for detailed subclustering.

The **aims** of this work were the comparative analysis of ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 virus isolate and determination of additional molecular markers which can be used for clustering of viral genotype II sequences.

**Material and methods.** ASF virus isolate ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 was used to extract genomic DNA (gDNA). Sequencing libraries were constructed using the Nextera XT DNA library prepare kit (Illumina, USA) using the methodology of the next generation sequencing (NGS).

**Results.** The genome length was 189,380 bp, and the number of open reading frames (ORFs) was 189. In comparison with the genome of reference isolate Georgia 2007/1, 33 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified, of which 13 were localized in the intergenic region, 10 resulted to the changes in the amino acid sequences of the encoded proteins, and 10 affected the ORF of ASF virus genes.

**Discussion.** When analyzing intergenic regions, the ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 isolate is grouped separately from a number of isolates from Poland and three isolates from People's Republic of China (PRC), since it does not harbor additional tandem repeat sequence (TRS). At the same time, the construction of a phylogenetic tree based on *DP60R* gene sequencing relates ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 to isolates from PRC and Poland. Moreover, phylogenetic analysis of full-genome sequences confirmed previous studies on the grouping of viruses of genotype II, and as for the studied isolate, it was grouped with the variants from China.

**Conclusion.** A new variable region was identified, the *DP60R* gene, clustering for which gave a result similar to the analysis of full-length genomes. Probably, further study of the distribution of ASF virus isolates by groups based on the analysis of this gene sequences will reveal its significance for studying the evolution of the virus and its spread.

**Key words:** African swine fever virus, full genome sequencing, genetic analysis, phylogenetic analysis

**For citation:** Mazloun Ali, Igolkin A.S., Shotin A.R., Zinyakov N.G., Vlasova N.N., Aronova E.V., Puzankova O.S., GavriloVA V.L., Shevchenko I.V. Analysis of the whole-genome sequence of an ASF virus (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*) isolated from a wild boar (*Sus scrofa*) at the border between the Russian Federation and Mongolia. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(2): 153-164. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-104>

**For correspondence:** Mazloun Ali, Ph.D. (Biol.), Researcher, ASF Reference Laboratory, FGBI «Federal Center for Animal Health» («ARRIAH»), 600901, Vladimir region, Vladimir, Yuryevets microdistrict, Russia. E-mail: ali.mazloun6@gmail.com

**Information about the authors:**Mazloum A., <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>Igolkin A.S., <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>Shotin A.R., <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>Zinyakov N.G., <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>Vlasova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>Aronova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-2072-6701>Puzankova O.S., <https://orcid.org/0000-0003-1584-3169>Gavrilova V.L., <https://orcid.org/0000-0001-5843-2779>Shevchenko I.V., <https://orcid.org/0000-0001-6482-7814>

**Contribution:** Mazloum A. – research study concept and design, laboratory research conducting, material collection and processing, statistical processing, writing of the article text; Igolkin A.S. – writing of the article text and article editing; Shotin A.R. – laboratory research conducting, material collection and processing; Zinyakov N.G. – laboratory research conducting; Vlasova N.N. – laboratory research conducting, material collection and processing, writing of the article text and article editing; Aronova E.V. – laboratory research conducting; Puzankova O.S. – laboratory research conducting, material collection and processing; Gavrilova V.L. – laboratory research conducting, material collection and processing; Shevchenko I.V. – laboratory research conducting, writing of the article text.

**Funding.** The research was carried out at the expense of a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the implementation of certain measures of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies for 2019–2027 (Arrangement No. 075-15-2021-1054).

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

Received 11 February 2022

Accepted 23 March 2022

Published 30 April 2022

## Введение

Африканская чума свиней (АЧС) – это высоколетальная геморрагическая болезнь домашних и диких свиней (*Suidae*). В 2020 г. на территории Российской Федерации официально нотифицирован 271 очаг этой инфекции, в т.ч. 161 среди домашних свиней (*Sus scrofa domestica*) и 110 – в популяции диких кабанов (*Sus scrofa*) [17].

Возбудитель заболевания представляет собой ДНК-содержащий арбовирус, имеющий икосаэдрический капсид и суперкапсидную оболочку. Геном его представлен двухцепочечной линейной ДНК с ковалентно замкнутыми концами и инвертированными концевыми повторами (ИКП; inverted terminal repeats, ITR) [14]. Размер центральной консервативной области генома составляет ~125 т.п.н. и варьирует в пределах 1,5% (в зависимости от изолята) в отличие от 2 граничащих с ней высоковариабельных областей на концах молекулы ДНК [5, 6]. Анализ последовательности С-концевой области высококонсервативного гена *B646L*, кодирующего капсидный белок p72, позволяет разделить все известные изоляты и штаммы вируса АЧС на 24 генотипа [1, 3].

В то же время в центральной консервативной области имеются чётко локализованные зоны высокой вариабельности, например CVR-область гена *B602L*, изменчивость которой обусловлена изменением числа tandemных повторов (повторяющихся последовательностей) (tandem repeat sequences, TRS). В ряде случаев их количество может использоваться для определения родства и дифференциации близкородственных вариантов [9].

Геномный анализ выделенных в неблагополучных по АЧС странах с 2007 по 2020 гг. изолятов, основанный на анализе одного гена *B646L*, не позволяет установить пути заноса и распространения вируса на

различных территориях, поскольку группирует все варианты II генотипа. Для дифференциации таких изолятов необходимо проведение анализа дополнительных маркерных областей генома возбудителя АЧС, в частности определение межгенных областей (intergenic region, IGR) и количества tandemных повторов в них.

На основании выявления вставки 1 или 2 TRS из 10 пар оснований в межгенную область между *I73R* и *I329L* удалось разделить изоляты II генотипа на 4 группы [9]. В референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» идентифицирована дополнительная 17-нуклеотидная TRS-вставка в межгенной области *MGF505-9R/MGF505-10R* (MGF-2). Анализ этой области, в свою очередь, позволил выделить среди изолятов II генотипа 3 дополнительных кластера [8].

Изучение стандартно выбираемых фрагментов генома (таких как *B602L*, *B646L* или *E183L*) у вариантов, принадлежащих ко II генотипу вируса АЧС, не даёт достаточно информации для филогенетической кластеризации близкородственных изолятов. В то же время полногеномное секвенирование предоставляет возможность как идентификации известных, так и выявления новых геномных маркёров. Значительный массив данных по идентифицированным вариабельным областям вирусного генома делает полногеномное секвенирование изолятов, детектированных на территории РФ и других стран, единственным методом, дающим дополнительную информацию об эпизоотологии болезни. В совокупности эти сведения позволяют отследить пути распространения инфекционного агента.

Целями данной работы являлись сравнительный анализ изолята ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 и определение дополнительных молекулярных маркёров, использование которых возможно при кластеризации вируса АЧС II генотипа.

Нами приведены результаты полногеномного секвенирования и сравнительного изучения генома вирусного изолята, выделенного от дикого кабана и идентифицированного как этиологический агент первого очага инфекции на юго-востоке России (Забайкальский Край) в непосредственной близости от границы с Монголией.

### Материал и методы

**Вирусные изоляты.** В экспериментах использован образец патологического материала от дикого кабана, павшего на территории Мензинского сельского поселения, Красночикойского района Забайкальского края РФ (географические координаты 49.364383, 108.549859), на расстоянии ~2,5 км от границы с Китайской Народной Республикой (КНР). Полученный образец исследован методами полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) и вирусовыделения, что позволило установить наличие в пробе возбудителя АЧС и его генома [2]. Данный изолят получил название ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020.

**Культивирование, титрование и очистка вируса.** С целью накопления вируса использовали культуру клеток селезёнки свиньи (СС) [11, 13]. Накопленный вирусосодержащий материал объединяли и использовали для выделения геномной ДНК (гДНК).

**Выделение генома.** гДНК экстрагировали фенол-хлороформным методом; образовавшийся осадок затем элюировали в воде, не содержащей нуклеаз [7].

**Полногеномное секвенирование, сборка и выравнивание последовательности.** Библиотеку последовательностей конструировали с использованием набора Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina, США). Процедуру секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) выполняли с применением комплекта реагентов MiSeq reagent kit version 2 (Illumina) с 250 циклами парно-концевого прочтения на высокопроизводительном секвенаторе Illumina MiSeq System (Illumina). Собранную геномную последовательность выравнивали в соответствии с референтным геномом варианта FR682468.1\_ASFV/Georgia 2007/1. Средняя глубина покрытия составила  $\times 45$ , длина фрагментов – 250 п.н.

Открытые рамки считывания (ОРС) определяли посредством программы GATU. Полная последовательность генома депонирована в базе GenBank с номером доступа MZ325862.

**Филогенетический анализ.** С целью проведения сравнительного генетического анализа были получены сведения о ранее секвенированных изолятах вируса АЧС из РФ и соседних с ней стран из GenBank (табл. 1). Указанные последовательности использовали для обнаружения однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), выравнивания и определения филогенетического родства изолятов. Построение, выравнивание и идентификацию ОНП осуществляли в программном обеспечении CLC Genomics Workbench v.9 (QIAGEN, Aarhus, Дания; www.clcbio.com).

Филогенетический анализ последовательностей выполняли методом максимального правдоподобия

(maximum likelihood, ML) путём сравнения с 1000 итерациями начальной загрузки по модели общего обратимого времени (General Time-Reversible, GTR) GTR + G + I (общее обратимое время + гамма-распределение + независимые частоты) = 4 в программной среде Mega X [12, 14].

**Статистическую обработку** проводили с использованием программы STATISTICA 10.0 для определения среднего значения ( $M$ ) и стандартного отклонения (standard deviation,  $SD$ ). Различия считали статистически достоверными при величине  $p \leq 0,001$ .

### Результаты

**Вирусовыделение и культивирование.** Эффект гемадсорбции в клеточной культуре СС, инокулированной вирусосодержащим материалом из суспензии органов дикого кабана, наблюдали на 3 сут инкубации при 37 °С. В дальнейшем полученную вирусосодержащую суспензию использовали для проведения последовательного пассирования возбудителя на указанной культуре.

За титр вируса принимали его максимальное разведение, вызывающее гемадсорбцию в 50% инфицированных культур клеток, на 0,1 мл и выражали в виде десятичного логарифма (lg) гемадсорбирующей единицы (ГАЕ). Значения титра рассчитывали согласно методическим рекомендациям А. Мазлума и соавт. [13].

Динамика изменения показателей вирусного титра показала увеличение накопления возбудителя с каждым последующим пассажем (табл. 2), что свидетельствовало об эффективной репликации вируса в культуре клеток без изменения его гемадсорбирующей активности. Эти показатели имели большое значение для процедуры дальнейшего накопления и очистки вируса из большого объёма вирусосодержащей суспензии.

Посредством секвенирования на платформе Illumina определена полная нуклеотидная последовательность генома ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020, размер которой составил 189 380 п.н. С использованием программы GATU в данном геноме установлено наличие 189 ОРС. Изучение полногеномной последовательности показало, что указанный изолят принадлежит ко II генотипу [1].

На рис. 1 приведено филогенетическое дерево, построенное на основании результатов анализа С-концевого фрагмента гена *B646L* вирусного изолята ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020.

Как видно из рис. 1, все изоляты вируса АЧС, выделенные на территории Европы и Азии в течение 2007–2020 гг., включая ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020, относятся ко II генотипу. На основе анализа межгенных областей (*I73R/I329L*) и *MGF505 (9R-10R)* указанный вариант отнесён к кластеру IGR-1 (рис. 2) и подгруппе MGF-1 [8].

Можно видеть, что ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 относится к группе IGR-1 наряду с вариантами Georgia 2007/1 (Грузия), China ASFV-wbBS01 (КНР), изолятами из России (ASFV/Amur 19/WB-6905 и ASFV/Kabardino-Balkaria 19/WB-964) и Польши

Таблица 1. Сведения об использованных изолятах вируса африканской чумы свиней из базы GenBank

Table 1. Information about African swine fever virus isolates retrieved from GenBank database

Номер изолята Isolate number	Название изолята Isolate name	Страна Country	Номер доступа в GenBank GenBank accession number
1	Georgia 2007/1	Грузия Georgia	FR682468.2
2	ASFV/Primorsky 19/WB-6723	Россия Russia	MW306190
3	ASFV/Amur 19/WB-6905	Россия Russia	MW306191
4	ASFV/Ulyanovsk 19/WB-5699	Россия Russia	MW306192
5	ASFV/Kabardino-Balkaria 19/WB-964	Россия Russia	MT459800
6	Odintsovo 02/14	Россия Russia	KP843857.1
7	ASFV/LT14/1490	Латвия Latvia	MK628478.1
8	China Pig/HLJ/2018	Китай China	MK333180.1
9	China/2018/AnhuiXCGQ	Китай China	MK128995.1
10	China ASFV-wbBS01	Китай China	MK645909.1
11	China DB/LN/2018	Китай China	MK333181.1
12	Pol17_04461_C210	Польша Poland	MG939588.1
13	Pol17_03029_C201	Польша Poland	MG939587.1
14	Pol16_29413_o23	Польша Poland	MG939586.1
15	Pol16_20540_o10	Польша Poland	MG939585.1
16	CzechRepublic 2017/1	Чехия Czech Republic	LR722600.1
17	Moldova 2017/1	Молдова Moldova	LR722599.1
18	Belgium 2018/1	Бельгия Belgium	LR536725.1

Таблица 2. Показатели титра накопления изолята вируса африканской чумы свиней ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 ( $n = 3$ ) в культуре клетокTable 2. Indicators of accumulation titer of African swine fever virus isolate ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 ( $n = 3$ ) in the cell culture

Изолят вируса Virus isolate	Номер пассажа Passage number	Титр вируса в пассаже, lg ГАД <sub>50</sub> ( $M \pm SD$ ) Virus titer in the passage, lg HAU <sub>50</sub> ( $M \pm SD$ )		
		1	2	3
ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020		4,21 ± 0,26	5,66 ± 0,14	6,02 ± 0,12

**Примечание.** ГАД<sub>50</sub> – гемадсорбирующая единица.

**Note.** HADU, hemadsorption unit.

(Pol17 03029 C201 и Pol16 29413 o23). Однако другие изоляты из этих же стран, а также из Чехии, Молдовы и Бельгии, имели вставку в указанной межгенной области и, следовательно, относились к кластеру IGR-2.

Группирование вариантов вируса исключительно на основании сравнения охарактеризованных 2 участков генома не совпало с результатом филогенетического анализа полногеномных последовательностей. Так, сравнение геномных последовательностей варианта ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 и 18 образцов

из других стран, объединило исследуемый изолят, а также варианты из Китая, Бельгии, Молдовы и Чехии в отдельный кластер Восток. Соответствующее филогенетическое дерево показано на **рис. 3**.

ОИП идентифицированы в соответствии с данными, полученными при выравнивании с референтным изолятом Georgia 2007/1. В результате анализа обнаружены 33 ОИП, из которых 13 локализируются в межгенных областях, 10 приводят к изменению аминокислотной последовательности кодируемых ими бел-

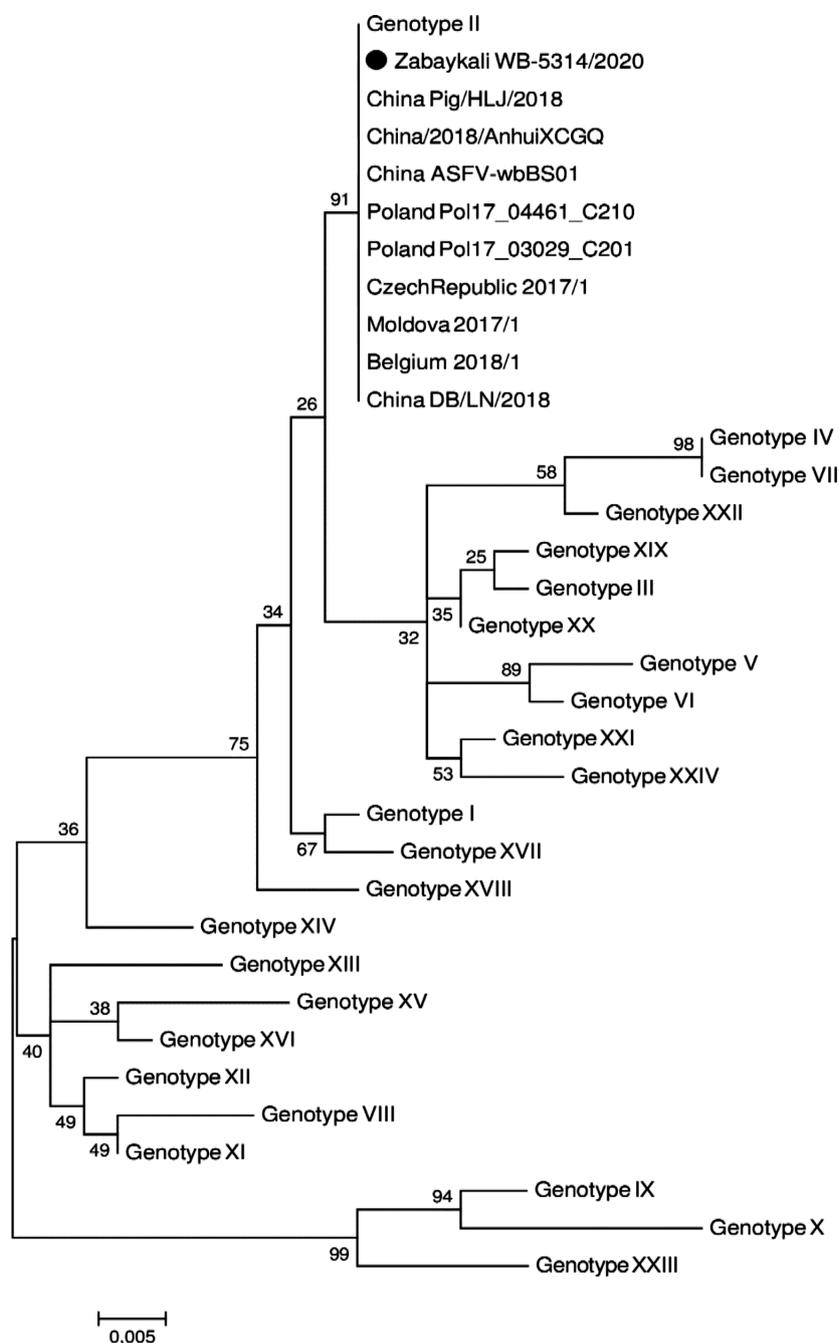


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основании данных анализа С-концевого фрагмента гена *B646L* изолята ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 вируса африканской чумы свиней.

Примечание. Изолят ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 обозначен кружком черного цвета.

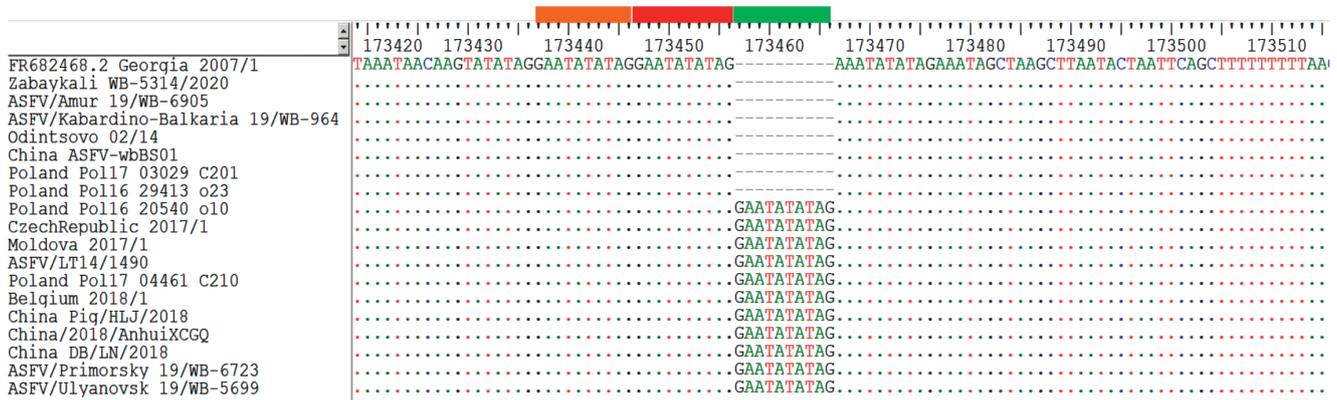
Fig. 1. Phylogenetic tree based on the analysis of the C-terminal fragment of the *B646L* gene of ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 isolate of the African swine fever virus.

Note. Isolate ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 is indicated with black circle.

ков и 10 – оказывают влияние на ОРС генов вируса АЧС. Более подробная информация о расположении ОНП представлена в табл. 3.

Использование гена *DP60R* в качестве маркера при группировании изолятов вируса АЧС в соответствии с рекомендациями X. Wen и соавт. [18] позволило

разделить анализируемые изоляты на 3 группы [18] (рис. 4). Как видно из рис. 4, группирование изолятов вируса АЧС осуществлялось по следующему принципу: в группу I вошли изоляты, имеющие такой же аминокислотный состав, как и референтный Georgia 2007/1; в группу II – изоляты, имеющие замену

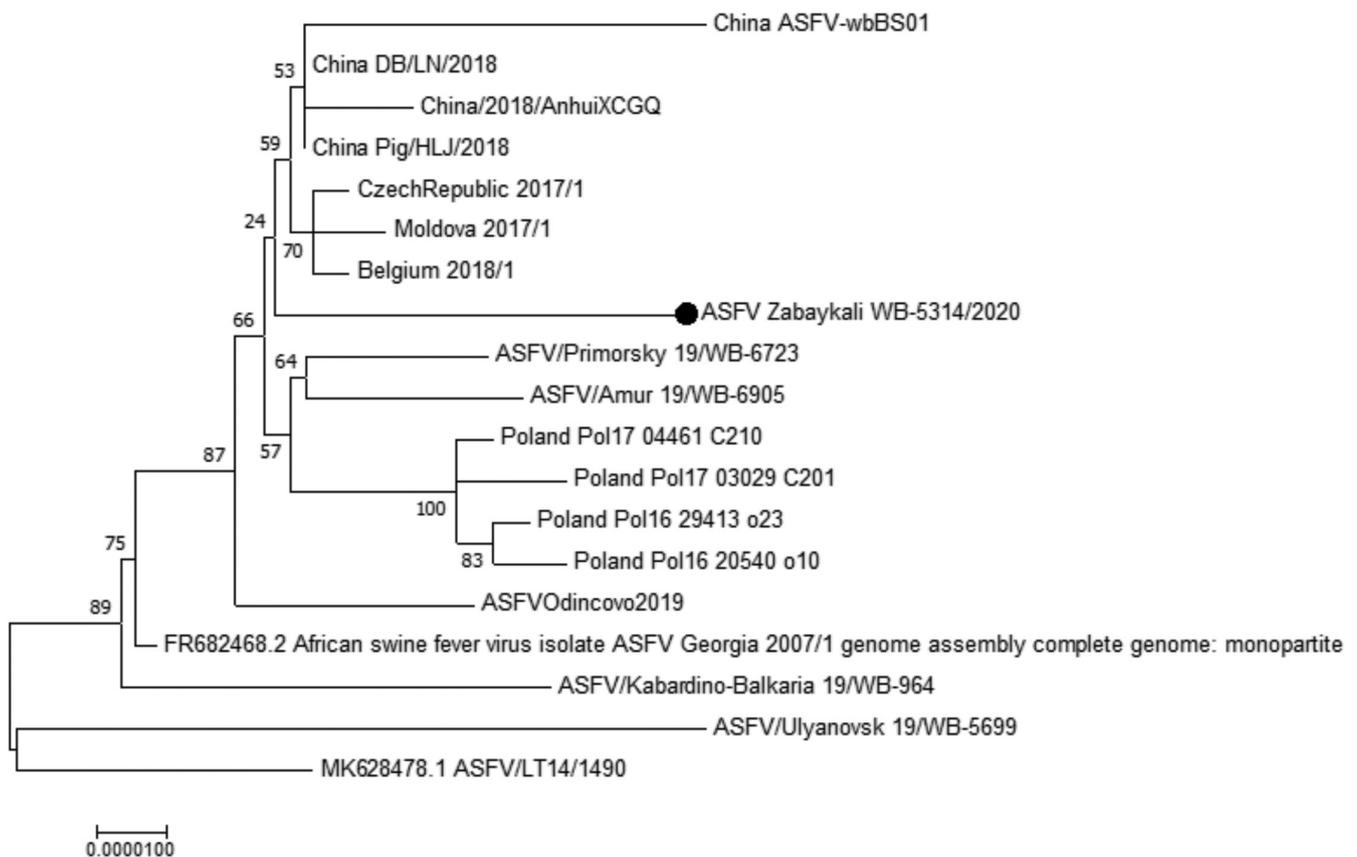


**Рис. 2. Нуклеотидные последовательности межгенной области *I73R/I329L* изолятов вируса африканской чумы свиней, использованных в исследовании.**

**Примечание.** Каждая буква представляет один нуклеотид в соответствии с международной номенклатурой. Присутствующие в геноме тандемные повторы обозначены оранжевым и красным цветами, дополнительный тандемный повтор выделен зелёным цветом.

**Fig. 2. Nucleotide sequences of the *I73R/I329L* intergenic region of the African swine fever virus isolates used in the study.**

**Note.** Each letter represents one nucleotide according to international nomenclature. Tandem repeats present in the genome are marked in orange and red; an additional tandem repeat is highlighted in green.



**Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основании данных анализа 15 полных геномных последовательностей вируса африканской чумы свиней II генотипа.**

**Примечание.** Изолят, выделенный на территории Российской Федерации, обозначен кружком черного цвета.

**Fig. 3. Phylogenetic tree based on the analysis of 15 complete genome sequences of the African swine fever virus belonging to genotype II.**

**Note.** Isolate obtained from the Russian Federation is indicated with black circle.

Таблица 3. Предсказуемые однонуклеотидные полиморфизмы в гене ASFV/Zabaikali/WB-5314/2020 по сравнению с вариантом Georgia/2007-1 и другими изолятами из Российской Федерации, их значение или влияние на аминокислотные последовательности белков  
 Table 3. Predicted single-nucleotide polymorphisms in the ASFV/Zabaikali/WB-5314/2020 genome compared with the Georgia/2007-1 variant and other isolates from the Russian Federation, their significance or effect on the proteins' amino acid sequences

Ген Gene	Позиция (аминокислота, замена) Position (amino acid, substitution)	ASFV/Primorsky 19/WB-6723	ASFV/Ulyanovsk 19/WB-5699	ASFV/Amur 19/WB-6905	ASFV/Kabardino- Balkaria 19/WB-964	Georgia/2007-1 (FR682468.2)	ASFV/ Zabaikaly
<b>Несинonymous однонуклеотидные полиморфизмы</b> Non-synonymous single-nucleotide polymorphisms							
<i>KP177R</i>	77: V→Y	V	V	V	V	V	Y
<i>MGF360-10L</i>	329: N→S	S	N	S	N	N	S
<i>MGF505-4R</i>	253: H→Y	H	H	H	H	H	Y
<i>MGF505-9R</i>	323: E→K	E	K	E	K	K	E
<i>A137R</i>	92: P→S	S	S	S	S	S	P
<i>C84L*</i>	28: R→K	R	R	R	R	R	K
<i>NP419L</i>	414: S→N	S	N	S	N	N	S
<i>E199L</i>	85: A→P	A	A	A	A	A	P
<i>I267L*</i>	235: Q→K	Q	Q	Q	Q	Q	K
<i>I267L</i>	195: F→I	F	I	F	I	I	F
<b>Межгенная область</b> Intergenic region							
Повторяющаяся область <i>KP93L</i> Repeat region <i>KP93L</i>	Точечная мутация (замена или делеция) Point mutation (substitution or deletion)	T	T	T	T	T	A
<i>MGF360-3L / MGF110-L</i>	Гомополимер Homopolymer	7G	7G	7G	7G	8G	7G
<i>ASFV-G-ACD_00320*</i> / <i>ASFV-G-ACD_00330*</i>		13G	12G	12G	11G	9G	11G
<i>MGF300-1L*</i> / <i>MGF300-2R*</i>		10T	10T	10T	10T	10T	10T
<i>MGF360-10L*</i> / <i>MGF360-11L*</i>		5A	5A	5A	5A	5A	4A
<i>MGF360-10L*</i> / <i>MGF360-11L*</i>		7G	6G	7G	6G	6G	7G
<i>B602L*</i> / <i>B385R*</i>	Точечная мутация (замена или делеция) Point mutation (substitution or deletion)	A	A	A	A	A	-
<i>CP123L / CP2475L</i>							

Продолжение табл. 3 см. на стр. 161.

Продолжение табл. 3 со стр. 160.

Ген Gene	Позиция (аминокислота, замена) Position (amino acid, substitution)	ASFV/Primorsky 19/WB-6723	ASFV/Ulyanovsk 19/WB-5699	ASFV/Amur 19/WB-6905	ASFV/Kabardino- Balkaria 19/WB-964	Georgia/2007-1 (FR682468.2)	ASFV/ Zabakaly
<i>I73R / I329L</i>	Тандемная повторяющаяся последовательность Tandem repeat sequence	IGR-2	IGR-2	IGR-1	IGR-1	IGR-1	IGR-1
ASFV-G-ACD_01990 / <i>DP60R</i>	Точечная мутация (замена или делеция) Point mutation (substitution or deletion)	A	A	A	A	A	T
<i>MGF110-1L</i>	196 vs 214 aa/a.o.	T – 196	C – 214	C – 214	T – 196	C – 214	T – 196
ASFV-G-ACD_00190	(40 → 47) A → –	47 (–)	47 (–)	47 (–)	47 (–)	40 (A)	47 (–)
<i>MGF110-11L</i>	Гомополимер C* Homopolymer C*	9C	11C	13C	13C	13C	11C
<i>MGF110-13Lb</i>	A → C (G = G)	A	A	A	A	A	C-конец с 6 аминокислоты C-terminate in 6 aa
<i>MGF110-13Lb</i>	Гомополимер C* Homopolymer C*	11C	13C	9C	10C	17C	15C
ASFV-G-ACD_00290	Гомополимер C* Homopolymer G*	8G	12G	8G	12G	10G	8G
<i>MGF300-2R</i>	76: N (160 aa/a.o.) → E + C-terminate (C-конец) (76 aa/a.o.)*	N (160)	N (160)	N (160)	N (160)	N (160)	E (76)
<i>C84L</i>	23: Q → K (G → –)	K	K	K	K	K	Q
<i>C717R</i>	592: E → R (G → –)	E	E	E	E	E	R Ранний конец (terminate early)
<i>DP60R</i>	38: N → I (A → –)	N	I	N	I	I	N

**Альтернативные открытые рамки считывания**  
Alternative open reading frames

**Примечание.** Знак \* после названия ОРС указывает на то, что ОНП является частью гомополимера. Для гомополимеров указано количество повторяющихся нуклеотидов (например, 7G означает, что в ряду присутствует 7 остатков гуанина). Если ОНП вызывает раннюю терминацию белка (например, *MGF300-2R*), то прогнозируется, что один белок состоит из 76 аминокислот, а остальные – из 160 аминокислот).

**Note.** The \* after the ORF name indicates that the SNP is part of a homopolymer. For homopolymers, the number of repeated nucleotides is indicated (e.g., 7G means that there are 7 guanine residues in the series). If the SNP causes early termination of a protein (e.g., *MGF300-2R*), then one protein is predicted to consist of 76 amino acids and the others are predicted to consist of 160 amino acids).

в позиции 38 (изолейцин (Ile, I) на аспарагин (Asp, N)). Наконец, группу III составил единственный изолят ASFV/LT14/1490, который имеет замену в позиции 9 – лизин (Lys, K) на изолейцин (Ile, I). В соответствии с данными исследования этого участка вариант ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 имеет родство с 3 изолятами из КНР, 2 из РФ и 4 – из Польши (рис. 4).

Далее нами проведён филогенетический анализ объединённых аминокислотных последовательностей генов *MGF505-9R*, *C84L*, *I267L* и *DP60R* [16, 18] (рис. 5). В соответствии с ним изоляты из КНР и Европы были сгруппированы вместе с изолятами ASFV/Primorsky 19/WB-6723 и ASFV/Amur 19/WB-6905 из РФ. В то же время они отличались от выделенных на территории РФ в 2019 г. изолятов ASFV/Ulyanovsk 19/WB-5699 и ASFV/Kabardino-Balkaria 19/WB-964. ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 не входил в ту же группу, что и перечисленные варианты.

### Обсуждение

На протяжении 11 лет вспышки АЧС на территории Российской Федерации регистрировались исключительно в её западных регионах. Однако в 2017 г. notified несколько вспышек среди домашних свиней в Иркутской и Омской областях, расположенных в Юго-Восточной Сибири.

К концу 2018 г. и в начале 2019 г. ряд вспышек АЧС зарегистрирован в КНР. За ними в том же году последовали аналогичные эпизоды в регионах Дальнего Востока РФ, граничащих с этим государством. Согласно X. Wen и соавт., [18], генетический анализ по-

зволил установить, что изоляты вируса АЧС из КНР наиболее близки к вариантам, выделенным в 2015–2018 гг. в Польше, Бельгии, Молдове и Чехии [18].

Кластеризация вирусов АЧС II генотипа осуществляется путём исследования ограниченного числа выбранных областей генома (межгенные области между *I73R* и *I329L*): *C84L*, *MGF360-1L*, *I267L*, *DP60R* и *MGF360-16R* [9, 10, 18]. Несмотря на относительно высокую скорость накопления замен в геноме этого инфекционного агента по сравнению с другими ДНК-содержащими вирусами (от  $10^{-4}$  до  $10^{-5}$  замен/сайт/год), число известных геномных молекулярных маркёров для изолятов II генотипа до настоящего времени недостаточно для проведения детальной субкластеризации [3].

На сегодняшний день методика полногеномного секвенирования остаётся наиболее точной в случаях установления филогенетического родства и оценки распределения вирусов АЧС в различных географических регионах. Это обусловлено тем, что повышенный уровень мутаций в геноме вируса АЧС по сравнению с другими ДНК-вирусами не позволяет определять степень родства изолятов по единственному (изолированно выбранному) генетическому маркёру, а использование в целях филогенетического анализа различных комбинаций маркёров может группировать одни и те же изоляты в разные кластеры. Так, с учётом исследования межгенных областей (рис. 2) вариант ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 группируется отдельно от нескольких изолятов из Польши и 3 – из КНР, поскольку не содержит TRS. В то же время построение филогенетического дерева на основа-

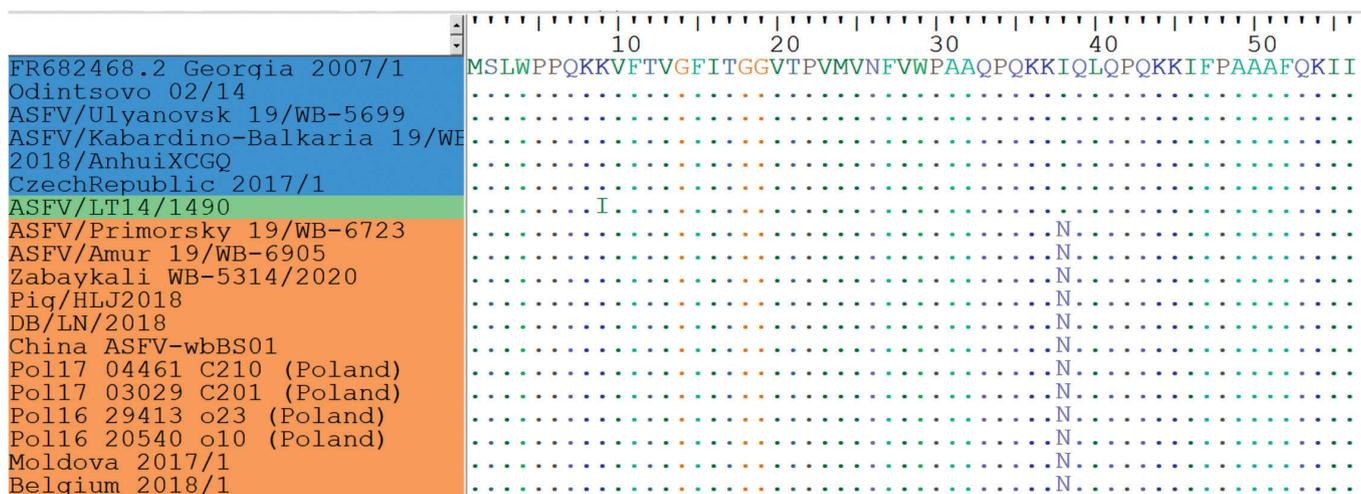


Рис. 4. Предсказанные аминокислотные последовательности продукта гена *DP60R* изолятов вируса африканской чумы свиней.

**Примечание.** Каждая буква представляет одну аминокислоту в соответствии с международной номенклатурой. Изоляты, выделенные разными цветами, относятся к разным группам в соответствии с мутациями в их последовательностях.

**Fig. 4. Predicted amino acid sequences of the *DP60R* gene of African swine fever virus isolates.**

**Note.** Each letter represents one amino acid according to international nomenclature. Isolates highlighted by different colors belong to different groups based on mutations in their sequences.

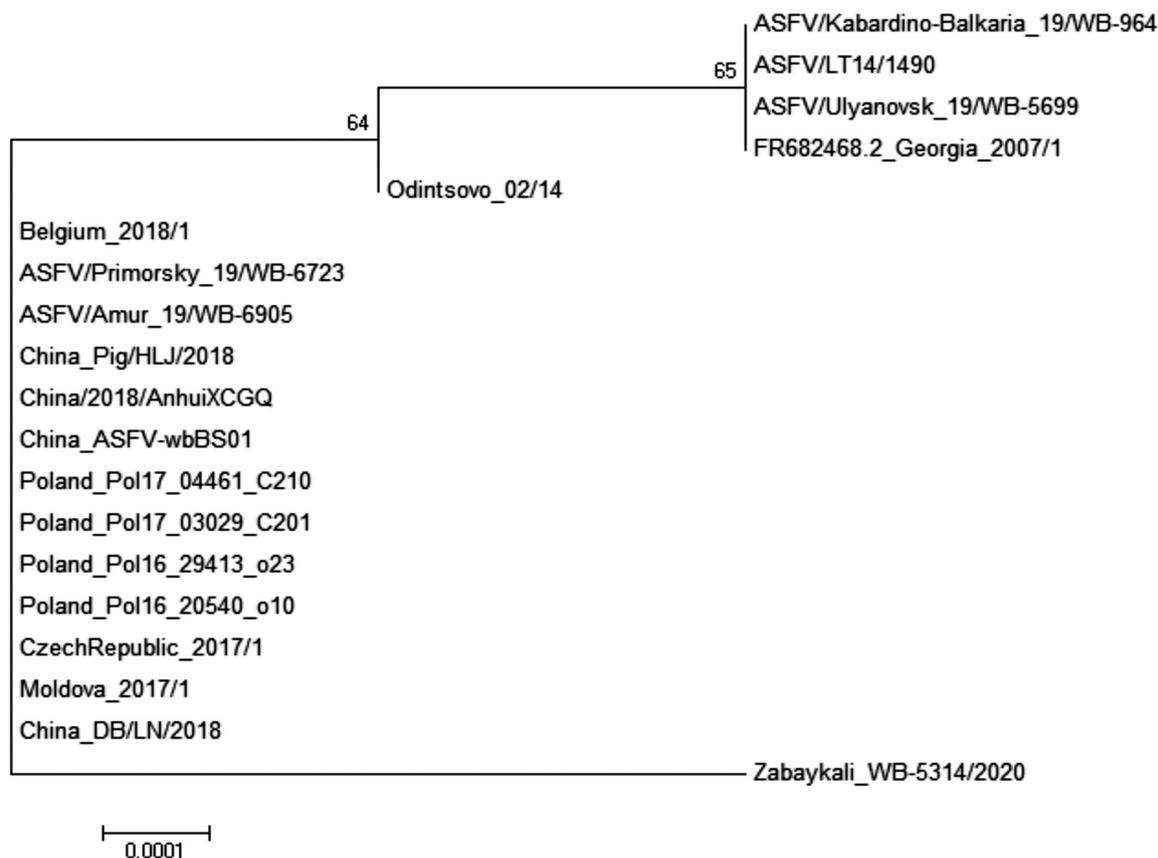


Рис. 5. Филогенетическое древо, указывающее на связь объединённых аминокислотных последовательностей генов *MGF505-9R*, *C84L*, *I267L* и *DP60R* изолятов вируса африканской чумы свиней ( $n = 15$ ).

Fig. 5. Phylogenetic tree indicating the relationships between the combined amino acid sequences of the *MGF505-9R*, *C84L*, *I267L*, and *DP60R* genes of the isolates of African swine fever virus ( $n = 15$ ).

нии секвенирования гена *DP60R* (рис. 4) объединяет ASFV/Zabaykali/WB-5314/2020 с изолятами из КНР и Польши.

Следует отметить, что метод кластеризации изолятов вируса АЧС с использованием ограниченного числа маркерных участков генома, будучи наименее затратным по времени, даёт различающиеся в плане группировки результаты при использовании различных комбинаций маркёров. Кроме того, любая мутация, не попадающая в границы выбранных для исследования участков, вне зависимости от изменённых ей биологических свойств вируса не будет учтена. При этом филогенетический анализ полногеномных последовательностей подтверждает данные предыдущих работ по группированию вирусов II генотипа, в то время как выделенный на территории РФ образец в результате кластеризации оказывается распределённым в группу вместе с изолятами из КНР [18] (рис. 3).

### Заключение

Таким образом, на основании определения полных нуклеотидных последовательностей геномов вируса АЧС идентифицирована новая варибельная область

в виде гена *DP60R*, кластеризация по которому дала результат, аналогичный таковому при изучении полноразмерных геномов. Можно предположить, что дальнейшие работы по групповому распределению изолятов вируса АЧС, базирующиеся на анализе последовательности этого гена, смогут выявить значимость данной генной структуры для соответствующих научных изысканий в отношении эволюции патогена и путей его распространения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Achenbach J.E., Gallardo C., Nieto-Pelegrin E., Rivera-Arroyo B., Degefa-Negi T., Arias M., et al. Identification of a new genotype of African swine fever virus in domestic pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(5): 1393–404. <https://doi.org/10.1111/tbed.12511>
2. OIE Terrestrial Manual. African swine fever virus (Infection with African swine fever virus); 2019. Available at: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.08.01\\_ASF.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf) (accessed January 14, 2021).
3. Alkhamis M.A., Gallardo C., Jurado C., Soler A., Arias M., Sánchez-Vizcaíno J.M. Phylodynamics and evolutionary epidemiology of African swine fever p72-CVR genes in Eurasia and Africa. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0192565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192565>
4. Bastos A.D.S., Penrith M.L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterization. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>

- Blasco R., Agüero M., Almendral J.M., Viñuela E. Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. *Virology*. 1989; 168(2): 330–8. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90273-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90273-0)
- Blasco R., de la Vega I., Almazan F., Agüero M., Viñuela E. Genetic variation of African swine fever virus: Variable regions near the ends of the viral DNA. *Virology*. 1989; 173(1): 251–7. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90241-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90241-9)
- Mazloum A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens*. 2021; 10(5): 521. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521>
- Elsukova A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A. Tandem repeat sequence in the intergenic region MGF 505 9R/10R is a new marker of the genetic variability among ASF Genotype II viruses. In: *Proceedings of 10<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE*. Madrid; 2016: 78. Available at: [https://www.epizone-eu.net/upload\\_mm/8/4/2/b267aa36-5e28-4fed-aa9c-992209f9d3f7\\_Epizone10thAM\\_AbstractBookMeeting2016Madrid.pdf](https://www.epizone-eu.net/upload_mm/8/4/2/b267aa36-5e28-4fed-aa9c-992209f9d3f7_Epizone10thAM_AbstractBookMeeting2016Madrid.pdf) (accessed January 14, 2021).
- Gallardo C., Fernández-Pinero J., Pelayo V., Gazaev I., Markowska-Daniel I., Pridotkas G., et al. Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, Eastern and Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(9): 1544–7. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140554>
- Ge S., Li J., Fan X., Liu F., Li L., Wang Q., et al. Molecular characterization of African swine fever virus, China, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(11): 2131–3. <https://doi.org/10.3201/eid2411.181274>
- Greig A.S., Boulanger P., Bannister G.L. African swine fever. V. Cultivation of the virus in primary pig kidney cells. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 1967; 31(1): 24–31.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Мазлум А., Шарипова Д.В., Гаврилова В.Л. *Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезёнки свиней*. Владимир; 2019.
- Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000.
- Ortín J., Enjuanes L., Viñuela E. Cross-links in African swine fever virus DNA. *J. Virol.* 1979; 31(3): 579–83. <https://doi.org/10.1128/jvi.31.3.579-583.1979>
- Portugal R., Coelho J., Höper D., Little N.S., Smithson C., Upton C., et al. Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(Pt. 2): 408–19. <https://doi.org/10.1099/vir.0.070508-0>
- Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). Эпизоотическая ситуация по АЧС в Российской Федерации в 2020 г. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2020/12-31/01.pdf> (accessed January 14, 2021).
- Wen X., He X., Zhang X., Zhang X., Liu L., Guan Y., et al. Genome sequences derived from pig and dried blood pig feed samples provide important insights into the transmission of African swine fever virus in China in 2018. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1): 303–6. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1565915>
- Alkhamis M.A., Gallardo C., Jurado C., Soler A., Arias M., Sánchez-Vizcaino J.M. Phylodynamics and evolutionary epidemiology of African swine fever p72-CVR genes in Eurasia and Africa. *PLoS One*. 2018; 13(2): e0192565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192565>
- Bastos A.D.S., Penrith M.L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterization. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
- Blasco R., Agüero M., Almendral J.M., Viñuela E. Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. *Virology*. 1989; 168(2): 330–8. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90273-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90273-0)
- Blasco R., de la Vega I., Almazan F., Agüero M., Viñuela E. Genetic variation of African swine fever virus: Variable regions near the ends of the viral DNA. *Virology*. 1989; 173(1): 251–7. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90241-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90241-9)
- Mazloum A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens*. 2021; 10(5): 521. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521>
- Elsukova A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A. Tandem repeat sequence in the intergenic region MGF 505 9R/10R is a new marker of the genetic variability among ASF Genotype II viruses. In: *Proceedings of 10<sup>th</sup> Annual Meeting EPIZONE*. Madrid; 2016: 78. Available at: [https://www.epizone-eu.net/upload\\_mm/8/4/2/b267aa36-5e28-4fed-aa9c-992209f9d3f7\\_Epizone10thAM\\_AbstractBookMeeting2016Madrid.pdf](https://www.epizone-eu.net/upload_mm/8/4/2/b267aa36-5e28-4fed-aa9c-992209f9d3f7_Epizone10thAM_AbstractBookMeeting2016Madrid.pdf) (accessed January 14, 2021).
- Gallardo C., Fernández-Pinero J., Pelayo V., Gazaev I., Markowska-Daniel I., Pridotkas G., et al. Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, Eastern and Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(9): 1544–7. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140554>
- Ge S., Li J., Fan X., Liu F., Li L., Wang Q., et al. Molecular characterization of African swine fever virus, China, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(11): 2131–3. <https://doi.org/10.3201/eid2411.181274>
- Greig A.S., Boulanger P., Bannister G.L. African swine fever. V. Cultivation of the virus in primary pig kidney cells. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 1967; 31(1): 24–31.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Mazloum A., Sharypova D.V., Gavrilova V.L. *Guidelines for the Isolation and Titration of African Swine Fever Virus in a Culture of Pig Spleen Cells [Metodicheskie rekomendatsii po vydeleniyu i titrovaniyu virusa afrikanskoj chумы sviney v kul'ture kletok selezenki sviney]*. Vladimir; 2019. (in Russian)
- Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000.
- Ortín J., Enjuanes L., Viñuela E. Cross-links in African swine fever virus DNA. *J. Virol.* 1979; 31(3): 579–83. <https://doi.org/10.1128/jvi.31.3.579-583.1979>
- Portugal R., Coelho J., Höper D., Little N.S., Smithson C., Upton C., et al. Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(Pt. 2): 408–19. <https://doi.org/10.1099/vir.0.070508-0>
- The Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Supervision. Epizootic situation of ASF in the Russian Federation in 2020 [*Federal'naya sluzhba po veterinarnomu i fitosanitarnomu nadzoru (Rossel'khoz nadzor). Epizooticheskaya situatsiya po AChS v Rossijskoy Federatsii v 2020 g.*]. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2020/12-31/01.pdf> (in Russian) (accessed January 14, 2021).
- Wen X., He X., Zhang X., Zhang X., Liu L., Guan Y., et al. Genome sequences derived from pig and dried blood pig feed samples provide important insights into the transmission of African swine fever virus in China in 2018. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1): 303–6. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1565915>

## REFERENCES

- Achenbach J.E., Gallardo C., Nieto-Pelegrin E., Rivera-Arroyo B., Degefa-Negi T., Arias M., et al. Identification of a new genotype of African swine fever virus in domestic pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(5): 1393–404. <https://doi.org/10.1111/tbed.12511>
- OIE Terrestrial Manual. African swine fever virus (Infection with African swine fever virus); 2019. Available at: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.08.01\\_ASF.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf) (accessed January 14, 2021).