

УДК 619:616-07

## ПОИСК НОВЫХ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2016- 2017 ГОДАХ

*Сибгатуллова А.К., аспирант, Шкаликова М.В., мл. научный сотрудник,  
Кудряшов Д.А., мл. научный сотрудник, Титов И.А., к.б.н., научный  
сотрудник, тел. 8(963)234-37-39, sibgatullova92@mail.ru  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
“Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии”,  
пгт. Вольгинский, Россия*

**Ключевые слова:** *Вирус Африканской чумы свиней, генотипирование, секвенирование, маркерные гены, мультигенное семейство.*

*Работа посвящена поиску новых маркерных генов, которые могли бы быть использованы для уточнения генотипирования изолятов вируса АЧС, циркулирующих на территории Российской Федерации.*

**Введение.** Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозное вирусное заболевание свиней, характеризующееся высокой летальностью и наносящее огромный экономический ущерб свиноводству. АЧС вызывается ДНК-содержащим вирусом сем. *Asfarviridae*, рода *Asfavirus* [1].

Экономический ущерб, наносимый АЧС, складывается из прямых потерь при ликвидации зараженных и контактировавших с ними животных, ограничений в международной торговле и измеряется десятками миллионов долларов [2]. В настоящее время распространение АЧС является угрозой для свиноводства не только в Российской Федерации, но также и для стран Восточной Европы. Ситуация усугубляется и недавними вспышками АЧС в Китае. Китай является крупнейшим в мире производителем свинины, и в стране содержится около половины мирового поголовья свиней. На территории Китая насчитывается более пяти вспышек африканской чумы свиней среди домашних свиней в провинциях Ляонин, Хэнань, Цзянсу, Чжэцзян и Аньхуэй [3].

На данный момент растет обеспокоенность тем, что вирус африканской чумы свиней способен увеличить свой ареал распространения. Есть вероятность того что вирус может проникнуть в соседние страны (например, в Северную Корею).

В связи с особенностями биологии вируса АЧС, препятствующими созданию эффективной вакцины, приоритетную роль в борьбе с распространением заболевания играют противоэпизоотические мероприятия.

**Цель работы** - провести поиск новых маркерных генов, применимых в молекулярно-эпизоотологических исследованиях вируса АЧС.

Ранее нами был проведён анализ последовательностей ряда маркерных генов различных изолятов вируса АЧС, выделенных на территории Российской Федерации в 2016 - 2017 годах. В качестве мишеней для амплификации были выбраны гены (I73L/I329R;B602L;CD2), в которых наблюдаются изменения в ходе персистенции вируса в восприимчивой популяции. Однако анализ последовательностей данных генов не позволяет получить представление о биологических характеристиках и свойствах циркулирующих изолятов. Кроме того, в последние годы на территории Российской Федерации практически все вспышки были вызваны изолятами АЧС, гомологичными по указанным участкам, за исключением редких вспышек АЧС в нетипичных районах (Иркутская область и другие).

**Материал и методика исследований.** В работе использованы образцы 10% суспензии различных органов, поступивших в ФГБНУ ФИЦ ВиМ в ходе мониторинговых исследований. Во всех исследованных образцах показано наличие генома вируса АЧС при исследовании методом ПЦР в режиме реального времени. Выделение общей ДНК производили набором “ДНК-сорб” («Интерлабсервис», Россия), согласно инструкции производителя.

Анализ продуктов реакции осуществлялся при помощи электрофореза в 1,5 % агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА и напряжении 150 В.

Результаты ПЦР оценивались путем обнаружения специфических полос в треках с исследуемыми образцами относительно фрагмента маркера молекулярного веса и расчетного значения длины ПЦР-продукта относительно каждого амплифицируемого фрагмента генома.

Электрофорез проводился в течение 40 минут. Результаты электрофореза учитывались на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм.

Очистка вырезанных из геля ПЦР-продуктов производилась с помощью коммерческого набора “Cleanup - standard” («Евроген», Россия). Постановка сиквенсовой реакции проводилась набором Bigdye terminator v3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems», США) в соответствии с инструкцией производителя.

**Результаты исследований.** С целью поиска новых маркерных генов было решено обратить более пристальное внимание на имеющиеся в геноме вируса мультигенные семейства. Геном вируса АЧС весьма консервативен, имеет центральную варибельную область и две варибельные области на 5' и 3' концах генома. Именно на концевых участках и расположены мультигенные семейства, структура и функции которых всё ещё недостаточно изучены, однако потенциально в них могут происходить изменения в ходе пассирования вируса на естественных хозяевах и в насекомых - переносчиках. Существует несколько

основных мультигенных семейств: (MGF): MGF 360, MGF 110, MGF 300, MGF 530 (или 505) и MGF 100. [4-6]. MGF -110 и 300 локализованы на левом концевом участке, MGF -100 на правом, а MGF -360 и 505 – на обоих концах генома [4, 7, 8].

В ряде работ частично описана функция некоторых из них. MGF360, MGF530 - отвечают за репликацию вируса в насекомых-переносчиках. MGF360, MGF505 - связаны с видоспецифичностью, вирулентностью и преодолением иммунного ответа хозяина. [9, 10]. Кроме того, имеются данные о том, что MGF360, MGF530 оказывают влияние на репликацию вируса в макрофагах [11, 12]. Другим немаловажным фактором, свидетельствующим о важности изучения MGF110 является обнаружение делеционного мутанта по данному мультигенному семейству на территории Эстонии. В отличие от референтного штамма Georgia 2007/1(FR682468.1), у него было выявлено отсутствие около 15 тыс. пар нуклеотидов на 5` конце, что привело к потере 26 генов, включая I83L, I60L и KP177R, а также членов MGF110 (1L-14L), MGF360 (1L-3L) и частично MGF110 (13 L). Более того, экспериментальное заражение животных этим делеционным мутантом показало снижение его вирулентности по сравнению с контрольным заражением [13,14].

Таким образом, можно предположить, что MGF 110 оказывает влияние на вирулентность вируса АЧС.

С целью изучения нуклеотидного состава MGF 110 у циркулирующих в настоящее время изолятов вируса АЧС нами был подобран набор праймеров на основе референтного генома Georgia 2007/1(FR682468.1), фланкирующих перекрывающиеся фрагменты данной области. В качестве матрицы для амплификации был использован музейный штамм «Ставрополь 2008». В результате нуклеотидного секвенирования полученных ампликонов установлено, что наибольший интерес представляет фрагмент, фланкируемый второй парой праймеров (7161-9023, при выравнивании на геном Georgia 2007/1). В результате сравнения данной последовательности изолята «Ставрополь 2008» с геномом Georgia 2007/1 идентичность составила 99%, что говорит о присутствии в данном участке замен, в то время как по другим участкам идентичность составила 100%.

С целью отслеживания изменений, которые могли произойти в данном участке со временем, нами были получены нуклеотидные последовательности данного участка MGF110 от изолятов АЧС, выделенных на территории Российской Федерации в различные годы (Саратов 2017, Волгоград 2017, Омск 2017, Иркутск 2017, Самара 2017, Псков 2016, Краснодар 2011, Ростов 2010). В результате выравнивания этих последовательностей на геном Georgia 2007/1 обнаружены только единичные нуклеотидные замены. Данный факт свидетельствует о стабильности фрагмента MGF110 у изолятов вируса АЧС, циркулирующих на территории Российской Федерации.

**Заключение.** Несмотря на то, что участок, кодирующий MGF 110, расположен на 5'-конце генома вируса АЧС, существенных изменений в его структуре у российских изолятов не наблюдается. Следует также отметить что, после обнаружения делеционного штамма Estonia 2014, утратившего 14560 п.о. на 5'-конце генома, подобные ему изоляты обнаружены не были. Это может свидетельствовать о случайном характере данной мутации, не закрепившейся впоследствии в вирусной популяции.

*Библиографический список:*

1. Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., et al. Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. 1995; Supplement 10.
2. Arias, M. African Swine Fever Eradication: The Spanish model / M. Arias, J.M.Sanchez-Vizcaino // Trends in Emerging Viral Infections of Swine. 1st edn. Ed. A. Morilla, K. Jin and J. Zimmerman. - Ames (Iowa, USA): Iowa State University Press, 2002. - P. 133-139.
3. Wang, T. African swine fever: an unprecedented disaster and challenge to China / T. Wang, Y. Sun, H.J. Qiu // Infect Dis Poverty. 2018 Oct 26;7(1):111. doi: 10.1186/s40249-018-0495-3.
4. Multigene families in African swine fever virus: family 110 / J.M. Almendral, F. Almazan, R. Blasco [et al.] // J. Virol. - 1990. - № 64. - P. 2064-2072.
5. Multigene families in African swine fever virus: family 360 / A. Gonzalez, V. Calvo, F. Almazan [et al.] // J. Virol. - 1990. - № 64. - P. 2073-2081.
6. Two novel multigene families, 530 and 300, in the terminal variable regions of African swine fever virus genome / T. Yozawa, G.F. Kutish, C.L. Afonso [et al.] // Virology. - 1994. - № 202 (2). - P. 997-1002.
7. Simon-Mateo, C. Polyprotein processing in African swine fever virus: a novel gene expression strategy for a DNA virus / C. Simon-Mateo, G. Andres, E. Viñuela // EMBO J. - 1993. - № 12. - P. 2977-2987.
8. Transcriptional analysis of multigene family 110 of African swine fever virus / F. Almazan, J.M. Rodriguez, G. Andres [et al.] // J. Virol. - 1992. - № 66. - P. 6655-6667.
9. Neilan, J. G., L. Zsak, Z. Lu, G. F. Kutish, C. L. Afonso, and D. L. Rock. 2002. Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. J. Virol. 76:3095-3104.
10. Zsak, L., Z. Lu, T. G. Burrage, J. G. Neilan, G. F. Kutish, D. M. Moore, and D. L. Rock. 2001. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. J. Virol. 75:3066-3076.
11. Almendral, J. M., F. Almazan, R. Blasco, and E. Vinuela. 1990. Multigene families in African swine fever virus: family 110. J. Virol. 64:2064-2072.

12. Rouiller, I., S. M. Brookes, A. D. Hyatt, M. Windsor, and T. Wileman. 1998. African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 72:2373–2387.
13. Zani, L. Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. L. Zani, J. H. Forth, L. Forth, I. Nurmoja, S. Leidenberger, J. Henke, J. Carlson, C. Breidenstein, A. Viltrop, D. Höper, C. Sauter-Louis, M. Beer & S. Blome // *Sci Rep.* 2018 Apr 25;8(1):6510. doi: 10.1038/s41598-018-24740-1.
14. Nurmoja I. Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar/ I. Nurmoja, A. Petrov, C. Breidenstein, L. Zani, J.H. Forth, M. Beer, M. Kristian, A. Viltrop, S. Blome // *Transbound Emerg Dis.* 2017 Dec;64(6):2034-2041. doi: 10.1111/tbed.12614. Epub 2017 Jan 24.

## SEARCH FOR NEW MARKER GENES OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS ISOLATES FROM RUSSIAN FEDERATION 2016-2017

*Sibgatullova A.K., Shkalikova M.V., Kudryashov D.A., Titov I.A.*

**Key words:** *African swine fever virus, genotyping, sequencing, marker genes, multigenic family.*

*The aim of the work is to search for new marker genes that could be used to clarify the genotyping of African swine fever virus isolates from the Russian Federation.*