



## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-186>

© ВЛАСОВА Н.Н., ЧЕРНЫХ О.Ю., КРИВОНОС Р.А., ВЕРХОВСКИЙ О.А., АЛИПЕР Т.И., АНОЯТБЕКОВА А.М., ЖУКОВА Е.В., КУЧЕРУК О.Д., ЮЖАКОВ А.Г., ГУЛЮКИН М.И., ГУЛЮКИН А.М., 2023



## Адаптация вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666 методом ускоренного пассирования

Власова Н.Н.<sup>1</sup>, Черных О.Ю.<sup>2</sup>, Кривонос Р.А.<sup>2</sup>, Верховский О.А.<sup>3</sup>, Алипер Т.И.<sup>1</sup>, Аноятбекова А.М.<sup>1</sup>, Жукова Е.В.<sup>1</sup>, Кучерук О.Д.<sup>1</sup>, Южаков А.Г.<sup>1</sup>, Гулюкин М.И.<sup>1</sup>, Гулюкин А.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup>Департамент ветеринарии Краснодарского края, 350051, Краснодарский край, г. Краснодар, Россия;

<sup>3</sup>АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва, Россия

**Введение.** Вирус африканской чумы свиней (АЧС) представляет собой крупный оболочечный вирус с икосаэдрической морфологией капсида и двухцепочечным ДНК-геномом, размеры которого варьируют от 170 до 190 т.п.о. Цикл репликации протекает в две фазы, причем длительность ранней фазы составляет 4–6 ч, а поздней – 8–20 ч после заражения. Адаптация вируса АЧС к росту в определенных клеточных линиях позволяет провести эффективный и достоверный генетический анализ и более четко интерпретировать его результаты.

**Цель.** Адаптация нового изолята вируса АЧС к росту в перевиваемой линии клеток методом коротких пассажей и предварительный генетический анализ полученного штамма.

**Материалы и методы.** Для вирусовыделения, пассирования вируса АЧС использовали первичную культуру клеток лейкоцитов свиньи (ЛС) и перевиваемые культуры клеток свиного происхождения (ПТП, ПС, ППК-666) с использованием питательных сред Игла МЭМ и ГЛА с 10% свиной или фетальной сыворотки.

**Результаты.** В статье представлены данные по выделению и анализу изменений репродуктивных свойств нового изолята вируса АЧС в процессе адаптации к росту в перевиваемой культуре клеток почки поросенка (ППК-666). Подробно описаны современное состояние проблемы культивирования вируса АЧС, особенности его репродукции и основы генетической дифференциации его изолятов. Понимание уникальности природы вируса АЧС определило подходы к процессам его культивирования и адаптации. В связи с этим приводятся результаты исследований культуральных свойств и анализа нуклеотидной последовательности 6 генов нового изолята, а также филогенетического анализа этих генов с уже известными штаммами и изолятами вируса АЧС.

**Заключение.** Полученный в процессе адаптации методом коротких пассажей новый штамм ASVF/Znaury/PPK-23 вируса АЧС за 72 ч достигает высокого уровня накопления с титром  $7,07 \text{ IgAdE}_{50}/\text{cm}^3$ . Первичный генетический анализ позволил установить основные филогенетические связи вновь выделенного изолята с ранее известными вариантами текущей панзоотии АЧС.

**Ключевые слова:** вирус африканской чумы свиней; структура генома; особенности репликации, перевиваемые линии клеток; вирус-опосредованная гемадсорбция, филогенетический анализ

**Для цитирования:** Власова Н.Н., Черных О.Ю., Кривонос Р.А., Верховский О.А., Алипер Т.И., Аноятбекова А.М., Жукова Е.В., Кучерук О.Д., Южаков А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М. Адаптация вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666 методом ускоренного пассирования. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(4): 334–342. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-186> EDN: <https://elibrary.ru/mvcgom>

**Для корреспонденции:** Южаков Антон Геннадиевич, канд. биол. наук, заведующий лабораторией биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Россия. E-mail: [anton\\_oskol@mail.ru](mailto:anton_oskol@mail.ru)

**Участие авторов:** Власова Н.Н., Верховский О.А., Гулюкин А.М., Южаков А.Г., Кривонос Р.А., Черных О.Ю., Кучерук О.Д. – сбор и обработка материалов; Власова Н.Н., Южаков А.Г., Жукова Е.В., Аноятбекова А.М. – экспериментальные исследования; Власова Н.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И., Черных О.Ю. – написание текста; Власова Н.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И., Кучерук О.Д., Южаков А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М. – резюме, заключение, общая редакция.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках темы ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН № FGUG-2022-18.

**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 Этическим комитетом ФГБНУ «ФНЦ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (Протокол № 12-2021 от 21.12.2021).

Поступила 03.07.2023  
Принята в печать 16.08.2023  
Опубликована 31.08.2023

## ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-186>

# Adaptation of african swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) to growth in the continuous culture PPK-66b cells by the method of accelerated passaging

Natalia N. Vlasova<sup>1</sup>, Oleg Yu. Chernykh<sup>2</sup>, Roman A. Krivonos<sup>2</sup>, Oleg A. Verkhovsky<sup>3</sup>, Taras I. Aliper<sup>1</sup>, Afshona M. Anoyatbekova<sup>1</sup>, Elena V. Zhukova<sup>1</sup>, Oksana D. Kucheruk<sup>1</sup>, Anton G. Yuzhakov<sup>1</sup>, Mikhail I. Gulyukin<sup>1</sup>, Aleksey M. Gulyukin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Scientific Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after V.I. K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine of the Krasnodar Territory, 350051, Krasnodar Territory, Krasnodar, Russia;

<sup>3</sup>Research Institute for Diagnosis and Prevention of Human and Animal Diseases, 123098, Moscow, Russia

**Introduction.** African swine fever virus (ASF) is a large, enveloped virus with an icosahedral capsid morphology and a double-stranded DNA genome ranging in size from 170 to 190 kb. The replication cycle proceeds in two phases, the early phase lasting 4–6 hours and the late 8–20 hours after infection. The adaptation of the ASF virus to growth in continuous cell lines makes efficient and reliable genetic analysis and more accurate interpretation of its results.

**Objective.** Adaptation of a new isolate of the ASF virus to growth in a continuous cell line by the method of accelerated passages and preliminary genetic analysis of the resulting strain.

**Materials and methods.** For virus isolation and passaging of the ASF virus, a porcine leukocyte cell culture (PL) and continuous cell cultures of porcine origin (ST, PK, PPK-66b) were used with Eagle MEM and HLA essential media with 10% porcine or fetal serum.

**Results.** The article presents data on the isolation and analysis of the changes in the reproductive properties of a new African swine fever (ASF) virus isolate in the process of adaptation to growth in a continuous piglet kidney cell culture clone b (PPK-66b). The current state of the problem of cultivation of the ASF virus, the features of its reproduction, and the basis of the genetic differentiation of its isolates are described in detail. Understanding the uniqueness of the nature of the ASF virus determined the approaches to the processes of its cultivation and adaptation. In this regard, the results of studies of cultural properties, and analysis of the nucleotide sequence of 6 genes of the new isolate, as well as phylogenetic analysis of these genes with already known strains and isolates of the ASF virus are presented.

**Conclusion.** A new strain obtained in the process of cell adaptation of ASVF/Znaury/PPK-23 ASF virus by the accelerated passaging method reaches a high level of reproduction in 72 hours with an accumulation titer of 7.07 lg HAdE50/cm<sup>3</sup>. Primary genetic analysis allowed to establish the main phylogenetic relationships of the newly isolated strain with previously known variants of the current ASF panzootic.

**Keywords:** African swine fever virus (ASFV); genome structure; features of replication, continuous cell lines; virus-mediated hemadsorption (HAD), phylogenetic analysis

**For citation:** Vlasova N.N., Chernykh O.Yu., Krivonos R.A., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Anoyatbekova A.M., Zhukova E.V., Kucheruk O.D., Yuzhakov A.G., Gulyukin M.I., Gulyukin A.M. Adaptation of african swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) to growth in the continuous culture PPK-66b cells by the method of accelerated passaging. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 334–342 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-186> EDN: <https://elibrary.ru/mvcgom>

**For correspondence:** Yuzhakov Anton Gennadievich, Ph.D. biol. Sci., Head of the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after V.I. K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moscow, Russia. E-mail: [anton\\_oskol@mail.ru](mailto:anton_oskol@mail.ru)

**Information about the authors:**

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

Chernykh O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8584-8251>

Krivonos R.A. <https://orcid.org/0009-0008-4580-6776>

Verkhovsky O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

Aliper T.I., <https://orcid.org/0000-0003-2696-1363>

Anoyatbekova A.M., <https://orcid.org/0000-0002-6579-779X>

Zhukova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-7423-6102>

Kucheruk O.D. <https://orcid.org/0000-0002-2161-9406>

Yuzhakov A.G., <https://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Gulyukin M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>

Gulyukin A.M., <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>

**Contribution:** Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Gulyukin A.M., Yuzhakov A.G., Krivonos R.A., Chernykh O.Yu., Kucheruk O.D. – collection and processing of materials; Vlasova N.N., Yuzhakov A.G., Zhukova E.V., Anoyatbekova A.M. – experimental studies; Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Chernykh O.Yu. – writing text; Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Kucheruk O.D., Yuzhakov A.G., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I. – summary, conclusion, general edition.

**Funding.** The work was carried out within the framework of the theme No. FGUG-2022-18 (VIEV RAS).

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

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal Scientific Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after V.I. K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences (Protocol No 12-2021 dated December 21, 2021).

Received 03 July 2023  
Accepted 16 August 2023  
Published 31 August 2023

## Введение

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) представляет собой крупный оболочечный вирус с икосаэдрической морфологией капсида и двухцепочечным ДНК-геномом, размеры которого варьируют от 170 до 190 т.п.о. На концах молекулы ДНК имеются концевые инвертированные повторы, заканчивающиеся петлями-шпильками [1]. Репликация вируса АЧС протекает в две фазы, причем ранняя фаза длится 4–6 ч, а поздняя – 8–20 ч после заражения, его цикл реализуется в основном в цитоплазме, но ранняя стадия затрагивает и ядро [2, 3]. По окончании цикла репликации вирионы приобретают внешнюю суперкапсидную оболочку при почковании через плазматическую мембрану [4]. Вирус АЧС размножается преимущественно в клетках моноцитарно-макрофагальной линии и некоторых ретикулярных, полиморфных и мегакариоцитарных клетках [5]; в меньшей степени его репликация наблюдается в эндотелиальных [6], почечных клетках [7], гепатоцитах [8] и нейтрофилах [9].

Анализ внеклеточного вируса АЧС идентифицировал 54 структурных белка с молекулярной массой от 10 000 до 150 000 кДа [10]. Его вирионы содержат транскрипционный аппарат для синтеза, кэпирования и полиаденилирования ранней РНК [1]. Ферменты: протеинкиназа, кодируемая геном *R298L*, две нуклеозидтрифосфатфосфогидролазы, кислая фосфатаза и дезоксирибонуклеаза, также были обнаружены в вирусных частицах [1, 11].

Одним из эффективных подходов в изучении функции генов вируса АЧС является генетический анализ искусственно модифицированного или длительно пассированного вируса в первичных или перевиваемых линиях. Однако его адаптация к росту в определенных клеточных линиях – процесс сложный и длительный, хотя и позволяет сделать достоверным и детальным процесс анализа. При этом в течение многократных пассажей обычно наблюдается снижение вирулентности адаптированного вируса [12, 13].

За более чем 50-летнюю историю интенсивного изучения вируса АЧС получено несколько лабораторно-и природно-аттенуированных штаммов [14, 15]. Тем не менее подробная информация о процессе адаптации, фенотипических изменениях и точных геномных модификациях вируса АЧС, выращенного/адаптиро-

ванного *in vitro*, остается до конца невыясненной, что затрудняет понимание геномных механизмов, приводящих к его фенотипическим модификациям и изменению вирулентности.

Установлено, что в процессе адаптации вируса АЧС к росту в непермиссивных клеточных культурах происходят значительные геномные перестройки [13]. Например, геномные изменения ASFV-G, возникающие в течение последовательных пассажей в клетках *Vero*, группируются по появлению точечных мутаций, приводящих к заменам нуклеотидов или сдвигу рамки считывания, а также по наличию возникших крупных делеций, затрагивающих группу генов в левой вариабельной области. К сожалению, оценка всех эффектов, вызванных точечными мутациями при адаптации ASFV-G к росту в клетках *Vero*, была значительно затруднена, поскольку они не несли ощутимых фенотипических изменений: например, геном ASFV-G/VP разных пассажей имел точечную мутацию в гене *CP530R*, а различий в цитопатическом действии (ЦПД) исходного и адаптированного вируса не было обнаружено [13].

Точечные мутации, наблюдаемые в генах *MGF505 10R* и *I177L*, также могут влиять на изменения ЦПД, отмеченные у ASFV-G/VP 60-го пассажа и ASFV-G/VP 80-го пассажа, а мутации в гене *MGF505 10R*, который является членом семейства генов, связанных с репликацией вируса АЧС в свинных макрофагах, вирулентностью вируса и блокированием продукции интерферона, приводят к снижению уровня репликации [12, 13, 16].

Как было установлено, вирулентность вируса АЧС – полигенное свойство, разные группы исследователей определили ряд генов, ответственных за его высокую патогенность: например, *CD2v* [17], *DP148R* [18] и др. [19]. Однако на настоящий момент эффективная и безопасная вакцинопрофилактика при АЧС не разработана, в связи с чем анализ особенностей репликации этого сложного вируса, структуры его генома и функции отдельных генов остается одним из самых актуальных направлений его изучения.

Вирус АЧС использует свои ферментативные и регуляторные компоненты для переключения клеточной синтетической активности на «вирусные фабрики». Он обладает практически полной независимостью от хозяйских клеточных ферментов в отношении вре-

менных факторов, которые контролируют экспрессию генов, и представляет собой идеальную модель для изучения особенностей вирусной репликации и вирусиндуцированных факторов модуляции иммунной системы хозяина.

С учетом этого, не подлежит сомнению тот факт, что в процессе адаптации происходит постепенная перестройка работы вирусной регуляторной и ферментативной системы, необходимая для успешной репликации вируса в новой клеточной системе. Процесс полноценной адаптации и получения нового штамма, как правило, занимает от 10 до 24 месяцев. Таким образом, сокращение сроков эффективной адаптации играет существенную роль в научных исследованиях. Поскольку у вируса АЧС инфекционностью обладают как внеклеточные, так и внутриклеточные вирионы, а конечным этапом вирусного цикла является почкование через клеточную мембрану, замена этой фазы репликации процессом замораживания/оттаивания позволяет сократить длительность цикла и достичь одновременного массивного выхода инфекционных частиц.

**Цель исследования** – адаптация вируса АЧС, изолята из Республики Южная Осетия, к росту в перевиваемой линии клеток ППК-666 методом коротких пассажей для дальнейшего анализа особенностей его репликации, изучения структуры генома и определения нуклеотидной последовательности некоторых генов.

### Материалы и методы

**Культивирование первичных и перевиваемых линий клеток.** Первичную культуру лейкоцитов свиной (ЛС) получали от здоровых животных согласно ГОСТ 28573-90 «Свиный. Методы лабораторной диагностики африканской чумы» и выращивали в пластиковых флаконах с рабочей поверхностью 25 см<sup>2</sup> (T25) в среде ГЛА на Хэнкса с добавлением 10% фетальной сыворотки. Перевиваемые культуры клеток ППК-666 (перевиваемые клетки почки поросенка, клон 666), ПТП (перевиваемые тестикулы поросенка), ПС (перевиваемые клетки почки свиной) были получены из «Специализированной коллекции перевиваемых, соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных РККК (П), (СХЖ РАСХН)» ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (РП №2460-р от 06.09.2021). Клетки культивировали в пластиковых матрасах T25 в среде Игла MEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота или свиной.

**Вирусовыделение.** Вирусовыделение проводили стандартным методом путем заражения культуры клеток ЛС. Для получения 10% суспензии при вирусовыделении сгусток крови гомогенизировали в фарфоровой ступке, далее к 1 см<sup>3</sup> гомогената сгустка крови добавляли 9 см<sup>3</sup> физраствора. Полученную суспензию осветляли центрифугированием при 1500 об/мин с последующим фильтрованием через нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0,45 мкм, после чего использовали ее для введения вируса в куль-

туральную среду в соотношении объемов 1 : 10. Длительность пассажа составляла 7 суток.

**Адаптация вируса.** Адаптацию проводили методом коротких пассажей. Поскольку репликативный цикл вируса АЧС длится около 20 ч, то для быстрой адаптации его к росту в перевиваемой культуре клеток использовали метод, основанный на получении максимального выхода вирусного потомства от варианта, способного к репликации в новой клеточной системе, т.е. клетках перевиваемых линий.

С этой целью инокулировали культуры клеток ПТП, ПС, ППК-666 с использованием 1 см<sup>3</sup> вирусосодержащего материала изолята ASVF/Znaury/dp-22 с титром инфекционности 7,32 lgГАДЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, исходя из расчета, что доза заражения на клетку составила ≈ 100 ГАДЕ<sub>50</sub>. После двухчасовой адсорбции остатки вирусосодержащей суспензии удаляли, трижды промывали монослой клеток питательной средой Игла МЭМ и вносили в каждый флакон по 7 мл питательной среды с 10% свиной сыворотки.

После инкубации при 37 °С в течение 96 ч из флаконов удаляли культуральную жидкость и собранные с рабочей поверхности флакона клетки подвергли трехкратному замораживанию/оттаиванию (–70 °С – +8 °С). Обломки клеток удаляли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин, а надосадочную жидкость использовали для дальнейшей процедуры инокуляции свежего монослоя культуры клеток. Таким образом было проведено 5 последовательных пассажей, затем время пассирования сократили до 72 ч и провели еще 3 дополнительных пассажа. Последовательное пассирование (9–16-й пассажи) проводилось описанным ранее методом, причем длительность одного пассажа не превышала 72 ч.

**ПЦР-анализ.** Для обнаружения генома вируса АЧС в полевом материале и культурах клеток использовали диагностическую тест-систему для выявления вируса АЧС методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ) (ООО «Ветбиохим», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Амплификаты генов *CD2v*, *ORF9*, *B646L*, *KP205R* были получены с использованием праймеров, опубликованных в отечественной и зарубежной литературе, и отобраны для секвенирования с целью проведения филогенетического анализа. Исследованные области генома вируса АЧС обладают определенным уровнем изменчивости, а их анализ применяется для генотипирования и группирования новых изолятов [20].

Также в анализ включили исследование межгенных областей (IGR) MGF 505 9R/10R и I73R/I329L с помощью протоколов, описанных ранее [20, 21].

ПЦР-продукты амплификации генов или фрагментов генома разделяли с помощью электрофореза с использованием 1% агарозного геля. Очистку ПЦР-фрагментов из агарозного геля проводили с использованием набора GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific, США).

**Секвенирование по Сэнгеру.** Секвенирование очищенных ПЦР-продуктов осуществляли с использованием

набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit и секвенатора ABIPrism 3100 (AppliedBiosystems, США).

**Анализ результатов.** Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи пакетов программ Lasergene 11.1.0 (DNASTAR, США). Выравнивание полученных последовательностей и последовательностей эталонного штамма Georgia 2007/1, а также изолятов из Европы, Азии и Африки, полный геном которых определен и опубликован в Genbank, проводили с использованием метода MUSCLE. Филогенетическая дендрограмма была построена с помощью метода максимального правдоподобия в программе MEGA 7.0. Топологию ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (1000 шагов репликации). Для построения деревьев использовали модель General Time Reversible (GTR), гамма-распределение вариации частот между сайтами (G + I).

### Результаты

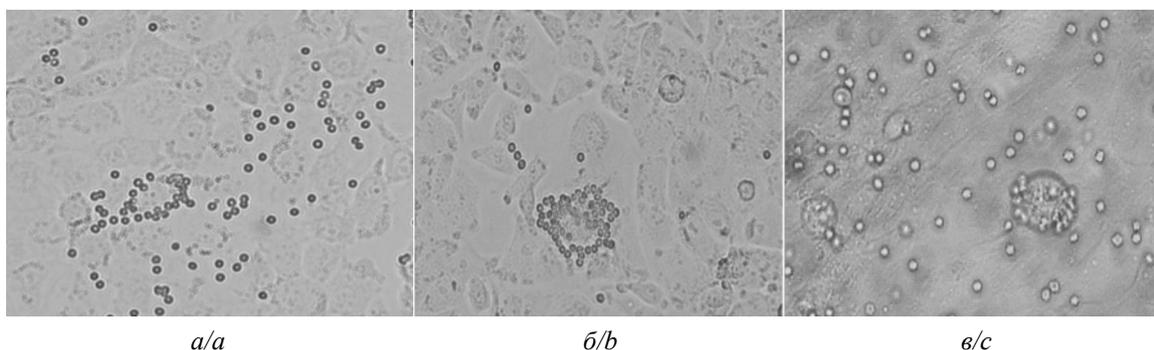
**Происхождение изолята вируса.** В январе 2022 г. в с. Ног Знаурского района Республики Южная Осетия в частном секторе у леса, на удаленном расстоянии от соседей, произошла локальная вспышка АЧС. Свиньи (3 головы) были больны в течение 4 суток: наблюдалась гипертермия, отказ от корма, слабо-выраженная синюшность кожных покровов. После указанного срока начался падеж. У трупов отобрали патологический материал (кровь). По данным эпизоотологического расследования, одним из возможных путей заражения являлся контакт с дикими кабанями или инфицированными объектами в окружающей природе: животных выращивали на свободно выгульном содержании. После постановки диагноза в соответствии с ветеринарными правилами трупы павших животных были сожжены и введен карантин. Впоследствии у соседей, содержавших свиней, падежа не регистрировали.

В лабораторию биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН материал поступил в рамках договора о научном сотрудничестве с Департаментом ветеринарии Краснодарского края от 22.08.2022.

**Вирусовыделение нового изолята.** Для изоляции вируса из крови, отобранной от павшей домашней свиньи в Знаурском районе, использовали ее образцы, имевшие в ПЦР-РВ положительный результат. Вирусовыделение проводили на обладающей высокой чувствительностью к репродукции вируса АЧС первичной культуре клеток ЛС, в которой он размножается без предварительной адаптации. В ходе вирусовыделения осуществляли ежедневное микроскопирование и учитывали время появления гемадсорбции и цитопатогенного эффекта на 75–80%. Всего выполнили 3 последовательных пассажа. После первого пассажа признаков накопления вируса не обнаружили, поэтому далее провели еще 2 пассажа, внося в новые матрасы с культурой клеток ЛС вирусосодержащую суспензию предыдущего пассажа также в соотношении 1 : 10. На 3-м пассаже была получена культуральная жидкость с титром инфекционности 7,15–7,32 IgГАдE<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Таким образом, вирус АЧС нового изолята ASVF/Znaury/dp-22 был выделен из патологического материала свиньи (кровь), павшей на территории Знаурского района Республики Южная Осетия в январе 2022 г., путем 3 последовательных пассажей на культуре клеток ЛС.

**Изучение культуральных свойств нового изолята вируса АЧС.** Для анализа культуральных свойств определяли уровень накопления вируса по скорости появления гемадсорбции и сохранности монослоя. На уровне 2-го и 3-го пассажей при температуре 37 °С полный цикл накопления вируса продолжался в течение 7 суток с проявлением его гемадсорбирующих свойств на 3–4-е сутки. Для материала 3-го пассажа был определен титр накопления в культуре ЛС, который не превышал значений 7,15–7,32 IgГАдE<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Наличие генома вируса АЧС в полученном материале подтверждали методом ПЦР-РВ, где показатель Ct имел значения не выше 8,34–9,21. Таким образом, принадлежность выделенного вируса к возбудителю АЧС была подтверждена в реакции гемадсорбции и ПЦР-РВ.

Следующим этапом выполняли подбор наиболее пригодной для адаптации перевиваемой культуры кле-



**Рис. 1.** Реакция гемадсорбции при заражении клеток перевиваемых линий свиного происхождения вирусом АЧС изолят ASVF/Znaury/dp-22.

*a* – ППК66б – 2-е сутки; *б* – ПТП – 4-е сутки; *в* – ПС – 6-е сутки; ув. 100.

**Fig. 1.** Haemadsorption upon the continuous cell lines of porcine origin infected by ASF virus isolate ASVF/Znaury/dp-22.

*a* – PPK66b – day 2; *b* – ST – day 4; *c* – PK – day 6; magnification ×100.

ток свиного происхождения. Для анализа были взяты 3 разные линии: ПТП, ПС и ППК-66б. Для оценки наличия возможной репликации вируса использовали реакцию гемадсорбции. С этой целью в культуральную жидкость добавляли эритроциты свиньи до разведения 0,01%. Сроки появления и наличие гемадсорбции выявляли путем ежедневного микроскопирования в течение 7 суток. Результаты постановки реакции гемадсорбции представлены на **рисунке 1**.

Как видно из результатов реакции гемадсорбции наибольшей чувствительностью к репродукции вируса АЧС изначально обладали клетки линии ППК-66б, поскольку вирусопосредованная гемадсорбция появилась на клетках этой линии на 2 суток раньше, чем в культуре ПТП, и на 4 суток раньше, чем в культуре ПС.

**Адаптация вируса.** Далее вирус изолята ASVF/Znaury/dp-22 адаптировали к росту в отобранной перевиваемой культуре клеток ППК-66б, в которой было бы возможно его эффективное культивирование после адаптации. Адаптацию вируса проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». После 8-го пассажа отбирали надосадочную жидкость с лизированной культуры клеток и определяли титр в культуре клеток ЛС. Его среднее значение варьировало от 4,83 до 5,47 IgГАдЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Титр вируса на уровне 16-го пассажа достиг значений 6,23±0,08 IgГАдЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Следовательно, вирус изолята ASVF/Znaury/dp-22 адаптировался к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-66б.

Начиная с 16-го пассажа дальнейшее культивирование вируса проводили без стадии адсорбции вируса, внося культуральную жидкость с вирусом 16-го и последующих пассажей в питательную среду новых флаконов, и инкубировали при 37 °С в течение не более 72 ч. Культивируя подобным образом вирус, осуществляли селекцию и отбор популяции быстро реплицирующегося вируса, который накапливался в минимально короткие сроки. Результаты адаптации вируса изолята ASVF/Znaury/dp-22 к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-66б в течение 52 пассажей приведены в **таблице**.

Как видно из результатов, приведенных в таблице, титр адаптированного вируса в культуре клеток ППК-66б незначительно отличался от титра вируса, определенного для исходного изолята ASVF/Znaury/dp-22, накопленного в культуре клеток ЛС.

**Генетический анализ.** Для проверки наличия генетических различий изолята ASVF/Znaury/dp-22 и его адаптированного к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-66б варианта, провели локусный анализ генетической структуры по шести маркерным областям генома вируса АЧС.

Исследованные области генома вируса АЧС обладают определенным уровнем изменчивости, однако, их анализ не позволил выявить наличие уникальных изменений, характерных для данного изолята. Тем не менее, определение последовательности гена B646L и межгенного региона I73R/I329L позволило провести предварительное группирование нового изолята ASVF/Znaury/dp-22 и определить его генотип.

В результате филогенетического анализа в отношении гена B646L было установлено, что выделенный изолят относится ко II генотипу (**рис. 2**) и по наличию 10-нуклеотидной встройки в межгенном регионе I73R/I329L можно отнести его к подгруппе IGR I (**рис. 3**).

Таким образом, использование перевиваемой культуры клеток свиного происхождения в сочетании с методом коротких пассажей в ППК-66б позволило за 5 месяцев получить из вирусного материала изолята ASVF/Znaury/dp-22 новый штамм ASVF/Znaury/PPK-23 с определенными культуральными свойствами и первичной генетической характеристикой.

### Заключение

Настоящая работа является одной из первых по описанию вируса АЧС, циркулирующего в Республике Южная Осетия.

В представленной статье основное внимание уделялось изучению культуральных свойств при адаптации

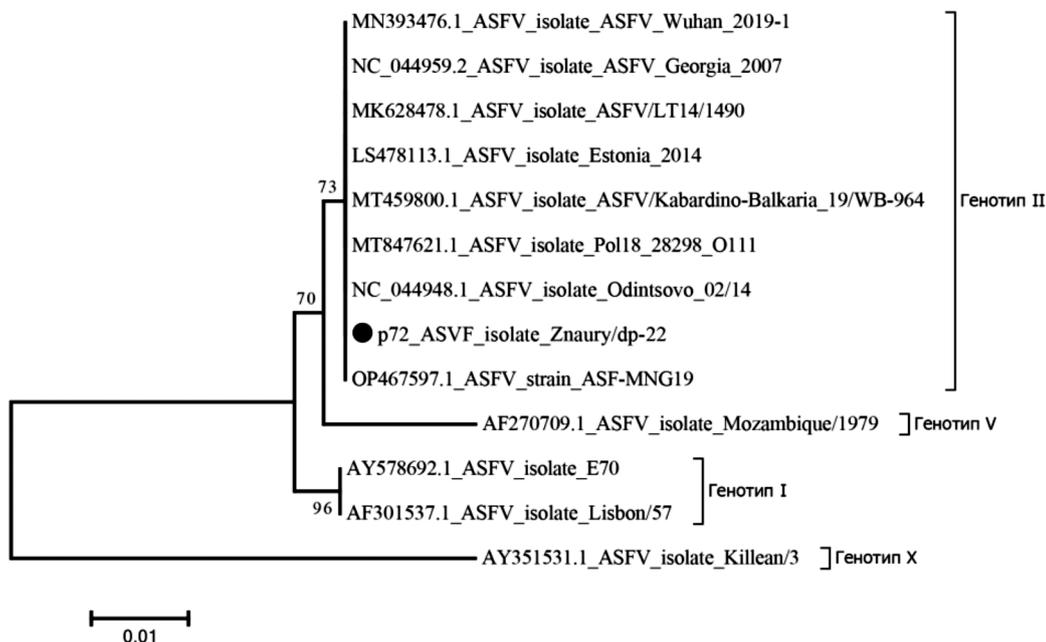
**Таблица. Значения титра вируса АЧС разных пассажных уровней (n = 4)**

**Table. The ASFV titer values at the different passages (n = 4)**

Номер пассажа Passage number	Доза заражения (ГАдЕ <sub>50</sub> на клетку)* Infection dose (HADE <sub>50</sub> per cell)*	Время репродукции (ч) Reproduction time (hours)	Титр вируса (IgГАдЕ <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )* Virus titer (IgHADE <sub>50</sub> /cm <sup>3</sup> )*
1	≈100	96	7,32 ± 0,21
5	≈1–10	96	4,83 ± 0,43
8	≈1	72	5,47 ± 0,32
12	≈10	72	5,77 ± 0,18
16	≈10	72	6,23 ± 0,21
26	≈10	72	6,32 ± 0,14
36	≈10	72	6,61 ± 0,09
46	≈10	72	6,89 ± 0,11
52	≈10	72	7,07 ± 0,15

**Примечание.** \* – указан титр вируса, определенный в культуре клеток ЛС.

**Note.** \* – indicates the virus titer determined in the porcine leucocytes cell culture (PL).



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *B646L* (p72) разных штаммов II генотипа и нового изолята из с. Ног Знаурского района Республики Южная Осетия.

**Fig. 2.** Phylogenetic tree based on the analysis of the nucleotide sequences of the *B646L* (p72) gene of various strains of genotype II and a new isolate from the v. Nog of the Znaury district of the Republic of South Ossetia.



**Рис. 3.** Выравнивание нуклеотидной последовательности изолятов вируса АЧС II генотипа с 10-нуклеотидной встройкой в межгенном регионе I73R/I329L и без нее.

**Fig. 3.** Nucleotide sequence alignment of ASFV genotype II isolates with and without a 10-nucleotide insert in the I73R/I329L intergenic region.

к росту в перевиваемой культуре клеток ППК-666 методом коротких пассажей. Использование этого метода позволило сократить процесс получения адаптированного штамма практически в 2 раза: с 9–12 до 4–5 месяцев.

Для детального анализа скорости репродукции вируса и структуры его генома было необходимо четкое понимание механизмов его репликации и особенностей морфогенеза. Сходство между структурой генома вирусов АЧС и коровьей оспы позволило исследователям определить модель для репликации его ДНК [22]. Инициация репликации начинается с введения одноцепочечного разрыва в геном вблизи 5'- или 3'-концов, причем синтезируется интермедиат, в котором концы зарождающихся и матричных цепей являются инвертированными, образуя самосхлопывающуюся шпильку. Следовательно, наиболее вариабельные области ДНК вируса АЧС располагаются по концам генома, причем, гены вируса АЧС, находящиеся в вариабельных областях, как правило, несущественны для

репликации вируса *in vitro*, но выполняют функции, связанные с хозяйской специфичностью [22].

Исходя из вышеизложенного, для первичного генетического анализа были выбраны участки генома, характеризующие генотип вируса АЧС: участок гена *B646L* и центральный вариабельный регион (CVR) гена *B602L* [23, 24]. Впоследствии определяли наличие 10-нуклеотидной встройки в интергенном регионе I73R/I329L и полноценность гена, ответственного за гемадсорбцию вируса EP402R [25]. Для поиска возможных мутаций вариабельных регионов генома, произошедших в процессе адаптации, были проанализированы нуклеотидные последовательности генов в правой и левой конечных областях – MGF-505, 9R/10R и UK(DP69R). Первичный генетический анализ позволил установить основные филогенетические связи вновь выделенного изолята с ранее известными вариантами текущей панзоотии АЧС: изолят ASFV/Znaury/dp-22 относится ко II генотипу (рис. 2), подгруппе IGR II.

Очевидно, что дальнейший генетический анализ позволит выявить маркерные последовательности, уникальные для исходного изолята и штамма ASVF/Znaury/PPK-23, адаптированного к росту в ППК-666, и установить, влияет ли процесс ускоренного пассирования на структуру генома вируса АЧС аналогично стандартному процессу адаптации, как было ранее описано другими авторами [12, 13].

Кроме того, определение полногеномной последовательности ASVF/Znaury/dp-22 облегчит идентификацию молекулярных изменений в геноме ASVF/Znaury/PPK-23 по сравнению с его ближайшим родственником и тем самым будет способствовать детальному изучению структуры генома, анализу особенностей его репликации и выяснению функций некоторых генов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Salas M.L., Andrés G. African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.* 2013; 173(1): 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.016>
- Rojo G., García-Beato R., Viñuela E., Salas M.L., Salas J. Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology.* 1999; 257(2): 524–36. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9704>
- García-Beato R., Salas M.L., Viñuela E., Salas J. Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology.* 1992; 188(2): 637–49. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90518-t](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90518-t)
- Breese S.S. Jr., DeBoer C.J. Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology.* 1966; 28(3): 420–8. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90054-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90054-7)
- Casal I., Enjuanes L., Viñuela E. Porcine leukocyte cellular subsets sensitive to African swine fever virus in vitro. *J. Virol.* 1984; 52(1): 37–46. <https://doi.org/10.1128/JVI.52.1.37-46.1984>
- Wardley R.C., Wilkinson P.J. The growth of virulent African swine fever virus in pig monocytes and macrophages. *J. Gen. Virol.* 1978; 38(1): 183–6. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-1-183>
- Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Méndez A., Carrasco L., Martín de las Mulas J., Villeda C.J., et al. Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J. Gen. Virol.* 1995; 76 (Pt. 9): 2399–405. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2399>
- Sierra M.A., Bernabe A., Mozos E., Mendez A., Jover A. Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Vet. Pathol.* 1987; 24(5): 460–2. <https://doi.org/10.1177/030098588702400516>
- Carrasco L., de Lara F.C., Martín de las Mulas J., Gómez-Villamandos J.C., Pérez J., Wilkinson P.J., et al. Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. *J. Comp. Pathol.* 1996; 115(4): 415–28. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(96\)80075-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(96)80075-2)
- Esteves A., Marques M.I., Costa J.V. Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology.* 1986; 152(1): 192–206. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90384-3)
- Baylis S.A., Banham A.H., Vydellingum S., Dixon L.K., Smith G.L. African swine fever virus encodes a serine protein kinase which is packaged into virions. *J. Virol.* 1993; 67(8): 4549–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.4549-4556.1993>
- Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., et al. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2324–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.03250-14>
- Мазлум А.А., Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., ван Шалквик А., Власова Н.Н. Геномные изменения вируса африканской чумы свиней (Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus), связанные с адаптацией к размножению в перевиваемой культуре клеток. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(3): 211–6. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-50> <https://elibrary.ru/eqrwmo>

- Прудникова Е.Ю., Балышев В.М., Юрков С.Г., Гальнбек Т.В., Блышева В.И. Адаптация вируса африканской чумы свиней к перевиваемым культурам клеток. *Научный журнал КубГАУ.* 2012; (80): 70–9. <https://elibrary.ru/pbuuyj>
- Boinas F.S., Hutchings G.H., Dixon L.K., Wilkinson P.J. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt 8): 2177–87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80058-0>
- Borca M.V., Rai A., Ramirez-Medina E., Silva E., Velazquez-Salinas L., Vuono E., et al. A Cell Culture-Adapted Vaccine Virus against the Current African Swine Fever Virus Pandemic Strain. *J. Virol.* 2021; 95(14): e0012321. <https://doi.org/10.1128/JVI.00123-21>
- Monteagudo P.L., Lacasta A., López E., Bosch L., Collado J., Pina-Pedrero S., et al. BA71ΔCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. *J. Virol.* 2017; 91(21): e01058–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01058-17>
- Reis A.L., Goatley L.C., Jabbar T., Sanchez-Cordon P.J., Netherton C.L., Chapman D.A.G., et al. Deletion of the African Swine Fever Virus Gene DP148R Does Not Reduce Virus Replication in Culture but Reduces Virus Virulence in Pigs and Induces High Levels of Protection against Challenge. *J. Virol.* 2017; 91(24): e01428–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01428-17>
- Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Kutish G.F., Afonso C.L., Rock D.L. Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. *J. Virol.* 2002; 76(7): 3095–104. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3095-3104.2002>
- 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>
- Elsukova A.A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A., Zinyakov N.G., Igolkin A.S., Vlasova N.N. Comparative analysis of molecular and biological properties of African swine fever virus isolates collected in 2013 from Russian Federation. *Abstracts 8th Annual EPIZONE Meeting "Primed for tomorrow"*. Frideriksberg, 2014.
- Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* 2013; 173(1): 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.020>
- Bastos A.D., 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 characterisation. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
- 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>
- Borca M.V., Kutish G.F., Afonso C.L., Irusta P., Carrillo C., Brun A., et al. An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. *Virology.* 1994; 199(2): 463–8. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1146>

#### REFERENCES

- Salas M.L., Andrés G. African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.* 2013; 173(1): 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.016>
- Rojo G., García-Beato R., Viñuela E., Salas M.L., Salas J. Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology.* 1999; 257(2): 524–36. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9704>
- García-Beato R., Salas M.L., Viñuela E., Salas J. Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology.* 1992; 188(2): 637–49. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90518-t](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90518-t)
- Breese S.S. Jr., DeBoer C.J. Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology.* 1966; 28(3): 420–8. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90054-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90054-7)
- Casal I., Enjuanes L., Viñuela E. Porcine leukocyte cellular subsets sensitive to African swine fever virus in vitro. *J. Virol.* 1984; 52(1): 37–46. <https://doi.org/10.1128/JVI.52.1.37-46.1984>

6. Wardley R.C., Wilkinson P.J. The growth of virulent African swine fever virus in pig monocytes and macrophages. *J. Gen. Virol.* 1978; 38(1): 183–6. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-1-183>
7. Gómez-Villamandos J.C., Hervás J., Méndez A., Carrasco L., Martín de las Mulas J., Villeda C.J., et al. Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J. Gen. Virol. Pathol.* 1995; 76 ( Pt 9): 2399–405. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2399>
8. Sierra M.A., Bernabe A., Mozos E., Mendez A., Jover A. Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Vet. Pathol.* 1987; 24(5): 460–2. <https://doi.org/10.1177/030098588702400516>
9. Carrasco L., de Lara F.C., Martín de las Mulas J., Gómez-Villamandos J.C., Pérez J., Wilkinson P.J., et al. Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. *J. Comp. Pathol.* 1996; 115(4): 415–28. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(96\)80075-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(96)80075-2)
10. Esteves A., Marques M.L., Costa J.V. Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology.* 1986; 152(1): 192–206. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90384-3)
11. Baylis S.A., Banham A.H., Vydelingum S., Dixon L.K., Smith G.L. African swine fever virus encodes a serine protein kinase which is packaged into virions. *J. Virol.* 1993; 67(8): 4549–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.4549-4556.1993>
12. Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., et al. The progressive adaptation of a georgian isolate of African swine fever virus to vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2324–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.03250-14>
13. Mazloun A., Igolkin A.S., Zinyakov N.G., Van Schalkwyk A., Vlasova N.N. Changes in the genome of African swine fever virus (Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus) associated with adaptation to reproduction in continuous cell culture. *Voprosy virusologii.* 2021; 66(3): 211–6. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-50> (in Russian)
14. Prudnikova E.Yu., Balyshv V.M., Yurkov S.G., Gal'nbek T.V., Blysheva V.I. Adaptation of African swine fever virus to continuous cell cultures. *Nauchnyy zhurnal KubGAU.* 2012; (80): 70–9. <https://elibrary.ru/pbuuyj> (in Russian)
15. Boinas F.S., Hutchings G.H., Dixon L.K., Wilkinson P.J. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 8): 2177–87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80058-0>
16. Borca M.V., Rai A., Ramirez-Medina E., Silva E., Velazquez-Salinas L., Vuono E., et al. A Cell culture-adapted vaccine virus against the current African swine fever virus pandemic strain. *J. Virol.* 2021; 95(14): e0012321. <https://doi.org/10.1128/JVI.00123-21>
17. Monteagudo P.L., Lacasta A., López E., Bosch L., Collado J., Pina-Pedrero S., et al. BA71ΔCD2: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *J. Virol.* 2017; 91(21): e01058–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01058-17>
18. Reis A.L., Goatley L.C., Jabbar T., Sanchez-Cordon P.J., Netherton C.L., Chapman D.A.G., et al. Deletion of the African swine fever virus gene DP148R does not reduce virus replication in culture but reduces virus virulence in pigs and induces high levels of protection against challenge. *J. Virol.* 2017; 91(24): e01428–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01428-17>
19. Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Kutish G.F., Afonso C.L., Rock D.L. Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. *J. Virol.* 2002; 76(7): 3095–104. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3095-3104.2002>
20. 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>
21. Elskova A.A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A., Zinyakov N.G., Igolkin A.S., Vlasova N.N. Comparative analysis of molecular and biological properties of African swine fever virus isolates collected in 2013 from Russian Federation. In: *Abstracts 8<sup>th</sup> Annual EPIZONE Meeting «Primed for Tomorrow».* Frideriksberg; 2014.
22. Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* 2013; 173(1): 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.020>
23. Bastos A.D., 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 characterisation. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
24. 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>
25. Borca M.V., Kutish G.F., Afonso C.L., Irusta P., Carrillo C., Brun A., et al. An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. *Virology.* 1994; 199(2): 463–8. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1146>