



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-182>

© ШОТИН А.Р., ЧЕРНЫШЕВ Р.С., МОРОЗОВА Е.О., ИГОЛКИН А.С., ГРУЗДЕВ К.Н., КОЛБИН И.С., ЛАВРЕНТЬЕВ И.А., МАЗЛУМ А., 2023



Молекулярно-биологические свойства изолята вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) ASF/Tatarstan 20/WB-12276

Шотин А.Р., Чернышев Р.С., Морозова Е.О., Иголкин А.С., Груздев К.Н., Колбин И.С., Лаврентьев И.А., Мазлум А.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир, Россия

Введение. Успех искоренения африканской чумы свиней (АЧС) в неблагополучной стране в целом или конкретном регионе в частности зависит от многих факторов, включая наличие актуальных данных о циркулирующих изолятах возбудителя.

Цель работы – охарактеризовать молекулярно-биологические свойства изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 и провести его сравнительный анализ с изолятами из Европы и Азии.

Материалы и методы. При проведении биологической пробы использовали 8 голов свиней крупной белой породы массой 15–20 кг/гол. Исследования на наличие специфических антител к вирусу АЧС в образцах сыворотки крови проводили иммуноферментным и иммунопероксидазным методами, генома возбудителя – методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Выделение изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 и определение титра вируса осуществляли в культуре клеток селезенки свиней. Секвенирование маркерных областей генома изолята выполняли по методу Сэнгера.

Результаты. В ходе работы вирус был охарактеризован как высоковирулентный, способный вызывать АЧС от острой до подострой формы. Выявленные при проведении филогенетического анализа (по маркерам IGR/I73R-I329L и I267L) замены в геноме изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 позволили объединить изучаемый вариант с изолятами, распространенными на большей части Европы и Азии.

Заключение. Впервые изучены молекулярно-биологические свойства изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276, выделенного из селезенки от отстрелянного дикого кабана на территории Республики Татарстан.

Ключевые слова: африканская чума свиней; Республика Татарстан; биологическая проба; биологические свойства; молекулярно-генетический анализ; филогенетический анализ; дендрограмма

Для цитирования: Шотин А.Р., Чернышев Р.С., Морозова Е.О., Иголкин А.С., Груздев К.Н., Колбин И.С., Лаврентьев И.А., Мазлум А. Молекулярно-биологические свойства изолята вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) ASF/Tatarstan 20/WB-12276. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(4): 302–314. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-182> EDN: <https://elibrary.ru/naxnli>

Для корреспонденции: Шотин Андрей Романович, н.с. референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, г. Владимир, Россия. E-mail: shotin@arriah.ru

Участие авторов: Шотин А.Р., Иголкин А.С. – концепция и дизайн исследования; Шотин А.Р., Мазлум А., Морозова Е.О., Чернышев Р.С., Колбин И.С. – лабораторное исследование; Шотин А.Р., Мазлум А., Иголкин А.С., Чернышев Р.С., Груздев К.Н. – сбор и обработка материала; Шотин А.Р., Чернышев Р.С., Мазлум А., Иголкин А.С., Морозова Е.О. – написание текста; Иголкин А.С., Мазлум А., Лаврентьев И.А., Груздев К.Н. – редактирование.

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

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол № Б-3/2021 от 24.05.2021).

Поступила 27.06.2023

Принята в печать 14.08.2023

Опубликована 31.08.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-182>

Molecular and biological properties of the African swine fever virus (Asfarviridae: Asfivirus) isolate ASF/Tatarstan 20/WB-12276

Andrey R. Shotin, Roman S. Chernyshev, Elizaveta O. Morozova, Alexey S. Igolkin, Konstantin N. Gruzdev, Ivan S. Kolbin, Ivan A. Lavrentiev, Ali Mazloum

Federal Center for Animal Health (ARRIAH), 600901, Vladimir, Russia

Introduction. Up-to-date data and full characterization of circulating ASFV isolates play a crucial role in virus eradication and control in endemic regions and countries.

The aim of the study was to evaluate and characterize the molecular and biological properties of the ASFV isolate ASF/Tatarstan 20/WB-12276, conduct phylogenetic analysis, and compare the results with isolates circulating in Europe and Asia.

Materials and methods. For bioassay, eight heads of the Large White pigs weighing 15–20 kg/head were used. Detection of specific anti-ASFV antibodies by ELISA and immunoperoxidase method. Detection of ASFV genome was performed by qPCR. Isolation of ASF/Tatarstan 20/WB-12276 and determination of titer were performed in pig spleen cell culture. Sequencing was carried out by the Sanger method.

Results. The virus was characterized as highly virulent and capable of causing acute to subacute forms of ASF. Phylogenetic analysis revealed substitutions in the genome of the ASF/Tatarstan 20/WB-12276 isolate (IGR/I73R-I329L and I267L markers) that supported the clustering of the studied variant with isolates prevalent in most of Europe and Asia.

Conclusion. For the first time, the molecular and biological properties of the ASF/Tatarstan 20/WB-12276 virus isolate taken from a wild boar shot on the territory of the Republic of Tatarstan were studied and analyzed.

Keywords: African swine fever; Republic of Tatarstan; biological sample; biological properties; molecular genetic analysis; phylogenetic analysis; dendrogram

For citation: Shotin A.R., Chernyshev R.S., Morozova E.O., Igolkin A.S., Gruzdev K.N., Kolbin I.S., Lavrentiev I.A., Mazloum A. Molecular and biological properties of the African swine fever virus (Asfarviridae: Asfivirus) isolate ASF/Tatarstan 20/WB-12276. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 302–314 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-182> EDN: <https://elibrary.ru/naxnli>

For correspondence: Andrey Romanovich Shotin, Researcher of the Reference Laboratory for African Swine Fever of the Federal State Budgetary Institution «ARRIAH», 600901, Vladimir, Russia. E-mail: shotin@arriah.ru

Information about the authors:

Shotin A.R., <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>

Chernyshev R.S., <https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>

Morozova E.O., <https://orcid.org/0000-0002-0955-9586>

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

Gruzdev K.N., <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>

Kolbin I.S., <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>

Lavrentiev I.A., <https://orcid.org/0009-0003-0552-3812>

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

Contribution: Shotin A.R., Igolkin A.S. – research concept and design; Shotin A.R., Mazloum A., Morozova E.O., Chernyshev R.S., Kolbin I.S. – performing of the laboratory research; Shotin A.R., Mazloum A., Igolkin A.S., Chernyshev R.S., Gruzdev K.N. – collection and processing of the material; Shotin A.R., Chernyshev R.S., Mazloum A., Igolkin A.S., Morozova E.O. – writing of the text; Igolkin A.S., Mazloum A., Lavrentiev I.A., Gruzdev K.N. – editing of the article.

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

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The study protocol was approved by the Bioethics Commission of the Federal State Budgetary Institution «ARRIAH» (protocol b/n of 30.04.2020).

Received 27 June 2023

Accepted 14 August 2023

Published 31 August 2023

Введение

Африканская чума свиней (АЧС) – болезнь вирусной этиологии, поражающая домашних и диких свиней всех возрастов, характеризующаяся геморрагической лихорадкой и высокой летальностью (до 100%) [1–3].

За период эпизоотии АЧС с 2007–2020 гг. ответственными учеными были изучены биологические свойства большого числа изолятов вируса, полученных из разных регионов Российской Федерации (РФ) от домашних и диких свиней. Посредством проведения серий лабораторных экспериментов были определены различия в некоторых молекулярно-биологических свойствах изученных изолятов этого возбудителя, часть из которых охарактеризовали как высоковирулентные, а другие – как обладающие сниженной вирулентностью и вызывающие в том числе бессимптомную форму течения болезни [3–11].

В ходе современной эпизоотии болезнь распространилась на территории 34 стран Европы и Азии, принимая панзоотический характер и нанося серьезный экономический ущерб свиноводческому и смежным секторам [1, 2, 12, 13]. В России на момент 2020 г. прогноз развития эпизоотической ситуации по АЧС характеризовался как неблагоприятный, с тенденцией вовлечения как благополучных (за последние 3 года и более) территорий, так и повторной регистрации новых вспышек болезни на ранее оздоровленных территориях [14, 15].

Так, спустя 4 года после последнего зарегистрированного случая АЧС на территории Республики Татарстан (28.09.2016, у домашних свиней, находящихся в ЛПХ с. Сосновка Нурлатского района) и проведения всех ликвидационных и профилактических мероприятий, новый очаг инфекции был зарегистрирован 12.12.2020 (павшие дикие кабаны, ФГБУ «Национальный парк «Нижняя Кама» Елабужского района). Затем в короткий срок (12.12.2020–09.02.2021) АЧС была нотифицирована на территории двух новых районов: Новошешминском и Заинском [12]. При этом только на территории последнего вирус АЧС был выделен из биологического материала от отстрелянных диких кабанов (4 головы), что может являться следствием циркуляции изолятов с пониженной вирулентностью в пределах одной географической области и требует их всестороннего изучения.

Результаты изучения молекулярно-биологических свойств современных изолятов вируса АЧС могут быть использованы при построении эффективных программ надзора и контроля за болезнью, а также для поиска перспективных генетических маркеров изменчивости для создания профилактических препаратов (вакцин), применимых в рамках стратегии по дифференциации инфицированных животных от вакцинированных (DIVA) и молекулярно-эпизоотологической кластеризации изолятов. Отсутствие единого геномного маркера, позволяющего эффективно разделять существующие изоляты вируса, требует использования при анализе нескольких участков. Так, возможно применение как основных (С-концевой участок гена *B646L*, CVR гена *B602L*, межгенная область IGR I *I73R/I329L*), так

и дополнительных (*O174L*, *K145R*, *EP402R*, *I267L*, *MGF 505-5R*) генетических маркеров [16].

На основании анализа С-концевой области гена *B646L*, кодирующего капсидный мажорный белок вируса АЧС *vp72*, проводится типирование вируса на 24 генотипа [16, 17].

CVR гена *B602L* является одним из ведущих маркеров для субгенотипирования и дифференциации изолятов вируса АЧС [17–23]. Так, в работе А. Vilem и соавт. на основании последовательностей CVR были обнаружены две генетические группы (GII-CVR2 и GII-CVR1/SNP1) изолятов вируса АЧС II генотипа, в которые вошли вирусы, циркулирующие в Эстонии в 2015–2016 гг. [17]. В работе А. Mazloun и соавт. (2022) на основании нуклеотидных последовательностей CVR изоляты вируса АЧС, выделенные в 2007–2017 гг. на территории Российской Федерации, Европы и Азии, были разделены уже на 6 генетических групп [24].

IGR *I73R/I329L* является вторым по значимости маркером в дифференциации изолятов одного генотипа. В зависимости от числа (от 2 до 5) тандемных повторов (TRS) из 10 нуклеотидов (GGAATATATA), изоляты вируса АЧС II генотипа разделяют на 4 группы [16, 25, 26].

Изоляты, циркулирующие на территориях Польши и Германии, имеют TRS из 14 п.н. (TCACTACTGAAAAA) в положении 50–63 гена *O174L*, кодирующего фактор вирулентности ДНК-полимеразу X, способную к точечной репарации генома [27].

Ген-маркер *K145R* является основополагающим в кластеризации изолятов вируса АЧС в странах восточной Европы. Ко второй группе относятся изоляты, выделенные на территории Калининградской области, Польши и Германии, для которых уникальна замена «С» на «А» в положении 173 данного гена [25]. В исследовании А. Mazloun и соавт. (2023) обнаружена замена «С» на «Т» в положении 30 гена *K145R*, характерная исключительно для изолятов, циркулирующих на территории Калининградской области РФ, что свидетельствует о формировании 3-го генетического кластера [28].

Несмотря на высокую консервативность гена *I267L*, он также может использоваться для молекулярной кластеризации изолятов вируса АЧС [29, 30]. В зависимости от наличия замены «Т» на «А» в положении 76 данного гена, изоляты возможно разделить на две независимые группы. Впервые такая замена обнаружена у изолята вируса АЧС, выделенного в Польше в 2016 г. С тех пор преобладающее число изолятов, циркулирующих на территории Европы, России и Китая, относятся ко второму кластеру по маркеру *I267L*. Закономерности в персистенции изолятов вируса АЧС по данному маркеру в пределах ограниченного географического региона не наблюдается, поскольку на территории одного государства могут циркулировать обе группы изолятов [29].

Следующим геномным маркером, используемым в молекулярной и географической дифференциации изолятов вируса АЧС, является *MGF 505-5R*, позволяющий выделить 2 кластера [25]. «А» в положе-

нии 84 гена *MGF 505-5R* имеют изоляты, циркулирующие на территории восточной Европы (Польша, Германия, Украины) и Калининградской области [28]. Другие изоляты, выделенные на территории европейских (Бельгия, Венгрия, Чехия, Литва и др.), азиатских (Китай, Вьетнам, Индия) стран и Российской Федерации имеют «G» в вышеназванном положении гена и относятся к первой, более многочисленной группе.

Таким образом можно заключить, что успех искоренения АЧС зависит от всестороннего изучения возбудителя, в частности его изолятов, особенностей репродукции и характера течения болезни.

Целью работы являлось изучение биологических свойств на восприимчивых животных (домашних свиньях), проведение молекулярно-генетического и филогенетического анализов изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 вируса АЧС, выделенного из селезенки от отстрелянного на территории Республики Татарстан дикого кабана.

Материалы и методы

Вирус. Изолят вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 был выделен специалистами ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках проведения референтных исследований на АЧС из селезенки от отстрелянного 17.12.2020 дикого кабана на территории Республики Татарстан (Зайнский район, Квартал № 110, Зайнское лесничество, Кармалинское охотхозяйство).

Вирусовыделение. Выделение изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 методом трех последовательных пассажей на первичной культуре клеток селезенки свиньи (СС) с учетом репродукции возбудителя в реакции гемадсорбции (РГАд) и определение титра виремии (IgГАдE₅₀/мл) проводили в соответствии с методическими рекомендациями по выделению и титрованию вируса АЧС в культуре клеток СС, разработанными в ФГБУ «ВНИИЗЖ»¹.

Биопроба. Биологические свойства изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 определяли путем постановки биологической пробы на домашних свиньях. Животные были завезены из благополучного по основным инфекционным болезням свиней хозяйства Московской области; содержались в условиях виварного комплекса ФГБУ «ВНИИЗЖ» в боксе соответствующего уровня биологической защиты (BSL-3). Постановку биопробы, оценку клинических признаков и патологоанатомических изменений проводили соглас-

но методическим указаниям (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)^{2,3} в соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. В экспериментах были соблюдены институциональные и национальные стандарты по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол №Б-3/2021 от 24.05.2021).

В опыте использовали 8 голов свиней крупной белой породы массой 15–20 кг/гол., из них: 6 голов (№№ 1–6) заражали культуральной суспензией, содержащей изолят ASF/Tatarstan 20/WB-12276, внутримышечно в дозе 10 ГАдE₅₀/гол. (1-я группа), а 2 головы (№№ 7, 8) содержали совместно с инфицированными животными в качестве контактных (индикаторных) для изучения контагиозности изучаемого изолята (2-я группа).

Всех животных перед началом эксперимента карантинировали в течение 7 суток и исследовали на наличие специфических антител к вирусу АЧС и его генома с целью подтверждения их негативного инфекционного статуса. За животными ежедневно проводили визуальный контроль проявления клинических признаков и термометрию каждой особи. Отбор проб крови осуществляли в вакуумные пробирки с активатором свертывания на 5, 8, 12, 16 и 19-е дни после заражения (д.п.з.). Полученные образцы разделяли на пробы сгустка и сыворотки для параллельного исследования лабораторными методами вирусовыделения, полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ), твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ-ИФА) и иммунопероксидазным методом (ИПМ). Каждый образец исследовали однократно в трех повторностях ($n = 3$), при анализе результатов использовали полученные средние значения (M) и стандартное отклонение ($\pm SD$).

Серологические исследования. Обнаружение специфических антител к вирусу АЧС проводили с использованием тест-систем для постановки ТФ-ИФА: INgezim PPA Compac (Ingenasa, Испания)⁴ и ID Screen, African Swine Fever Indirect, Screening Test (IDvet, Франция)⁵ в соответствии с инструкциями произво-

¹Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезенки свиней / Али Мазлум, Д.В. Шарыпова, В.Л. Гаврилова, О.С. Пузанкова, И.Ю. Жуков [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2019. – 24 с.

²Методические рекомендации по постановке биопробы с заражением свиней вирусом африканской чумы свиней / И.В. Шевченко, И.Ю. Жуков А.С., Першин [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2017. – 11 с.

³Методические указания по оценке клинических признаков и патологоанатомических изменений при экспериментальном заражении вирусом африканской чумы свиней / ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2017. – 21 с.

⁴Blocking Immunoenzymatic assay for detection of antibodies to African Swine Fever virus (ASFV) in porcine serum. Ingezim PPA COMPAC. Prod Ref: 11.PPA.K3. Last revision: 18-12-18. Ingenasa, Madrid, Spain

⁵Тест-система для выявления антител к вирусу африканской чумы свиней (АЧС) в сыворотке и плазме крови, мясном соке и образцах крови, нанесенных на бумажные фильтры, непрямой иммуноферментным методом ELISA. ID Screen, African Swine Fever Indirect, Screening Test. ASFS версия0115 RU. IDvet, Франция. 4 стр.

дителей, а также с помощью ИПМ, реализованного в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными в ФГБУ «ВНИИЗЖ»⁶.

ПЦР. Обнаружение генома вируса АЧС проводили методом ПЦР-РВ с использованием тест-системы «АЧС» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя⁷.

Секвенирование. Амплификацию участков генома вируса (маркеров EP402R, I267L, O174L, K145R, межгенной области IGR I I73R/I329L, центральной вариабельной области (CVR) гена B602L и MGF 505-5R) проводили с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров для каждого фрагмента, как это описано в работе А. Mazloum и соавт. (2023) [16]. ПЦР-фрагменты оценивали с электрофоретической детекцией в 1%-ном агаровом геле. Экстракцию фрагментов из геля проводили с использованием набора Wizard SV Gel and RCR Clean-up System (Promega, США). После чего выполняли секвенирование по методу Сэнгера с парами праймеров, которые использовали при проведении ПЦР.

Анализ нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ. Нуклеотидные последовательности выравняли и сравнивали с соответствующими последовательностями референс-штамма Georgia 2007/1 (номер доступа в Genbank FR682468.2) и других изолятов, импортированных из базы данных Genbank (**приложение**), с помощью программы Bioedit v7.2.5. Филогенетическое родство изолятов устанавливали методом Bootstrap (максимального подобию) с 1000 итерациями начальной загрузки по модели общего обратимого времени (GTR, G + I = 4) в компьютерной программе Mega X [31].

Статистика. Обработку данных и построение графиков проводили с использованием программных пакетов Statistica (<http://statsoft.ru>), GraphPad Prism 8.0. (<https://www.graphpad.com>) и Microsoft Excel (<https://www.microsoft.com/ru-ru>). Для показателей рассчитывали среднее (M) и стандартное отклонение (\pm SD).

Результаты

Изучение культуральных свойств

Инфицирование культуры клеток СС изучаемым изолятом ASF/Tatarstan 20/WB-12276 вируса АЧС привело к появлению «плотной» гемадсорбции (адсорбция 40–80 эритроцитов на поверхности клетки), а титр накопления вируса к 3-му пассажу в этой культуре клеток не превышал значений $7,34 \pm 0,16$ lgГАдЕ₅₀/мл \pm SD на 4–5-е сутки после заражения.

Проведение биологической пробы

Схема эксперимента представлена в разделе «Материалы и методы».

⁶Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу африканской чумы свиней иммунопероксидазным методом / А.С. Першин, Т.Н. Комова, А.Р. Шотин [и др.] ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2020. – 12 с.

⁷Инструкция по применению тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции (обновление от 19.05.2021)

Результаты термометрии и параллельных исследований проб крови от животных методами ПЦР-РВ, ТФ-ИФА, ИПМ представлены на **рисунках 1–3**.

Как видно из рисунков 1–3, ректальную температуру тела выше 40,0 °С у зараженных свиней детектировали начиная с 4–13 д.п.з. и с 12 – у контактных.

Начало виремии у всех животных выявляли начиная с 5-го д.п.з. методом вирусовыделения. При этом у 83% (5 голов) зараженных животных положительные результаты на геном вируса АЧС методом ПЦР-РВ получали при исследовании проб крови начиная с 5-го д.п.з. У зараженной свиньи № 5 и контактных животных положительные результаты при использовании данного метода получены, начиная с 12 суток после начала эксперимента. Максимальный титр виремии в 1-й группе достигал 8,8 lgГАдЕ₅₀/мл, во 2-й группе – 6,3 lgГАдЕ₅₀/мл (**табл. 1**).

Специфические антитела к вирусу АЧС, при использовании набора INgezim PPA Compac обнаруживали в пробах сыворотки крови от зараженного (свинья № 5) и контактного (№ 7) животных на 19-й д.п.з. (за 1–2 дня до гибели), а сомнительный результат был получен в пробе от свиньи № 4 на 12-й д.п.з. При использовании набора ID Screen, African Swine Fever Indirect, Screening Test антитела к вирусу АЧС не детектировали; сомнительный результат был получен при исследовании сыворотки от животного № 7, отобранной на 19-й д.п.з. (положительная в наборе INgezim PPA Compac).

В то же время при использовании ИПМ антитела к вирусу АЧС выявили у животных №№ 4, 5, 7 и 8, начиная с 12–16-го дня после начала эксперимента.

Смерть всех свиней отмечали в течение 10 суток с момента регистрации первых клинических признаков АЧС (**табл. 2**).

Из таблицы 2 видно, что длительность течения болезни (с момента проявления первых клинических признаков) у свиньи № 8 составила 9 суток, у остальных животных – от 6 до 7 суток, что характерно для острой и подострой форм течения болезни [4–7, 9, 32]. У 100% животных отмечали повышение температуры более 41,3 °С, гипорексию, переходящую в анорексию (от незначительного до выраженного истощения). У 7 из 8 (87,5%) свиней наблюдали признаки поражения нервной системы (от апатии до паралича задних конечностей), умеренную гиперемию конъюнктивы и диарею (без признаков развития дегидратации и до водянистой с признаками выраженной дегидратации). У 6 из 8 животных были выявлены цианотичные зоны, занимающие от 1 до 15% поверхности кожи. У контактного и зараженного животных № 8 и № 5 соответственно регистрировали незначительную одышку, а у свиней №№ 1 и 3 единичную рвоту за период наблюдения. Общая сумма набранных баллов при оценке клинических признаков у свиней составила от 10 (свинья № 2) до 19 (свинья № 8).

После регистрации падежа проводили аутопсию каждого животного с отбором проб органов и тканей для их исследования методами ПЦР-РВ и вирусовыделения. Степень патологоанатомических признаков выражали в баллах (**табл. 3**).

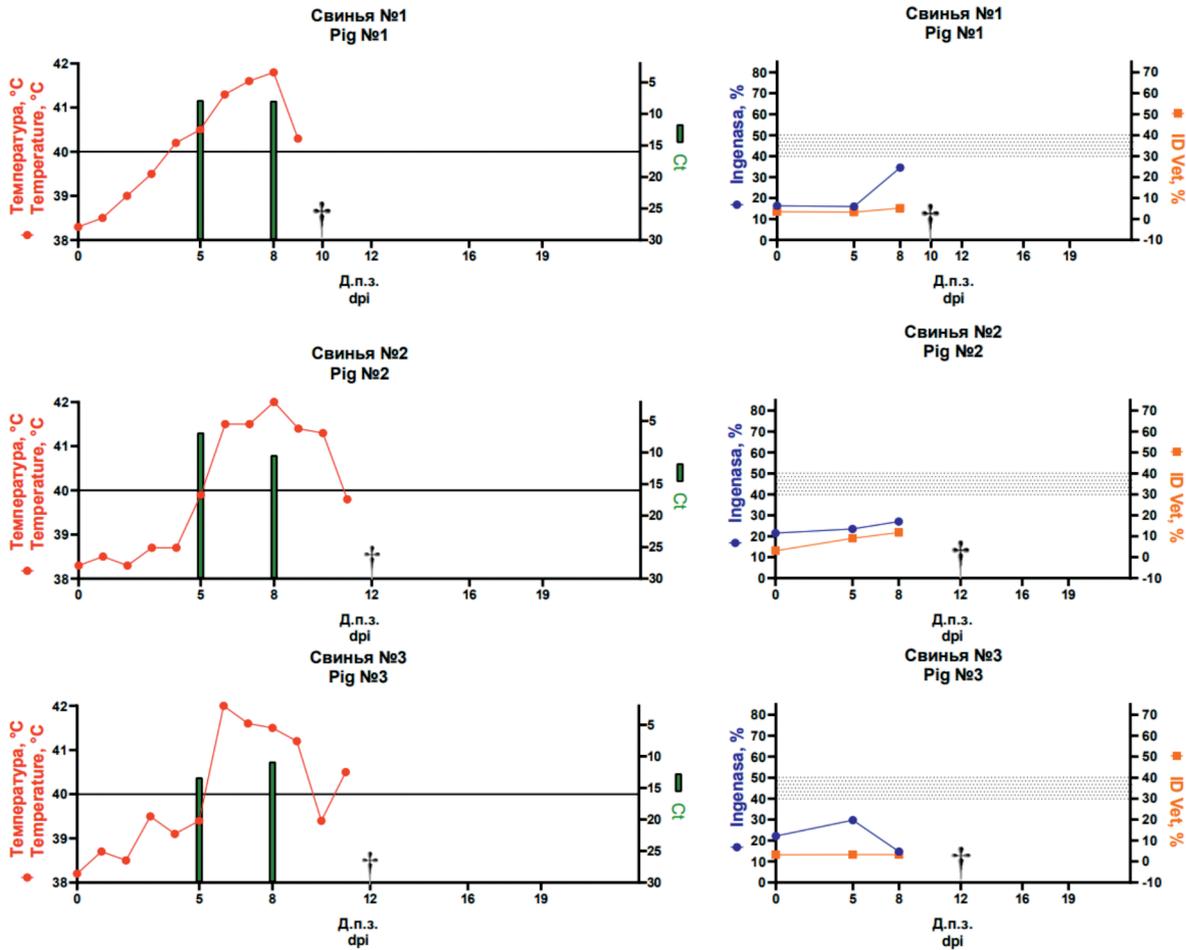


Рис. 1. Показатели термометрии и результаты исследования проб крови зараженных свиней (№№ 1–3) методами ПЦР-РВ и ТФ-ИФА ($n = 3$).

† – даты падежа; горизонтальной линией по оси ординат отмечена граница физиологической нормы температуры (40,0 °C); столбцы показывают значение Ct при постановке ПЦР-РВ.

Fig. 1. Results of body temperature measurements and testing of blood samples from infected pigs (№№ 1–3) by real-time PCR (qPCR) and ELISA ($n = 3$).

Note: † – death date; the horizontal line across the temperature axis marks the limit of the physiological normal body temperature (40.0 °C); the green bars correspond for the qPCR Ct values.

Таблица 1. Результаты исследования проб крови методами ПЦР-РВ и вирусыведения
Table 1. qPCR and virus isolation (VI) results in blood samples

№ свиньи Pig #	5 д.п.з. 5 dpi		8 д.п.з. 8 dpi		12 д.п.з. 12 dpi		16 д.п.з. 16 dpi		19 д.п.з. 19 dpi	
	Ct	T	Ct	T	Ct	T	Ct	T	Ct	T
1	7,8	7,7	7,9	7,7	–	–	–	–	–	–
2	6,9	8,3	10,4	6,4	–	–	–	–	–	–
3	13,3	5,4	10,8	6,3	–	–	–	–	–	–
4	16,7	4,4	12,8	5,5	10,2	6,6	–	–	–	–
5	24,5	2,7	24,3	2,7	18,5	3,9	11,7	5,9	6,1	8,8
6	12,4	5,7	10,5	6,4	–	–	–	–	–	–
7	26,5	2,3	26,3	2,4	15,3	4,8	12,8	5,5	–	–
8	27,1	2,2	отр. neg.	0	19,2	3,8	10,7	6,3	11,6	6

Примечание. Ct – пороговый цикл амплификации; T – титр (IgГАдE₅₀/мл); отр. – отрицательный результат; «–» – не исследовались. Ct ≤ 20 – положительный результат; 20 < Ct ≤ 30 – сомнительный результат; Ct отсутствует – отрицательный результат (геном не обнаружен).

Note. Ct – cycle threshold; T, titer (IgHAD₅₀/ml); neg. – negative result; «–» – not studied. Ct ≤ 20 – positive result; 20 < Ct ≤ 30 – doubtful result; Ct absent – negative result (genome not detected).

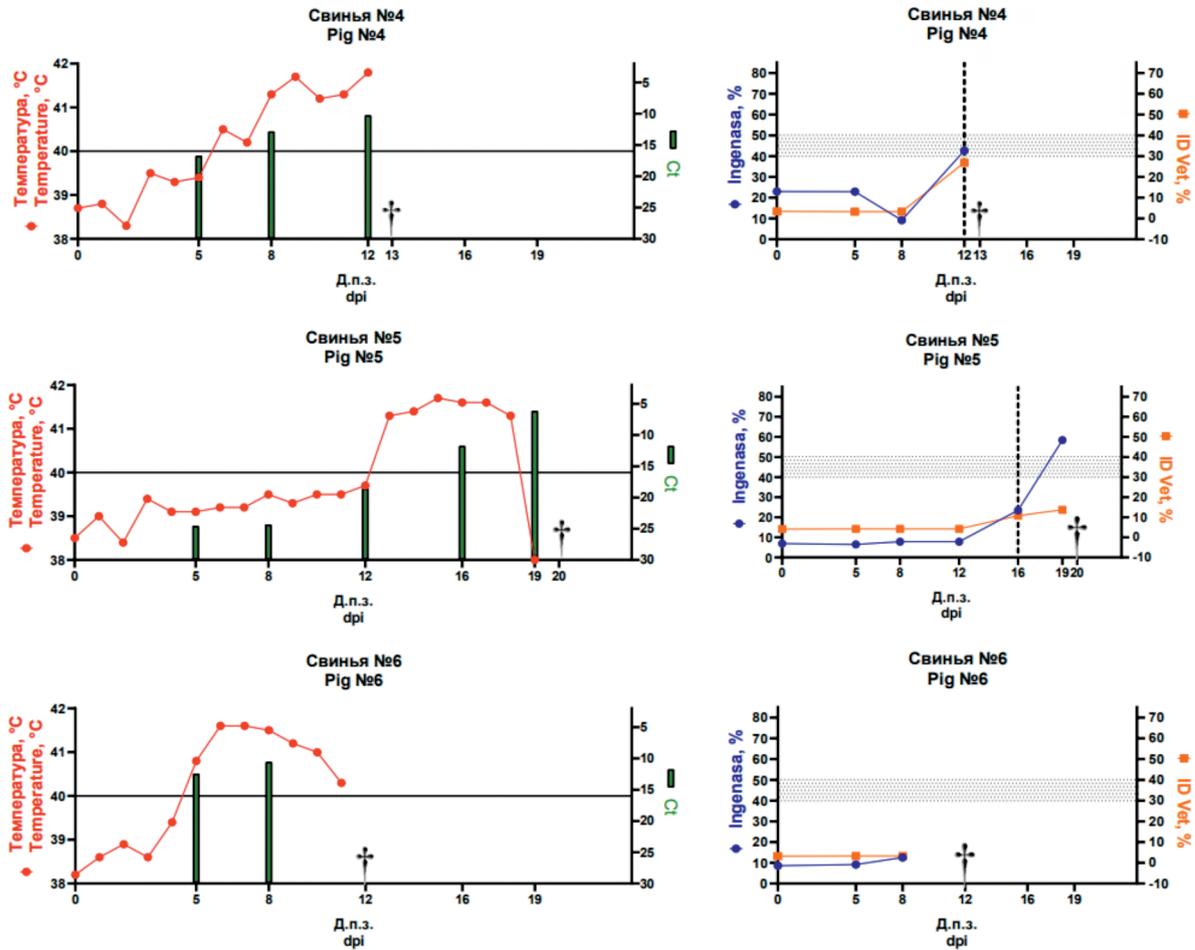


Рис. 2. Показатели термометрии и результаты исследования проб крови зараженных свиней (№№ 4–6) методами ПЦР-РВ, ТФ-ИФА и ИПМ ($n = 3$).

† – даты падежа; горизонтальной линией по оси ординат отмечена граница физиологической нормы температуры (40,0 °C); столбцы показывают значение Ct при постановке ПЦР-РВ; вертикальными пунктирными линиями отмечены даты первого положительного результата в ИПМ.

Fig. 2. Results of body temperature measurements and testing of blood samples from infected pigs (№№ 4–6) by qPCR, ELISA, and IPM ($n = 3$).

† – death date; the horizontal line across the temperature axis marks the limit of the physiological normal body temperature (40.0 °C); the bars correspond to the qPCR Ct values; the vertical dotted line across the dates shows the first positive IPM result.

Таблица 2. Оценка клинических признаков
Table 2. Assessment of clinical signs

Группа Group	№ свиной Pig#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Зараженные Infected	№ 1	4	.	.	.	4	4	6	6	8	16	†											
	№ 2	4	7	6	9	10	12	10	†									
	№ 3	4	7	6	6	8	10	17	†									
	№ 4	4	4	4	6	7	10	13	14	†								
	№ 5	4	5	8	9	9	12	12	14	†	
	№ 6	4	5	6	6	8	10	13	13	†								
Контактные Contact	№ 7	6	7	14	15	15	16	†			
	№ 8	5	6	15	17	18	18	19	19	19	†

Примечание. † – дата падежа; 4 – дата заражения.

Note. † – death date; 4 – infection date.

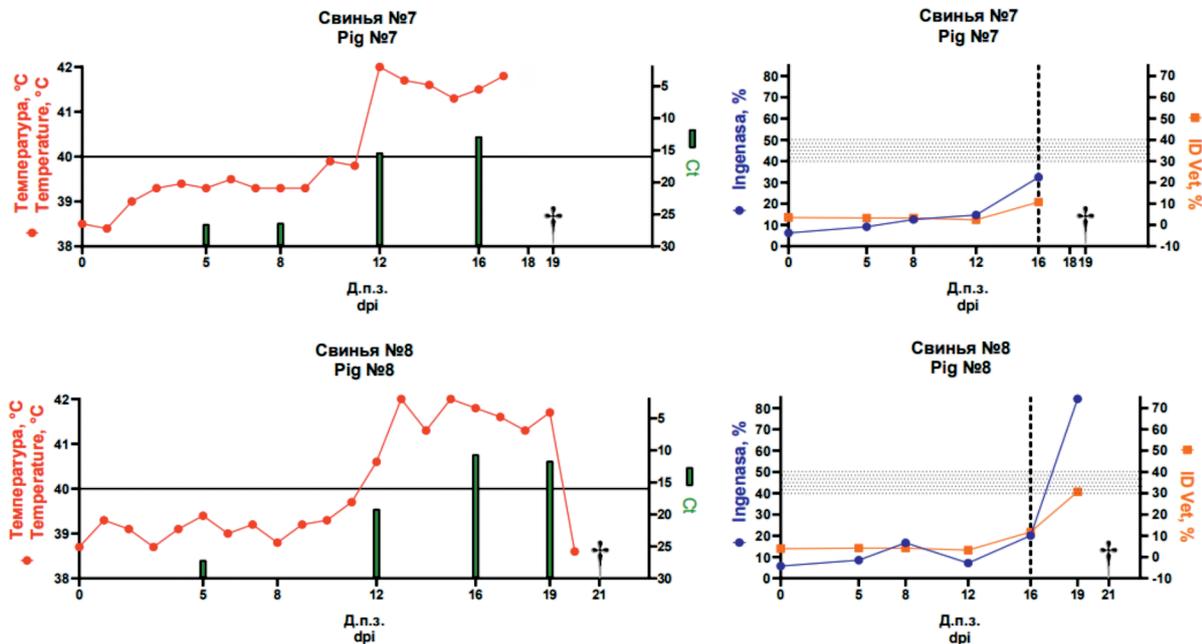


Рис. 3. Показатели термометрии и результаты исследования проб крови контактных свиней (№№ 7, 8) методами ПЦР-РВ, ТФ-ИФА и ИПМ ($n = 3$).

† – даты падежа; горизонтальной линией по оси ординат отмечена граница физиологической нормы температуры (40,0 °C); столбцы показывают значение Ct при постановке ПЦР-РВ; вертикальными пунктирными линиями отмечены даты первого положительного результата в ИПМ.

Fig. 3. Results of body temperature measurements and testing of blood samples from infected pigs (№№ 7, 8) by qPCR, ELISA, and IPM ($n = 3$)

† – death date; the horizontal line across the temperature axis marks the limit of the physiological normal body temperature (40.0 °C); the bars correspond for the qPCR Ct values; the vertical dotted line across the dates shows the first positive IPM result.

Из данных таблицы 3 видно, что сумма баллов, полученная при оценке тяжести проявления патолого-анатомических изменений, составляла в диапазоне от 23 до 42 баллов. Наиболее характерные изменения регистрировали в селезенке (кровенаполнение от умеренного до выраженного, от незначительной до выраженной гиперплазия), лимфатических узлах (до значительной гиперплазии, сопровождающейся геморрагическим лимфаденитом) и почках (развитие обширного геморрагического диатеза).

Помимо вышеназванных патологоанатомических изменений, отмечали отек легких, пневмонию разной степени тяжести, кровоизлияния под плеврой и в слизистой оболочке желчного пузыря, зернистую дистрофию печени, кровоизлияния в слизистой оболочке мочевого пузыря, а также признаки плеврита и перитонита.

Значения Ct и титра вируса в пробах органов и тканей от каждого из животных, полученные с помощью методов ПЦР-РВ и вирусовыделения, представлены в **таблице 4**.

Как видно из данных таблицы 4, вирус АЧС и его геном обнаружены при исследовании всех проб органов. Среднее значение титра вируса в образцах органов и тканей в среднем составило $5,8 \pm 1,27 \text{ IgГАдE}_{50}/\text{мл}$ ($n = 64$) ($5,95 \pm 1,33$ для зараженных и $5,2 \pm 0,88$ для контактных). Самые высокие средние значения

титра получены при исследовании проб селезенки ($7,4 \pm 0,69 \text{ ГАдE}_{50}/\text{мл}$), а самые низкие – при исследовании проб печени ($5,0 \pm 1,18 \text{ ГАдE}_{50}/\text{мл}$) и тканей колена ($5,01 \pm 0,87 \text{ ГАдE}_{50}/\text{мл}$).

Секвенирование маркерных областей генома

Изменения нуклеотидных последовательностей в изучаемом и импортных из системы GenBank изолятах, а также их сводная группировка представлены в приложении.

Как и ожидалось, анализ последовательности С-концевого участка гена *B646L* изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 позволил установить его 100%-ную гомологию с референтным штаммом Georgia 2007/1 (FR682468.2), в связи с чем изучаемый изолят был отнесен ко II генотипу.

На основе нуклеотидной последовательности участка CVR гена *B602L* (100%-ная идентичность с референт-штаммом Georgia 2007/1) исследуемый изолят был отнесен к самой многочисленной I субгруппе, включающей изоляты выделенные на территории Московской, Калининградской и Амурской областей, Забайкальского и Приморского краев, республик Кабардино-Балкария и Адыгея Российской Федерации, а также в Польше, Литве, Молдове, Бельгии, Украине, Германии, Венгрии, Чехии, Китае, Вьетнаме и Индии.

Таблица 3. Оценка степени патологоанатомических изменений

Table 3. Scoring of post-mortem lesions

№ свиный Pig #	Легкие Lungs			Сердце Heart		Селезенка Spleen		Лимфоузлы Lymph nodes			Печень Liver		Почки Kidneys			Мочевой пузырь Bladder	Трансудат Transudate		Сумма: Total:
	Отеки Edema	Пневмония Pneumonia	Кровоизлияния под плеврой Hemorrhages under the pleura	Геморрагический диатез, дистрофия Hemorrhagic diathesis, dystrophy	Трансудат в перикардальной полости Transudate in the pericardial cavity	Кровенаполнение Blood filling	Спленомегалия Splenomegaly	Подчелюстные Submandibular	Брыжеечные Mesenteric	Паховые Inguinal	Гепатопатия Hepatopathy	Желчевыводящие пути Biliary tract	Геморрагический диатез в корковом и мозговом веществе Hemorrhagic diathesis in the cortical and cerebral substance	Субкапсулярные геморрагии Subcapsular hemorrhages	Кровоизлияния в почечной лоханке Hemorrhages in the renal pelvis	Геморрагический диатез в слизистой оболочке Hemorrhagic diathesis in the mucous membrane	Грудная полость Chest cavity	Брюшная полость Abdominal cavity	
№1	2	3	1	3	1	3	2	3	3	2	3	1	3	3	2	2	2	1	40
№2	1	1	1	1	1	3	3	3	3	2	1	0	2	1	2	1	0	0	26
№3	2	2	1	1	3	3	3	2	3	1	0	1	3	3	3	1	3	3	38
№4	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	3	3	3	2	2	1	31
№5	2	2	1	3	1	3	3	3	3	2	2	1	3	3	2	1	2	2	39
№6	1	1	1	2	2	2	2	3	3	2	0	1	3	3	3	1	1	1	32
№7	2	3	1	3	3	3	3	3	3	2	1	1	3	3	2	1	3	2	42
№8	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	0	2	2	2	1	0	0	23
Сумма: Total:	12	15	8	16	14	21	19	21	22	13	19	6	22	21	19	10	13	10	271

Примечание. Баллами отмечена тяжесть патологоанатомических изменений, где 0 – их отсутствие, а 3 – самая тяжелая степень. 0 баллов отмечены зеленым цветом, 1 балл – желтым, 2 балла – оранжевым, 3 балла – красным.

Note. Scoring scale from 0 to 3 is used to indicate the severity of pathological changes, where 0 indicates absence of any pathological changes and 3 indicates the highest degree. 0 is marked green, 1 – yellow, 2 – orange, 3 – red.

Таблица 4. Результаты исследования проб органов и тканей методами ПЦР-РВ и вирусовыделения (n = 3)

Table 4. qPCR and virus isolation (VI) results of samples after necropsy (n = 3)

Образец Sample	Показатель Parameter	№ свиный Pig #							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Почка Kidney	Ct	18,27	12,24	8,66	13,36	12,28	14,46	12,1	16,62
	T	4	5,7	7,3	5,4	5,7	5	5,8	4,4
Печень Liver	Ct	13,43	13,07	9,59	21,93	12,39	18,19	12,46	18,18
	T	5,3	5,4	6,8	3,2	5,7	4	5,7	4
Л/у брыжеечные Mesenteric lymph nodes	Ct	18,47	11,53	6,53	18,2	9,28	14,02	14	17,36
	T	3,9	6	8,5	4	7	5,1	5,1	4,2
Легкое Lungs	Ct	12,55	13,15	7,47	17,56	10,06	10,96	11,3	13,1
	T	5,6	5,4	7,9	4,1	6,6	6,2	6,1	5,4
Селезенка Spleen	Ct	7,89	6,38	7,8	9,86	7,69	8,77	9,32	10,36
	T	7,7	8,6	7,7	6,7	7,8	7,2	6,9	6,5
Ткани колена Knee fabrics	Ct	16,46	12,79	11,32	15,46	18,41	11,44	18,04	13,34
	T	4,4	5,5	6,1	4,7	3,9	6	4	5,4
Л/у подчелюстные Submandibular lymph nodes	Ct	10,77	8,29	9,61	15,26	9,23	12,51	12	15,75
	T	6,3	7,4	6,8	4,8	7	5,6	5,8	4,6
Л/у паховые Inguinal lymph nodes	Ct	10,64	7,64	9,4	15,93	10,38	12,56	13,99	15,8
	T	6,4	7,8	6,9	4,6	6,5	5,6	5,1	4,6

Примечание. Ct – пороговый цикл амплификации; T – титр вирусии (lgГАдE₅₀/мл).

Note. Ct – cycle threshold; T – titer of viremia (lgHAU₅₀/ml).

Проведенный анализ IGR I73R/I329L позволил обнаружить дополнительный TRS из 10 нуклеотидов (GGAATATATA) к существующим 2 копиям TRS, которые встречаются в геноме вируса АЧС Georgia 2007/1, таким образом изучаемый изолят относится к группе IGR-2.

При анализе нуклеотидных последовательностей 5 альтернативных генетических маркеров (O174L, K145R, EP402R, I267L и MGF 505-5R), которые также используются в качестве мишеней для дифференциации изолятов вируса АЧС внутри одного генотипа, установили:

1. На основании гена *O174L* изолят ASF/Tatarstan 20/WB-12276, как и референтный штамм Georgia 2007/1, отнесены к 1-й группе.

2. Секвенирование гена *K145R* у исследуемого изолята позволило классифицировать его к первому кластеру совместно со штаммом Georgia 2007/1.

3. Последовательность гена *EP402R* оказалась идентичной для всех изолятов, в том числе исследуемого.

4. Изолят ASF/Tatarstan 20/WB-12276 имеет замену «Т» на «А» в положении 76 гена *I267L*, по отношению к референтной последовательности штамма Georgia 2007/1, что соответствует второму кластеру;

5. Исследуемый изолят не имеет изменений в гене *MGF 505-5R* в сравнении с Georgia 2007/1 и относится к I субгруппе по данному признаку.

Обсуждение

Наблюдаемая при экспериментальном заражении домашних свиней клиническая и патологоанатомическая картины болезни позволяют охарактеризовать изолят вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276 как высоковирулентный, способный вызывать АЧС у свиней с острым и подострым течением и гибелью до 100% зараженных внутримышечно и контактным путем животных, что сходно с клинической картиной, характерной для изученных изолятов вируса АЧС, выделенных на территории России в 2007–2018 гг., обладавших 100% летальностью для свиней [4–11].

В работе В.М. Балышева и соавт. представлены данные об изоляте вируса АЧС «Татарстан-Сосновка/2016», выделенного из биологического материала от домашней свиньи в Республике Татарстан в 2016 г., который был охарактеризован как вирулентный и способный вызывать гибель животных с признаками острого и сверхострого течения АЧС [4]. Данный изолят вызывал гибель внутримышечно и контактно инфицированных свиней на 4–6-й и 10–13-й д.п.з. соответственно.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать предположение о некотором снижении вирулентных свойств изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 при его сравнении с предыдущим (в частности, увеличение инкубационного периода и длительности течения болезни). Однако различие в полученных результатах также может быть обосновано разными способами заражения экспериментальных животных. Так, В.М. Балышев и соавт. для заражения использовали 10%-ную суспензию, приготовленную из органо-тканевого материала, в то время как в нашей работе была исполь-

зована суспензия культурального материала с дозой заражения 10 ГАД₅₀/гол. [4].

С помощью ПЦР-РВ было выявлено 100% инфицированных изолятом ASF/Tatarstan 20/WB-12276 животных, а первые положительные результаты при исследовании проб данным методом были получены начиная с 5-го и 12-го д.п.з. в группах зараженных и контактных свиней соответственно.

Использование ИПМ позволило выявить специфические антитела к вирусу АЧС начиная с 12-го и 16-го д.п.з. Аналогичные данные получены А. Pershin и соавт. при изучении биологических свойств изолятов вируса АЧС, происходящих из разных регионов РФ в 2013–2018 гг., где доля обнаружения специфических антител была выше при исследовании проб сыворотки крови от контактных животных, чем от инфицированных внутримышечно, и составила 100% (2 из 2 голов) и 33% (2 из 6 голов) соответственно [8].

При использовании ТФ-ИФА положительные результаты были получены при исследовании только двух образцов сыворотки (по одной от зараженного и контактного животных), что может быть связано с преимущественно быстрой гибелью зараженных свиней (до 13 д.п.з.) и меньшей чувствительностью данного метода диагностики, по сравнению с ИПМ [33–36].

Исследование методом ПЦР-РВ рекомендованных Всемирной организацией здоровья животных (селезенка, легкие, почки, лимфатические узлы) и альтернативных образцов (ткани колена) позволило выявить 100% инфицированных животных [37]. Однако при исследовании пробы печени от одного животного был получен сомнительный результат, что было связано с низкой вирусной нагрузкой в ткани данного органа (титр вируса составил 3,2 ГАД₅₀/мл).

Секвенирование генома исследуемого изолята по наиболее значимым (С-концевой участок гена *B646L*, CVR гена *B602L*, межгенная область IGR I I73R/I329L) и альтернативным (*O174L*, *K145R*, *EP402R*, *I267L*, *MGF 505-5R*) геномным маркерам показало, что ASF/Tatarstan 20/WB-12276 имеет сходную характеристику с референс-штаммом Georgia 2007/1 и другими изолятами, выделенными на территории РФ, за исключением вариантов, циркулирующих в Калининградской области.

Использование последовательностей гена *EP402R*, С-концевого участка гена *B646L* и CVR гена *B602L* обладало низкой разрешающей способностью. Так, все изоляты (за исключением вируса из Ульяновской области РФ) обладали 100%-ной гомологией с референтным штаммом Georgia 2007/1.

В зависимости от числа TRS из 10 нуклеотидов (GGAATATATA) в IGR I73R/I329L, используемые изоляты вируса АЧС II генотипа разделяются на 4 группы:

1-я группа – изоляты, содержащие 2 TRS (напр. Georgia 2007/1);

2-я группа – 3 TRS, характерные для подавляющего числа Европейских и Азиатских изолятов, в том числе и ASF/Tatarstan 20/WB-12276;

3-я группа – представлена изолятом из КНР (China/Guangxi/2019), содержащим 4 TRS;

4-я группа – изоляты из Польши, содержащие 5 TRS [25, 26].

Наличие «А» в положении 76 гена *I267L* у изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 позволило отнести его ко 2-й, преобладающей группе.

Изменения в генах *O174L*, *K145R* и *MGF 505-5R* были зафиксированы у некоторых вирусов из Германии, Польши, Украины и Калининградской области РФ, в то время как у большинства остальных изолятов, в том числе изучаемого, изменения отсутствовали.

TRS из 14 п.н. (TCACTACTGAAAAA) в положении 50–63 гена *O174L* обнаружена у изолятов, циркулирующих на территории Польши (2017–2019 гг.) и Германии (2020 г.).

Замены «С» на «А» в положении 173 гена *K145R* и «G» на «А» в положении 84 гена *MGF 505-5R* обнаружены для изолятов из Польши (2016–2019 гг.), Украины (2016 г.), Германии (2020 г.) и Калининградской области РФ (2017–2019 гг.). Замена «С» на «Т» в положении 30 гена *K145R* – только для изолятов из Калининградской области РФ (2017–2019 гг.).

Таким образом, анализ по выбранным маркерам показал генетическое родство изучаемого изолята ASF/Tatarstan 20/WB-12276 с большинством изолятов из Европы и Азии, выделенными за период с 2017 по 2020 г.

Выводы

Впервые изучены молекулярно-биологические свойства изолята вируса АЧС ASF/Tatarstan 20/WB-12276, выделенного из селезенки от отстрелянного дикого кабана на территории Республики Татарстан. Изолят охарактеризован как высоковирулентный, способный вызывать острую и подострую форму течения инфекции. Летальность у зараженных животных составила 100%.

Подтверждена первостепенная важность проведения пассивного эпизоотологического надзора с регулярным отбором и исследованием строго рекомендованных проб от всех животных с признаками болезни с исследованием образцов прямыми методами диагностики (обнаружение вируса, его генома, антигена) [38].

Однако, в случаях, когда вирус АЧС циркулирует в восприимчивой популяции длительное время (например, более полугодом), прямые методы исследований рационально дополнять косвенными (на обнаружение антител), в первую очередь при исследовании проб от отловленных и отстрелянных диких кабанов.

На основе анализа нуклеотидных последовательностей IGR I73R/I329L изолятов вируса АЧС, вариант ASF/Tatarstan 20/WB-12276 отнесли к группе IGR-2. Дифференциальный анализ по генетическому маркеру в гене *I267L* (замена тимина на аденин в положении 76 настоящего гена, относительно последовательности референтного штамма Georgia 2007/1), позволил отнести изучаемый изолят к группе I267L-2. При анализе 7 остальных генетических маркеров (в генах *EP402R*, *O174L*, *K145R*, *MGF 505-5R*, *C* – конце гена *B646L* и *CVR*) изменения обнаружены не были [28].

Таким образом, с целью дифференциации и изучения дальнейшей динамики молекулярной эволюции циркулирующих на территории РФ, в том числе Республики Татарстан, изолятов вируса АЧС, необходимо направлять образцы, оказавшиеся положительными или сомнительными при их исследовании в региональных лабораториях, в референтную лабораторию по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» для подтверждения диагноза и проведения научно-исследовательских работ методом секвенирования наиболее значимых и альтернативных в молекулярно-эпизоотологическом отношении генов с проведением последующего филогенетического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иголкин А.С., Караулов А.К., Груздев К.Н. Африканская чума свиней, 2020 г. В кн.: *Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. Том 82. М.*; 2021: 58–64. <https://doi.org/10.31016/view-2021-18-8>
2. Шотин А.Р., Жуков И.Ю., Першин А.С., Мазлум А., Шевченко И.В., Иголкин А.С. и др. Влияние условий хранения сыровороток крови свиней на выявление антител к вирусу АЧС методом ИФА. *Ветеринария сегодня*. 2021; (3): 216–23. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2021-3-38-216-223> <https://elibrary.ru/sfvomt>
3. Шотин А.Р., Иголкин А.С., Мазлум А., Шевченко И.В., Бардина Н.С., Морозова Е.О. и др. Африканская чума свиней в Приморском крае: эпизоотическая ситуация и молекулярно-биологические свойства изолята, выделенного из трубчатой кости от дикого кабана. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11(4): 347–58. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-347-358> <https://elibrary.ru/uhggjy>
4. Балышев В.М., Власов М.Е., Имадинов А.Р., Титов И.А., Моргунов С.Ю., Малооголовкин А.С. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика вируса африканской чумы свиней, выделенного в 2016–2017 гг. в различных регионах Российской Федерации. *Российская сельскохозяйственная наука*. 2018; (4): 54–7. <https://doi.org/10.31857/S250026270000536-4> <https://elibrary.ru/yamjtn>
5. Болгова М.В., Моргунов Ю.П., Васильев А.П., Балышев В.М. Биологические свойства изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных в Российской Федерации в 2012 г. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2013; (4): 26–30. <https://elibrary.ru/trpxxf>
6. Власов М.Е., Сибгатуллова А.К., Балышев В.М. Особенности течения африканской чумы у свиней, инфицированных изолятами вируса АЧС, выделенными в Российской Федерации. *Ветеринария*. 2019; (4): 15–9. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2019.22.4.15-19> <https://elibrary.ru/eohxkh>
7. Власов М.Е. Клинические проявления болезни и патологоанатомические изменения у свиней, инфицированных изолятами вируса АЧС, выделенными от кабанов. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2017; (134): 1055–65. <https://doi.org/10.21515/1990-4665-134-086> <https://elibrary.ru/ynwynm>
8. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloun A., Aronova E., et al. A long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci*. 2019; 6(4): 99. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040099> <https://elibrary.ru/eybfvu>
9. Ремыга С.Г., Першин А.С., Шевченко И.В., Иголкин А.С., Шевцов А.А. Клинические и патологоанатомические изменения у диких европейских кабанов и домашних свиней при заражении вирусом африканской чумы свиней. *Ветеринария сегодня*. 2016; (3): 46–51. <https://elibrary.ru/wvrlmf>
10. Жуков И.Ю. *Биологические свойства изолятов вируса африканской чумы свиней и особенности течения болезни при экспериментальном заражении*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Владимир; 2018.
11. Шевченко И.В. *Биологические свойства и анализ полных геномов российских изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных в 2013–2014 гг.*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук.

- Владимир; 2017.
- Events management / WAHIS / <https://wahis.woah.org/#/event-management> (дата обращения: 06.02.2022).
 - Desmecht D., Gerbier G., Gortázar Schmidt C., Grigaliuniene V., Helyes G., Kantere M., et al. Epidemiological analysis of African swine fever in the European Union (September 2019 to August 2020). *EFSJ J.* 2021; 19(5): e06572. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6572>
 - Караулов А.К., Шевцов А.А., Петрова О.Н., Коренной Ф.И., Гуленкин В.М. Эпизоотия АЧС на территории Российской Федерации: прогноз развития ситуации на 2021 год и рекомендации по мерам ее сдерживания. *БИО.* 2021; (2): 14–21. <https://elibrary.ru/jqnqdk>
 - Петрова О.Н., Коренной Ф.И., Караулов А.К. Эпизоотия африканской чумы свиней на территории Российской Федерации: оценка ущерба на основании обобщенных данных об эпизоотической ситуации за 2007–2020 гг. *БИО.* 2021; (3): 18–22. <https://elibrary.ru/afppww>
 - Mazloun A., van Schalkwyk A., Chernyshev R., Igolkin A., Heath L., Sprygin A. A guide to molecular characterization of genotype II African swine fever virus: essential and alternative genome markers. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 642. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030642>
 - Vilem A., Nurmoja I., Niine T., Riit T., Nieto R., Viltrop A., et al. Molecular characterization of African swine fever virus isolates in Estonia in 2014–2019. *Pathogens.* 2020; 9(7): 582. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070582>
 - Phologane S.B., Bastos A.D., Penrith M.L. Intra- and inter-genotypic size variation in the central variable region of the 9RL open reading frame of diverse African swine fever viruses. *Virus Genes.* 2005; 31(3): 357–60. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-3254-z>
 - Nix R.J., Gallardo C., Hutchings G., Blanco E., Dixon L.K. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol.* 2006; 151(12): 2475–94. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
 - Rowlands R.J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Vosloo W., et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(12): 1870–4. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080591>
 - Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes.* 2009; 38(1): 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
 - Lubisi B.A., Bastos A.D., Dwarka R.M., Vosloo W. Intra-genotypic resolution of African swine fever viruses from an East African domestic pig cycle: a combined p72-CVR approach. *Virus Genes.* 2007; 35(3): 729–35. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0148-2>
 - Sidi M., Zerbo H.L., Ouoba B.L., Settypalli T.B.K., Bazimo G., Ouandaogo H.S., et al. Molecular characterization of African swine fever viruses from Burkina Faso, 2018. *BMC Vet. Res.* 2022; 18(1): 69. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03166-y>
 - Mazloun A., Van Schalkwyk A., Chernyshev R., Shotin A., Korennoy F.I., Igolkin A., et al. Genetic characterization of the central variable region in African swine fever virus isolates in the Russian Federation from 2013 to 2017. *Pathogens.* 2022; 11(8): 919. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080919> <https://elibrary.ru/ojluot>
 - Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juskiewicz M., Woźniakowski G. The spillover of African swine fever in western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L genomic sequences. *Viruses.* 2020; 12(10): 1094. <https://doi.org/10.3390/v12101094>
 - Shi K., Liu H., Yin Y., Si H., Long F., Feng S. Molecular characterization of African swine fever virus from 2019–2020 outbreaks in Guangxi province, Southern China. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9: 912224. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.912224>
 - Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G. The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol.* 2019; 164(6): 1667–72. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x>
 - Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Zinyakov N., Igolkin A., Chernyshev R., et al. Whole-genome sequencing of African swine fever virus from wild boars in the Kaliningrad region reveals unique and distinguishing genomic mutations. *Front. Vet. Sci.* 2023; 9: 1019808. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1019808>
 - Mazloun 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> <https://elibrary.ru/mwsggz>
 - Zhang Y., Ke J., Zhang J., Yue H., Chen T., Li Q., et al. I267L is neither the virulence- nor the replication-related gene of African swine fever virus and its deletant is an ideal fluorescent-tagged virulence strain. *Viruses.* 2021; 14(1): 53. <https://doi.org/10.3390/v14010053>
 - 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>
 - Балышев В.М., Куриннов В.В., Цыбанов С.Ж., Калантаенко Ю.Ф., Колбасов Д.В., Пронин В.В. и др. Биологические свойства вируса африканской чумы свиней, выделенного в Российской Федерации. *Ветеринария.* 2010; (7): 25–7. <https://elibrary.ru/msrezn>
 - Gallardo M.C., Reoyo A.T., Fernández-Pinero J., Iglesias I., Muñoz M.J., Arias M.L. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manag.* 2015; 1: 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
 - Gallardo C., Fernández-Pinero J., Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res.* 2019; 271: 197676. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197676>
 - Gap Analysis Report. Global African Swine Fever; 2018. Available at: <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/np103/Symposium-WorkshopsMeetings/GARA%20Gap%20Analysis%20Report%202018%2011-11-18.pdf>
 - Mur L., Igolkin A., Varentsova A., Pershin A., Remyga S., Shevchenko I., et al. Detection of African swine fever antibodies in experimental and field samples from the Russian Federation: implications for control. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(5): e436–40. <https://doi.org/10.1111/tbed.12304> <https://elibrary.ru/xslmnr>
 - OIE Terrestrial Manual. Chapter 3.8. 1. African swine fever (infection with African swine fever virus). OIE; 2019.
 - Gervasi V., Marcon A., Bellini S., Guberti V. Evaluation of the efficiency of active and passive surveillance in the detection of African swine fever in wild boar. *Vet. Sci.* 2019; 7(1): 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci70100055>

REFERENCES

- Igolkin A.S., Karaulov A.K., Gruzdev K.N. African swine fever, 2020 In: *Proceedings of the All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Y.R. Kovalenko. Volume 82 [Trudy Vserossiyskogo NII eksperimental'noy veterinarii im. Ya.R. Kovalenko. Tom 82]*. Moscow; 2021: 58–64. <https://doi.org/10.31016/viev-2021-18-8> (in Russian)
- Shotin A.R., Zhukov I.Yu., Pershin A.S., Mazloun A., Shevchenko I.V., Igolkin A.S., et al. Effect of pig serum storage conditions on detection of anti-ASFV antibodies by ELISA. *Veterinariya segodnya.* 2021; (3): 216–23. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2021-3-38-216-223> <https://elibrary.ru/sfvomt> (in Russian)
- Shotin A.R., Igolkin A.S., Mazloun A., Shevchenko I.V., Bardina N.S., Morozova E.O., et al. African swine fever in the Primorsky Krai: disease situation and molecular and biological properties of the isolate recovered from a wild boar long bone. *Veterinariya segodnya.* 2022; 11(4): 347–58. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-347-358> <https://elibrary.ru/uhggjy> (in Russian)
- Balyshev V.M., Vlasov M.E., Imatdinov A.R., Titov I.A., Morgunov S.Yu., Malogolovkin A.S. Biological properties and molecular genetic characteristics of the African swine fever virus, isolated in 2016–2017 in various regions of the Russian Federation. *Rossiyskaya sel'skokhozyaystvennaya nauka.* 2018; (4): 54–7. <https://doi.org/10.31857/S250026270000536-4> <https://elibrary.ru/yamjtn> (in Russian)
- Bolgova M.V., Morgunov Yu.P., Vasil'ev A.P., Balyshev V.M. Biological characteristics of African swine fever virus isolates detected in the Russian Federation in 2012. *Aktual'nye voprosy veterinarnoy biologii.* 2013; (4): 26–30. <https://elibrary.ru/rppyx> (in Russian)

6. Vlasov M.E., Sibgatullova A.K., Balyshv V.M. The course of disease in pigs infected with ASF virus isolates, obtained in different regions of the Russian Federation. *Veterinariya*. 2019; (4): 15–9. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2019.22.4.15-19> <https://elibrary.ru/eohxkh> (in Russian)
7. Vlasov M.E. Clinical manifestations and disease pathological changes in pigs infected with ASF virus isolates from wild boars. *Politematicheskii setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2017; (134): 1055–65. <https://doi.org/10.21515/1990-4665-134-086> <https://elibrary.ru/ynwynm> (in Russian)
8. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloum A., Aronova E., et al. A long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci*. 2019; 6(4): 99. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040099> <https://elibrary.ru/eybfvu>
9. Remyga S.G., Pershin A.S., Shevchenko I.V., Igolkin A.S., Shevtsov A.A. Clinical and post-mortem signs in European wild boars and domestic pigs infected with African swine fever virus. *Veterinariya segodnya*. 2016; (3): 46–51. <https://elibrary.ru/wwrlmf> (in Russian)
10. Zhukov I.Yu. *Biological properties of African swine fever virus isolates and features of the course of the disease during experimental infection*: Diss. Vladimir; 2018. (in Russian)
11. Shevchenko I.V. *Biological properties and analysis of complete genomes of Russian isolates of African swine fever virus isolated in 2013-2014*: Diss. Vladimir; 2017. (in Russian)
12. Events management / WAHIS / <https://wahis.woah.org/#/event-management> (дата обращения: 06.02.2022)
13. Desmecht D., Gerbier G., Gortázar Schmidt C., Grigaliuniene V., Heyles G., Kantere M., et al. Epidemiological analysis of African swine fever in the European Union (September 2019 to August 2020). *EFSA J*. 2021; 19(5): e06572. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6572>
14. Karaulov A.K., Shevtsov A.A., Petrova O.N., Korennoy F.I., Gulenkin V.M. ASF epizootics on the territory of the Russian Federation: forecast of the situation for 2021 and recommendations on measures to contain it. *BIO*. 2021; (2): 14–21. <https://elibrary.ru/jnqndk> (in Russian)
15. Petrova O.N., Korennoy F.I., Karaulov A.K. Epizootics of African swine fever in the territory of the Russian Federation: damage assessment based on generalized data on the epizootic situation for 2007–2020. *BIO*. 2021; (3): 18–22. <https://elibrary.ru/afppww> (in Russian)
16. Mazloum A., van Schalkwyk A., Chernyshev R., Igolkin A., Heath L., Sprygin A. A guide to molecular characterization of genotype II African swine fever virus: essential and alternative genome markers. *Microorganisms*. 2023; 11(3): 642. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030642>
17. Vilem A., Nurmoja I., Niine T., Riit T., Nieto R., Viltrop A., et al. Molecular characterization of African swine fever virus isolates in Estonia in 2014–2019. *Pathogens*. 2020; 9(7): 582. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070582>
18. Phologane S.B., Bastos A.D., Penrith M.L. Intra- and inter-genotypic size variation in the central variable region of the 9RL open reading frame of diverse African swine fever viruses. *Virus Genes*. 2005; 31(3): 357–60. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-3254-z>
19. Nix R.J., Gallardo C., Hutchings G., Blanco E., Dixon L.K. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol*. 2006; 151(12): 2475–94. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
20. Rowlands R.J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Vosloo W., et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis*. 2008; 14(12): 1870–4. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080591>
21. Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*. 2009; 38(1): 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
22. Lubisi B.A., Bastos A.D., Dwarka R.M., Vosloo W. Intra-genotypic resolution of African swine fever viruses from an East African domestic pig cycle: a combined p72-CVR approach. *Virus Genes*. 2007; 35(3): 729–35. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0148-2>
23. Sidi M., Zerbo H.L., Ouoba B.L., Settypalli T.B.K., Bazimo G., Ouandaogo H.S., et al. Molecular characterization of African swine fever viruses from Burkina Faso, 2018. *BMC Vet. Res*. 2022; 18(1): 69. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03166-y>
24. Mazloum A., Van Schalkwyk A., Chernyshev R., Shotin A., Korennoy F.I., Igolkin A., et al. Genetic characterization of the central variable region in African swine fever virus isolates in the Russian Federation from 2013 to 2017. *Pathogens*. 2022; 11(8): 919. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080919> <https://elibrary.ru/ojluot>
25. Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juskiewicz M., Woźniakowski G. The spillover of African swine fever in western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L genomic sequences. *Viruses*. 2020; 12(10): 1094. <https://doi.org/10.3390/v12101094>
26. Shi K., Liu H., Yin Y., Si H., Long F., Feng S. Molecular characterization of African swine fever virus from 2019–2020 outbreaks in Guangxi province, Southern China. *Front. Vet. Sci*. 2022; 9: 912224. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.912224>
27. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G. The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol*. 2019; 164(6): 1667–72. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x>
28. Mazloum A., van Schalkwyk A., Shotin A., Zinyakov N., Igolkin A., Chernyshev R., et al. Whole-genome sequencing of African swine fever virus from wild boars in the Kaliningrad region reveals unique and distinguishing genomic mutations. *Front. Vet. Sci*. 2023; 9: 1019808. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1019808>
29. 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> <https://elibrary.ru/mwsggz>
30. Zhang Y., Ke J., Zhang J., Yue H., Chen T., Li Q., et al. I267L is neither the virulence- nor the replication-related gene of African swine fever virus and its deletant is an ideal fluorescent-tagged virulence strain. *Viruses*. 2021; 14(1): 53. <https://doi.org/10.3390/v14010053>
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>
32. Balyshv V.M., Kurinnov V.V., Tsybanov S.Zh., Kalantaenko Yu.F., Kolbasov D.V., Pronin V.V., et al. Biological characteristics of the African swine fever virus isolated in the Russian Federation. *Veterinariya*. 2010; (7): 25–7. <https://elibrary.ru/msrezn> (in Russian)
33. Gallardo M.C., Reoyo A.T., Fernández-Pinero J., Iglesias I., Muñoz M.J., Arias M.L. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manag*. 2015; 1: 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
34. Gallardo C., Fernández-Pinero J., Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res*. 2019; 271: 197676. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197676>
35. Gap Analysis Report. Global African Swine Fever; 2018. Available at: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/np103/Symposium-WorkshopsMeetings/GARA%20Gap%20Analysis%20Report%202018%2011-11-18.pdf>
36. Mur L., Igolkin A., Varentsova A., Pershin A., Remyga S., Shevchenko I., et al. Detection of African swine fever antibodies in experimental and field samples from the Russian Federation: implications for control. *Transbound. Emerg. Dis*. 2016; 63(5): e436–40. <https://doi.org/10.1111/tbed.12304> <https://elibrary.ru/xslmnr>
37. OIE Terrestrial Manual. Chapter 3.8. 1. African swine fever (infection with African swine fever virus). OIE; 2019.
38. Gervasi V., Marcon A., Bellini S., Guberti V. Evaluation of the efficiency of active and passive surveillance in the detection of African swine fever in wild boar. *Vet. Sci*. 2019; 7(1): 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci70100055>