

На правах рукописи

Сибгатуллова Адыля Камилевна

**АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ИЗМЕНЧИВОСТИ ИЗОЛЯТОВ
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ В
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

п. Вольгинский – 2022

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ).

Научный руководитель: **Титов Илья Андреевич**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Верховский Олег Анатольевич**
доктор биологических наук, профессор,
президент АНО «Научно-исследовательский
институт диагностики и профилактики
болезней животных и человека»

Иголкин Алексей Сергеевич
кандидат ветеринарных наук,
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных», заведующий референтной
лабораторией по африканской чуме свиней

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-
исследовательский и технологический
институт биологической промышленности»
(ФГБНУ ВНИТИБП)

Защита состоится « ____ » _____ 2022 г. в « ____ » часов на заседании диссертационного совета 36.1.002.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec. Тел: (4922) 529962

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте www.arriah.ru ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

Автореферат разослан _____ 2022г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Африканская чума свиней (АЧС) - геморрагическое вирусное заболевание домашних свиней и кабанов всех пород и возрастов, вызываемое вирусом АЧС (Alonso C. et al., 2018). Это инфекционное заболевание вызывает высокую смертность, приближающуюся к 100% у домашних свиней и диких кабанов, и считается наиболее серьезной проблемой для свиноводческой промышленности и продовольственной безопасности во всем мире (Jancovich J. K. et al., 2018; Gilliaux G. Et al, 2019). К настоящему времени АЧС зарегистрирована на территории нашей страны, а также в странах Восточной и Западной Европы. Кроме того, в 2018-2019 гг. вирус АЧС обнаружен в странах Юго-Восточной Азии, таких как Вьетнам, Северная Корея, Южная Корея, Лаос и Китай (Jurado C. et al., 2018; Sanchez-Cordon et al., 2018).

АЧС является одной из наиболее значимых и трудно контролируемых болезней домашних свиней. В настоящее время различными исследователями показано, что вирус АЧС обладает разнообразными механизмами уклонения от иммунной системы хозяина, что является основным препятствием для создания средств защиты от болезни (Колбасов Д.В. с соавт., 2014; Arias, M. et al., 2017; Rock, D.L. et al., 2017; Revilla, Y. et al. 2018). Поскольку не существует эффективной вакцины для предотвращения этой инфекции, АЧС остается глобальной угрозой для всех стран. Неудачи в создании средств специфической профилактики стимулируют проведение фундаментальных исследований структуры и функции многочисленных белков вируса АЧС, высокой генетической и антигенной вариабельности, а также механизмов ускользания от иммунной системы организма хозяев (Колбасов Д.В. с соавт., 2018; Chapman D. A. et al., 2011; Rock D.L. et al., 2017).

Степень разработанности темы. В настоящее время одним из наиболее актуальных вопросов, стоящих перед отечественными и зарубежными исследователями, является изучение генетического разнообразия изолятов вируса АЧС, определение факторов передачи вируса, молекулярных механизмов проявления патогенных свойств, а также генетической изменчивости вируса АЧС (Malogolovkin A. et al., 2012).

Изначально, в качестве маркерных генов для характеристики изолятов и штаммов вируса АЧС испанскими учеными было предложено использовать ряд последовательностей, а именно фрагменты генов B602L и EP402R, а также межгенный участок I73R/I329L. В совместной работе российских и испанских ученых была описана методика генетической дифференциации циркулирующих штаммов и изолятов вируса АЧС в Российской Федерации по наличию замен в межгенном участке I73R/I329L (Gallardo C. et al., 2014).

Ген B602L, расположенный в центральной консервативной области, используется для генетического типирования. Показано, что число tandemных повторов в последовательности данного гена может варьировать. Отмечают всего двадцать два возможных варианта данного участка (Nix R.J. et al., 2006). Однако у всех до настоящего времени исследованных изолятов, выделенных на территории Российской Федерации обнаружен только один из вариантов центральной переменной области гена B602L (CVR1, central variable region) (Nix R.J. et al., 2006).

Генетическая изменчивость вируса АЧС определяет изменения и его биологические свойства. Так, в своих работах зарубежные авторы описывают исследования, проводимые на домашних свиньях с применением изолятов, у которых отсутствовали несколько тысяч пар нуклеотидов в геноме вируса АЧС. Заражение домашних свиней такими изолятами показало, что они обладают сниженной вирулентностью (Zani L. et al., 2018).

Понимание генетических особенностей возбудителя важно для определения источника, распространения и изучения эволюции изолятов АЧС, а также выяснения путей их циркуляции в Российской Федерации, странах Восточной Европы и Юго-Восточной Азии. Более подробное изучение генома вируса АЧС на основе анализа ряда маркерных генов позволит комплексно оценить генетические изменения вируса, их возможные фенотипические проявления. Изучение генетической изменчивости генов и также определение их корреляции с патогенными свойствами вируса, сроками персистенции и территориальной принадлежности позволят получить молекулярно-эпизоотологическую картину распространения заболевания на территории Российской Федерации.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось получение молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса африканской чумы свиней, циркулирующих на территории Российской Федерации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести секвенирование маркерных участков генома (B602L, EP402R, I73R/I329L, MGF110, MGF505) изолятов вируса АЧС, циркулировавших на территории Российской Федерации в период с 2008 по 2019 гг.

2. Оценить возможность использования генетических маркеров для отслеживания динамики распространения изолятов вируса АЧС, выделенных на территории Российской Федерации.

3. Провести филогенетический анализ изолятов и штаммов вируса АЧС на основе нуклеотидных последовательностей гена B602L и межгенного участка I73R/I329L.

4. Провести анализ пространственно-временного распространения отечественных изолятов вируса АЧС на основании гетерогенности межгенного участка I73R/I329L.

Научная новизна результатов исследований. Проведенный сравнительный анализ семидесяти девяти отечественных изолятов по пяти маркерным генам позволил выявить различия в нуклеотидных последовательностях у двадцати восьми из них.

Впервые обнаружены единичные изменения во фрагментах последовательностей в правой варибельной области мультигенного семейства 110 у одиннадцати изолятов («Stavropol 01/08», «Stavropol 23.10.08», «Rostov 26.06.10», «Pskov 10.06.16», «Samara 16.03.17», «Saratov 18.02.17», «Omsk 17.09.17», «Pskov 23.08.16», «Saratov 22.02.17», «Krasnodar 18.09.11», «Volgograd 05.06.17»), выделенных от домашних свиней и диких кабанов в Российской Федерации в различные годы. В результате проведенных исследований впервые были обнаружены две нуклеотидные встройки, представляющие собой тандемный повтор (AATATATAGA) в интергенном регионе I73R/I329L длиной 10 нуклеотидов у двух изолятов, выделенных в Саратовской области. Также был обнаружен изолят «Tumen 15.11.2017» не содержащий встройку (TATATAGGAA) в межгенном участке I73R/I329L. Этот изолят являлся, гомологичным штамму «Georgia 2007/1», у которого также отсутствовала встройка в данном участке.

Впервые определены и опубликованы в базе данных «GenBank» фрагменты нуклеотидных последовательностей изолятов «Saratov 20.01.2017» и «Saratov 18.02.2017» под номерами «MT901177» и «MT901178», соответственно.

Проведен анализ пространственно-временного распространения современных отечественных изолятов вируса АЧС на основании гетерогенности межгенного участка I73R/I329L и MGF110 имеющего тандемные повторы и единичные замены в геноме. Показана возможность отслеживания динамики распространения вируса АЧС по наличию и отсутствию данных встроек и единичных замен.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате секвенирования пяти маркерных генов была получена информация о наличии изолятов вируса АЧС, содержащих генетические мутации, что позволяет проводить дифференциацию изолятов и, возможно, отслеживать динамику их распространения.

В международную базу данных «GenBank» добавлены фрагменты геномных последовательностей двух отечественных изолятов вируса АЧС из Саратовской области. Показано, что фрагменты нуклеотидных последовательностей изолятов «Saratov 20.01.17» и «Saratov 18.02.17» в межгенной области I73R/I329L содержат две десятинуклеотидные вставки.

При проведении филогенетического анализа на основе межгенного участка I73R/I329L и гена B602L установлено, что большинство отечественных изолятов сгруппированы в один кластер и обладают 100% идентичностью.

Методология и методы исследования. В работе использованы молекулярные методы исследований (выделение нуклеиновых кислот, ПЦР, гель-электрофорез, ПЦР в режиме реального времени, секвенирование) и биоинформатические методы (анализ нуклеотидных последовательностей методами программы «ClustalW», филогенетический анализ методом максимального правдоподобия).

Методология настоящего исследования также включает использование современных геоинформационных технологий. В процессе выполнения работы проведен пространственно-временной кластерный анализ. В работе использовалось программное обеспечение: «ArcGIS» (ESRI).

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей изолятов вируса АЧС, выделенных на территории Российской Федерации.

2. Обнаружены генетические изменения в гене B602L, межгенном участке I73R/I329L и мультигенном семействе MGF110 у отечественных изолятов вируса АЧС.

3. Распространение вируса АЧС на территории РФ согласно идентификации мутаций в маркерных участках генома.

4. Формирование кластеров распространения изолятов вируса АЧС в Российской Федерации по обнаруженным генетическим изменениям.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Достоверность всех экспериментальных данных подтверждена статистическими исследованиями. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (г. Москва, 2017г.); Международной научной конференции «Молодежь и наука XXI века», (г. Ульяновск, УлГАУ, 20-21 сентября, 2017); Международной научной конференции «Молодежь и наука XXI века» (г. Ульяновск, УлГАУ, 13 декабря, 2018 г.)

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 11 научных работ, из них 1 статья - в международном журнале, цитируемом в системах Web of Science и Scopus, в том числе 7 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки для докторских и кандидатских диссертаций.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена соискателем самостоятельно в лаборатории Диагностики и мониторинга ФГБНУ ФИЦВиМ. Автор выражает искреннюю благодарность сотруднику лаборатории Молекулярно-

генетических исследований микробиологу Кудряшову Д.А. и главному научному сотруднику лаборатории Геномики вирусов, кандидату биологических наук Холод Н.С. за консультативную и методическую помощь при выполнении отдельных этапов работы.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении ФГБНУ «ФИЦВиМ» с 2017-2019 гг. и поддержана грантом президента РФ МК-2000.2017.11 от 22.02.17.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 131 странице компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты исследований и их обсуждение, заключение, список сокращений, список литературы и приложения: иллюстрирована 9 таблицами и 34 рисунками. Список использованной литературы включает 160 источников, из них 132 иностранных.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Материалы исследований. В качестве материалов исследований были использованы изоляты и штаммы вируса АЧС, полученные в ходе мониторинговых исследований из лаборатории «Диагностики и мониторинга» ФГБНУ «ФИЦВиМ». Также в работе был использован штамм вируса АЧС «Stavropol 01/08» полученный из ГКМ ФИЦВиМ и ДНК штамма «Estonia 2014» любезно предоставленная Jan Hendrick Forth из института Фридриха Леффлера, (Германия). Полевые пробы органов были получены от павших домашних и диких свиней, поступавших из различных областей. Материалом для выделения ДНК вируса АЧС были использованы селезенка, лимфоузлы и костный мозг.

2.2 Методы исследований

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение ДНК из крови и суспензии органов проводили набором «ДНКсорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия) и «РИБО-сорб» («ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Выделение нуклеиновых кислот из геля, в дальнейшем используемых для очистки и постановки сиквенсовой реакции.

Постановка ПЦР. Амплификацию целевых фрагментов генома вируса АЧС (B602L; EP402R; I73R/I329L; MGF110, MGF505) проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл. Постановку ПЦР проводили на полученных ДНК с использованием специфических праймеров, рекомендованных OIE ASF reference lab (Madrid, Spain). Анализ ДНК осуществляли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле, содержащем 0,001% интеркалирующего красителя бромистого этидия. Электрофорез проводили при силе тока 50 мА и напряжении 150 В в течение

40 минут. ДНК визуализировали на документирующей системе «ChemiDoc MP» («Bio-Rad Laboratories», США) в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм.

Экстракция ДНК из агарозного геля. Очистку вырезанных из геля ПЦР - продуктов осуществляли коммерческим набором «Cleanup – standard» (ЗАО «Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Измерение концентрации ДНК проводили на приборе «NanoDrop Lite UV-Vis» (Thermo Scientific).

Нуклеотидное секвенирование. Секвенирование нуклеотидных последовательностей I73R/I329L, B602L, EP402R, MGF110, MGF505 (9R-10R) вируса АЧС проводили с использованием специфических для определённого фрагмента генома праймеров. Реакцию секвенирования проводили набором «BigDye3.1» (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе «Genetic Analyzer 3130» («Applied Biosystems», США) согласно рекомендациям изготовителя.

Программное обеспечение. Сборку и выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов вируса АЧС выполняли с использованием компьютерной программы «BioEdit v.7» (Hall T.A. 2018). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями генов вируса АЧС взятых из базы данных «GenBank» с использованием программы «BLASTN» (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zhang Z. et al. 2000). Для построения филогенетических деревьев применяли метод «Bootstrap» (максимального правдоподобия) с анализом 1000 случайных выборок, с использованием программы «Mega 7.0» (Tamura K. et al. 2013). Для создания географических карт и проведения пространственно-временного анализа данных использовали геоинформационную платформу «ArcGIS 10».

Статистическую сборку полученных результатов проводили общепринятыми методами в программе «Microsoft Office Excel 2018».

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с особенностями биологии вируса АЧС, препятствующими созданию эффективной вакцины, главную роль в борьбе с распространением заболевания играют противоэпизоотические мероприятия. Немаловажным направлением работ в данной области является молекулярно-эпизоотические исследования, направленные на отслеживание и характеристику происходящих вспышек АЧС.

Известно, что вирус АЧС имеет ряд маркерных генов, которые располагаются в центральном участке и двух варибельных областях генома. Эти гены используются в качестве генетических маркеров, благодаря тому, что в них обнаруживаются повторы, делеции и замены. Поэтому проведение молекулярно-

генетических исследований различных изолятов и штаммов, циркулирующих в мире, позволит, изучить изменчивость вируса АЧС и его распространение.

В связи с вышеизложенным, в данной работе был проведен анализ нуклеотидных последовательностей различных изолятов, циркулирующих на территории РФ. Для этого нами была проведена выборка 79 отечественных изолятов, выделенных на территории РФ с 2008 по 2019 гг. В качестве мишеней для амплификации были выбраны следующие маркерные участки генома: гены B602L, EP402R, мультигенные семейства MGF110 и MGF505 (9R-10R) и межгенный регион I73R/I329L.

3.1.1 Анализ нуклеотидных последовательностей гена B602L вируса АЧС

Ген B602L расположен в центральной консервативной области гнома вируса АЧС и давно используется в качестве генетического маркера, позволяющего более точно выявлять филогенетические взаимоотношения между штаммами вируса АЧС (Nix R.J. et al. 2006). Для анализа маркерного гена B602L нами были выбраны пятьдесят два изолята, выделенных в 2016-2017 гг. в различных федеральных округах РФ. Среди них 36 изолятов были выделены от домашних свиней и 16 изолятов – от диких кабанов. Далее осуществляли, выделение ДНК из всех отечественных изолятов и проводили амплификацию фрагмента гена B602L. Полученные ПЦР-фрагменты использовали для секвенирования и затем анализировали с применением программы «Bioedit» и алгоритма «ClustalW». Полученные нуклеотидные последовательности гена B602L пятидесяти двух отечественных изолятов сравнивали с референс-штаммом «Georgia 2007/1» (FR682468.1), который впервые был обнаружен в 2007 году. Кроме того, для сравнения полученных нуклеотидных последовательностей отечественных изолятов были использованы опубликованные в «GenBank» последовательности изолятов вируса АЧС из Республики Дагестана и Литвы. При проведении сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей пятидесяти двух отечественных изолятов вируса АЧС установлено, что у двенадцати изолятов, выделенных от девяти домашних свиней и трех диких кабанов, были обнаружены единичные замены (С на Т в позиции 353) по сравнению с родоначальным референс-штаммом «Georgia 2007/1» и изолятом из Литвы (LT14/1490).

В результате проведенного исследования оказалось, что первые единичные замены в маркерном гене B602L изолята нами были обнаружены в материале от павшего дикого кабана, выделенного в Воронежской области 06.06.16 г. Аналогичные нуклеотидные замены были позднее найдены в ряде образцов поступивших в 2017 году от павшей домашней свиньи из Саратовской области (20.01.17), от диких кабанов из Владимирской области (25.01.17г; 30.01.17г.), от

домашних свиней из Саратовской области (2.02.17; 18.02.17г.), от дикого кабана из Орловской области (20.02.2017г.) и от домашних свиней из Волгоградской области (5.06.17г.; 14.06.17г.; 5.07.17г.; 13.07.17г.; 15.07.17г.) (Рисунок 1).

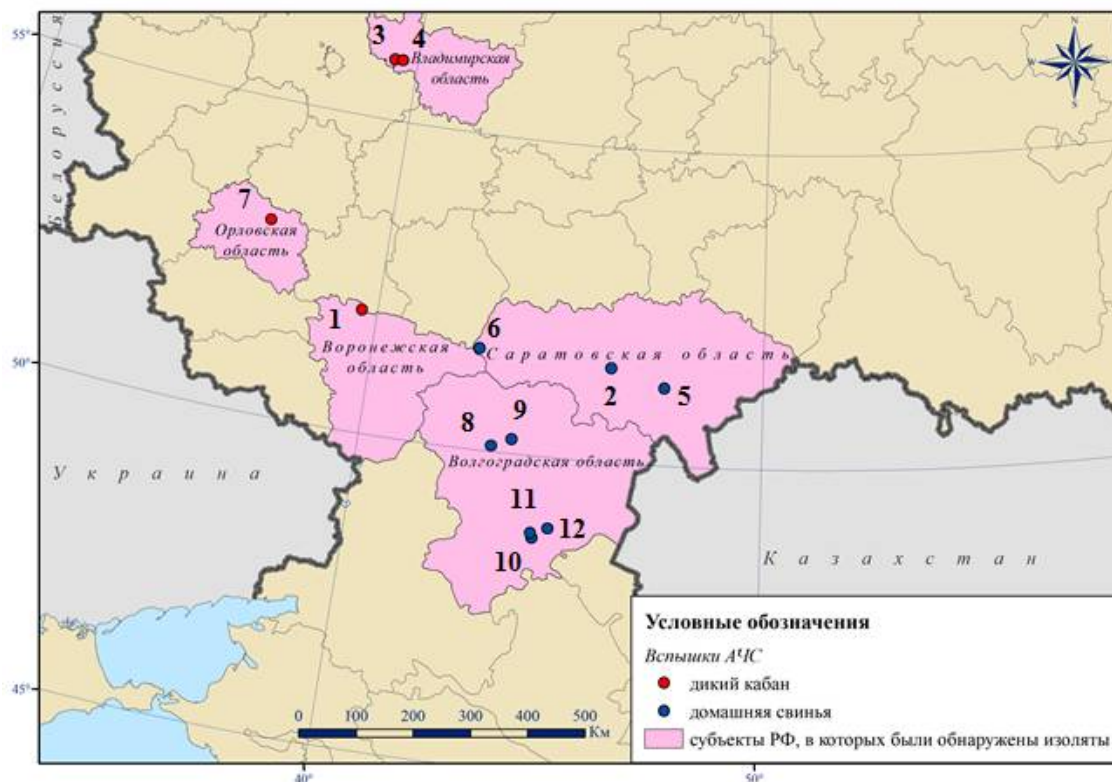


Рисунок 1 – Карта регионов РФ, в которых обнаруживали изоляты вируса АЧС, несущие единичные изменения в маркерном гене В602L. Примечание: цифрами обозначен хронологический порядок вспышек; красным отмечены вспышки среди диких кабанов.

Пространственно-временной анализ изолятов вируса АЧС, содержащих нуклеотидные замены, позволил выделить ряд закономерностей. Впервые замена С на Т в позиции 353 вирусного генома была обнаружена у изолята, выделенного от павшего дикого кабана из Воронежской области летом 2016 года. Через полгода от этой вспышки, вирус АЧС с идентичной заменой был найден у диких кабанов из Владимирской области (две вспышки в январе 2017 года) и домашних свиней из Саратовской области (3 случая в январе-феврале 2017 года). В это же время, в феврале 2017 года, была зарегистрирована вспышка у диких кабанов в Орловской области, в материале которой был также идентифицирован вирус, содержащий замену С на Т. В данный момент трудно заключить, является ли изолят вируса АЧС с обнаруженной нуклеотидной заменой эндемичной для Воронежской области, однако при этом можно проследить его распространение. Поскольку Воронежская, Владимирская и Орловская области граничат друг с другом, и во всех трех областях вирус с заменой был обнаружен исключительно у диких кабанов, можно предположить, что он распространялся именно через популяцию диких животных (при их миграции в поиске пищи и т.п.). Возможно, в Саратовской области

произошел перенос данного изолята к домашним свиньям, циркуляция которого происходила в Духовницком и Федоровском районах. Затем через полгода после вспышек АЧС у домашних свиней в Саратовской области, летом 2017 года изолят вируса АЧС, содержащий замену, был обнаружен у домашних свиней в материале из 5-ти вспышек АЧС в Волгоградской области (июнь-июль 2017 г.). Циркуляция изолята вируса АЧС с нуклеотидной заменой происходила на территории Волгоградской области среди популяции домашних свиней. Однако в материале, выделенном из 40 других вспышек АЧС, произошедших в то же время (июнь 2016 г., январь-октябрь, ноябрь, декабрь 2017) нуклеотидных замен в гене В602L обнаружено не было. Интересно, что изоляты, не содержащие единичных замен в гене В602L были обнаружены в Саратовской области в (январе-феврале 2017 года) позднее изолятов с единичными заменами. Также изоляты, выделенные в мае и июле 2017 года от домашней свиньи и дикого кабана во Владимирской области, не содержали единичных замен, тогда как изолят, обнаруженный в январе 2017 года на той же территории содержал единичную замену. Скорее всего, возможными причинами замены изолятов послужила их циркуляция на соседние территории, либо уничтожение животных, у которых были выделены изоляты с заменами.

Результаты проведенных нами исследований показывают неоднородность изолятов вируса АЧС, выделенных в различных регионах Российской Федерации. Возможно, дальнейший анализ нуклеотидных последовательностей маркерного гена В602L позволит проводить дифференциацию циркулирующих на сегодняшний день в РФ. Использование маркерного гена В602L может позволить отслеживать динамику распространения отечественных, европейских и азиатских изолятов вируса АЧС. Известно также, что секвенирование центральной варибельной области маркерного гена В602L позволяет проследить возможные изменения среди изолятов одного генотипа.

3.1.2. Анализ наличия вставки в межгенной области I73R/I329L у изолятов вируса АЧС, выделенных в РФ с 2016 по 2019 гг.

Впервые в своей работе Gallardo с соавт. в 2014 году по результатам секвенирования изолятов вируса АЧС, удалось обнаружить новый тандемный повтор в межгенном участке I73R/I329L, наличие которого позволяет проводить дифференциацию современных российских и европейских изолятов вируса (Gallardo. et al. 2014). Такая структура данного участка была обозначена как TRS+. Мы провели анализ нуклеотидной последовательности межгенного участка I73R/I329L у отечественных изолятов. Для исследования была проведена выборка пятидесяти четырех изолятов вируса АЧС, выделенных на территории РФ с 2016 по 2017 гг. из Центрального, Приволжского, Уральского, Северо-Западного, Южного, Сибирского, федеральных округов. В ходе нашей работы было обнаружено, что

изолят «Tumen 2017», выделенный от домашней свиньи в Ямало-Ненецком автономном округе, не содержал встройку TATATAGGAA в позициях 204-213, межгенной области I73R/I329L. Эта область генома оказалась идентичной исходному референс-штамму «Georgia 2007/1», а также последовательностям изолятов «Abk07» и «Dagestan09», полученных из базы данных «GenBank». У остальных пятидесяти трех отечественных изолятов эта десятинуклеотидная вставка TATATAGGAA была обнаружена. В нуклеотидных последовательностях фрагмента межгенного участка I73R/I329L у двух изолятов, выделенных в 2017 году в Саратовской области («Saratov 20.01.2017» и «Saratov 18.02.2017»), была обнаружена дополнительная вставка, также размером в десять нуклеотидов (AATATATAGA) в позиции 232 – 241. Данная вставка отсутствовала в геноме как референс – штамма «Georgia 2007/1», так и трех изолятов «Abk07», «Dagestan09» и «Lt14/1490» из «GenBank». Интересно, что эта новая десятинуклеотидная встройка в межгенной области I73R/I329L в последовательностях остальных пятидесяти двух отечественных изолятов не обнаружена.

Вместе с тем, в Саратовской области циркулировали изоляты выделенные в 2017 году со стандартной структурой данного участка (TRS+), обладающие вставкой в межгенной области. Кроме того, в результате секвенирования межгенной области I73R/I329L изолятов вируса АЧС нами также были обнаружены единичные у ряда отечественных изолятов. Как видно из рисунка 2, однонуклеотидная замена (G на A в позиции 107) обнаружена у восьми изолятов: «Krim 06.01.17», «Saratov 20.01.17», «Vladimir 30.01.17», «Irkutsk 25.03.17», «Belgorod 23.11.17» и «Belgorod 28.11.17» по сравнению с референтной последовательностью «Georgia 2007/1».

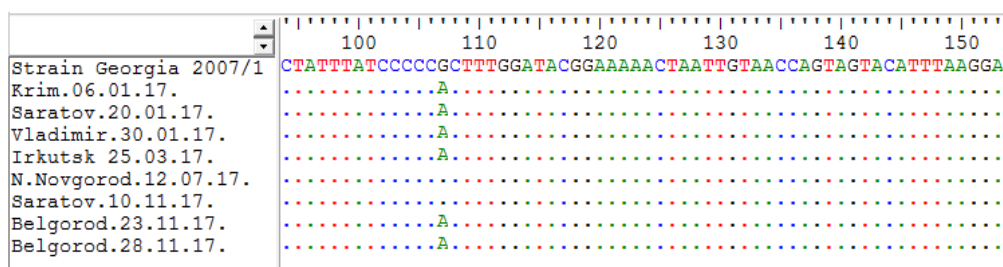


Рисунок 2 – Сравнение нуклеотидных последовательностей межгенного участка I73R/I329L отечественных изолятов (позиции 107). Примечание – точками (·) обозначены идентичные нуклеотиды

У другого отечественного изолята, выделенного из Саратовской области («Saratov 10.11.17»), была обнаружена дополнительная замена единичного нуклеотида (C на T в позиции 190) по сравнению с референтной последовательностью «Georgia 2007/1» (FR682468.1). Кроме того, у изолята «N. Novgorod 12.07.17» был обнаружен ряд дополнительных единичных замен. Эти замены произошли с A на C в позициях 217, 219, 222, 227, 247.

Единичная замена, G на A в позиции 107, обнаруженная нами в межгенной области I73R/I329L у 8 изолятов из разных регионов, является уникальной для отечественных изолятов. Интересно, что эта замена также расположена недалеко от обнаруженных вставок, что свидетельствует о изменчивости данного участка генома. Будет интересно проследить, закрепится ли данная замена в геноме популяции вируса АЧС и будет ли данный изолят обнаруживаться на других территориях Российской Федерации и зарубежных странах. Остальные единичные замены, обнаруженные, в нашей работе скорее носят случайный характер и, возможно, не будут обнаруживаться в других изолятах. Изолят с единичной заменой в межгенном участке I73R/I329L впервые нами был обнаружен в материале от павшей домашней свиньи, выделенный в январе 2017 г. в Республике Крым. В этом же месяце более существенные изменения в межгенном участке I73R/I329L были выявлены в 2017 г. в материале от павшей домашней свиньи на территории Саратовской области. Обнаруженная вставка (AATATATAGA) в позиции 232-241 и единичная замена G на A в позиции 107 были обнаружены в вирусном материале от домашних свиней. Следующий изолят с такой же единичной заменой G на A был выделен на территории Центрального ФО.

В январе 2017 г. во Владимирской области была зарегистрирована вспышка АЧС у дикого кабана. Через месяц от предыдущей вспышки, вирус АЧС со вставкой AATATATAGA снова был обнаружен в Саратовской области у домашней свиньи. Выделенные в январе и феврале изоляты из образцов от домашних свиней, являются генетически идентичными в межгенной области I73R/I329L. Возможно, помимо двух изолятов обнаруженных на территории Приволжского ФО имеются и другие изоляты, обладающие десятинуклеотидной вставкой в данной области, которые не рассмотрены в этой работе. Затем в марте 2017 г. был обнаружен изолят от домашней свиньи с единичной заменой G на A в позиции 107, обнаруженный на территории Иркутской области. Изолят с множественными единичными заменами с A на C в межгенном участке I73R/I329L в позиции 217, 219, 222, 227, 247 был выделен от домашней свиньи в июле 2017 г. на территории Нижнего Новгорода. Следующая вспышка АЧС была зафиксирована в ноябре 2017 г. на территории Саратовской области в Марксовском районе с. Васильевка. Изолят, выделенный от домашней свиньи обладал единичной заменой C на T в межгенном участке I73R/I329L в позиции 190. Далее, в ноябре 2017 г., были зарегистрированы две вспышки в Белгородской области, изоляты содержащие единичные замены G на A в позиции 107 были обнаружены у домашних свиней. Еще одним важным событием наряду с выявлением ряда единичных замен из различных ФО, а также нуклеотидной вставки в Саратовской области стало обнаружение изолята с отсутствием вставки размером в 10 нуклеотидов в Тюменской области.

Выявленный нами единственный измененный изолят в ноябре 2017 г. на территории Тюменской области, не содержащий вставку ТАТААГГАА в позиции 204-213 был выделен от домашней свиньи в Ямало-Ненецком автономном округе, городе Ноябрьск.

В патматериале выделенном из 17 других зарегистрированных вспышек АЧС в Центральном, Приволжском, Уральском, Северо-Западном, Южном и Сибирском ФО с 2017 по 2018 гг. нуклеотидных замен и вставок в маркерном гене I73R/I329L обнаружено не было. Нуклеотидная последовательность, расположенная между генами I73R и I329L, уже используется в качестве генетического маркера для изолятов и штаммов вируса АЧС, в том числе и для близкородственных. Высокая мутационная изменчивость данного участка представляет большой интерес для многих исследователей для построения филогенетических взаимоотношений и отслеживание эволюционных изменений изолятов вируса АЧС.

3.1.3 Анализ мультигенного семейства 110 полевых изолятов вируса АЧС

Для изучения последовательности MGF110 у отечественных изолятов вируса АЧС, нами была проведена выборка из пятидесяти одного изолята выделенных от диких кабанов, в период с 2012 по 2016 гг. из Центрального, Приволжского, Северо-Западного, Южного и Северо-Кавказского федеральных округов. Вирусная ДНК была выделена и проведены ее исследования методом ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров и TAQ-man зондов, позволяющих дифференцировать мутантный (с делетированными генами) и «дикий» (с обычной структурой) варианты MGF110. В результате исследования методом ПЦР в режиме реального времени было установлено, что все исследованные изоляты (51) принадлежат к «дикому типу» вируса АЧС. Таким образом, установлено, что изоляты вируса АЧС, циркулировавшие в Российской Федерации в 2012-2016 гг., не обладали делецией семейства MGF110. Возможно, секвенирование генов всего семейства в дальнейшем позволит выявить изменения и использовать MGF110 как генетический маркер изолятов вируса АЧС.

На следующем этапе было проведено секвенирование участка MGF110 отечественных изолятов вируса АЧС. Для выполнения работы были использованы праймеры, комплементарные генам 4L и 5L мультигенного семейства 110. Ранее было показано, что у двух штаммов «Estonia 2014» и «OURT88/3» отсутствует ген 4L (Zani L. et al. 2018). В нашей работе была использована выборка из 11 изолятов, выделенных во время вспышек АЧС из Центрального, Приволжского, Северо-Западного, Сибирского, Южного, Северо-Кавказского федеральных округов 2008, 2010, 2011, 2016 и 2017 годах. При сравнении нуклеотидных последовательностей отечественных изолятов со штаммом «Georgia 2007/1» были обнаружены шесть единичных замен (Т на А в позиции 9068), (Т на А в позиции 9070), (G на А в

позиции 9077), (G на A в позиции 9080), (T на C в позиции 9086), (T на C в позиции 9091). Дополнительно к этим мутациям у шести изолятов «Stavropol 23.10.08», «Rostov 26.06.10», «Samara 16.03.17», «Saratov 18.02.17», «Saratov 22.02.17» и «Volgograd 05.06.17» были обнаружены множественные замены (CC на GT в позиции 9161-9162) и единичная замена у всех изолятов (G на A в позиции 9176) по сравнению с референтной последовательностью «Georgia 2007/1» (FR682468.1)

У всех представленных изолятов наблюдались единичные замены (C на A в позиции 9253), единичная замена у изолята «Saratov 18.02.17» (C на T в позиции 9269) и единичные замены у пяти отечественных изолятов «Stavropol 23.10.08», «Saratov 18.02.17», «Saratov 22.02.17», «Samara 16.03.17», «Volgograd 05.06.17» (C на T в позиции 9282). Единичная замена была обнаружена у изолята «Samara 16.03.17» (A на G в позиции 9361) при выравнивании на референс – штамм «Georgia 2007/1». Результаты, полученные в ходе наших исследований, указывают на генетическую вариабельность в гене 4 L отечественных изолятов вируса АЧС, циркулирующих на территории РФ с 2008 по 2017 гг. Обнаружение множественных замен в нуклеотидных последовательностях отечественных изолятов свидетельствует о потенциальной возможности применения фрагмента мультигенного семейства 110 для более детального генотипирования изолятов вируса АЧС, циркулирующих в Российской Федерации.

Таким образом, результаты нашей работы показывают, что большинство исследованных отечественных изолятов вируса АЧС не обладают ярко выраженной генетической изменчивостью. Тем не менее, полученные данные о молекулярно-генетических изменениях в трех маркерных генах можно использовать для картирования и кластерного анализа изолятов вируса АЧС, что в дальнейшем даст возможность оценить географическую локализацию и временное происхождение новых вариантов вируса АЧС. Однако, на наш взгляд, биологическая значимость мутаций во многом остается неизвестной, ввиду отсутствия информации.

3.1.4 Отечественные изоляты вируса АЧС в филогенетическом анализе по гену B602L

С целью определения филогенетических отношений изолятов и штаммов вируса, отечественных изолятов вируса АЧС выделенных в 2016 по 2017 гг. и данных взятых из «GenBank» был проведен филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей гена B602L с использованием статистического метода «максимального правдоподобия». Анализ изолятов вируса АЧС проводился программой «MEGA v.5.2». Согласно филогенетическому анализу по гену B602L все исследованные изоляты и штаммы вируса АЧС по степени гомологии разделились на три кластера. Так, сорок восемь изолятов отечественного происхождения были сгруппированы в один кластер с изолятами и штаммами из

стран Европы и Азии (Китая, Бельгии, Грузии и Эстонии). Анализ нуклеотидных последовательностей этих изолятов показал высокую консервативность (100 % гомология).

В кластере 2 расположились оставшиеся двенадцать отечественных изолятов, у данных изолятов имеются нуклеотидные замены. По результатам филогенетического анализа в третий кластер вошел единственный изолят выделенный из Италии. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и проведение филогенетического анализа показало, что изоляты, выделенные на территории Российской Федерации с 2016 по 2017 года принадлежат ко второму генотипу. Таким образом, филогенетический анализ европейских и азиатских изолятов и штаммов вируса АЧС позволил провести группирование, и установить их филогенетическое родство между собой.

3.1.5 Отечественные изоляты вируса АЧС в филогенетическом анализе по межгенному участку I73R/I329L

На следующем этапе работы, на основании множественного выравнивания и анализа варибельного межгенного участка I73R/I329L полученных нами нуклеотидных последовательностей генома вируса АЧС с использованием программы «MEGA v. 5.0» была построена дендрограмма, отражающая филогенетические отношения изолятов и штаммов, взятых для сравнения. При построении филогенетического древа нами были выбраны последовательности изолятов и штаммов из стран Европы и Азии, взятые из «GenBank». Все исследуемые последовательности изолятов и штаммов вируса АЧС разделились на 2 кластера. Все изоляты отечественного происхождения вошли в один кластер совместно со штаммами и изолятами, взятыми из «GenBank». Во второй кластер вошли европейские изоляты «67/Nu/11» и «47039/SS/13» (выделенные от домашней свиньи и дикого кабана) из Италии, взятые из «GenBank». Изоляты, выявленные на территории Российской Федерации в период с 2016 по 2018 гг. оказались филогенетически близки к группе штаммов и изолятов европейского и азиатского происхождения. Исходя, из полученных данных можно сделать вывод о том, что все отечественные изоляты вируса АЧС являются идентичными.

3.1.6 Пространственно-временные характеристики изолятов вируса АЧС, циркулирующих на территории Российской Федерации по межгенному участку I73R/I329L и MGF110

В работе была использована база данных вспышек АЧС среди домашних свиней и диких кабанов на территории РФ в период 2016-2019 гг., составленная на основании сообщений Россельхознадзора и сопроводительных документов. Для изучения развития эпизоотий АЧС среди домашних свиней и кабанов, позволяющих определять тенденции распространения инфекции и изменения

эпизоотической ситуации, использовали современные компьютерные технологии – географическую информационную систему «ArcGIS».

Для изучения гетерогенности изолятов вируса АЧС, вызвавших вспышки болезни на территории различных областей были проанализированы 36 изолятов и сравнены с данными, доступными в международных базах. С помощью программы «ArcGis» был осуществлен поиск изолятов, выделенных от домашних и диких кабанов в 2016 по 2018 гг.: 1) изолятов, содержащих нуклеотидную вставку в межгенном участке I73R/I329L и единичные замены; 2) изолятов, не содержащих замены и вставку в межгенном участке I73R/I329L. В результате картирования имеющихся данных согласно географическому происхождению с помощью программы «ArcGis» нами были сформированы две группы генетических кластеров, образованных изолятами вируса АЧС, отличающихся по наличию генетических маркеров. В первый кластер вошли 26 изолятов, не имеющих изменений в межгенном участке I73R/I329L, а во второй кластер вошли 10 изолятов с дополнительными вставками и единичными нуклеотидными заменами. Во втором кластере группообразующими выступили два значимых изолята, выделенных в Саратовской области от домашних свиней («Saratov 20.01.17» и «Saratov 18.02.17»), которые являются идентичными по межгенному участку I73R-I329L. Кроме того в эту группу вошли также изоляты вируса АЧС из шести областей имеющие единичные замены.

В результате анализа тридцати шести изолятов выделенных от кабанов и домашних свиней, было установлено, что изменения в нуклеотидных последовательностях наблюдали чаще в материалах изолятов, выделенных от домашних свиней. Полученные результаты географического картирования показали, что малая часть вспышек заболевания во временной период 2016-2018 гг. были вызваны изолятами вируса, обладающими вставкой в межгенной области I73R/I329L. На основе полученных данных можно утверждать, что наличие TRS вставки между генами I73R и I329L позволяет дифференцировать полевые изоляты вируса АЧС внутри II генотипа и отслеживать динамику распространения мутированных изолятов на территории РФ. На сегодняшний день изоляты вируса АЧС с генетической изменчивостью в участке I73R/I329L (TRS+) успешно вытесняют первоначальную исходную форму вируса.

Однако на территории страны все еще фиксируются вспышки, вызванные вирусом первоначального типа. Генетические маркеры гетерогенности вирусной популяции позволяют группировать изоляты вируса согласно структуре генома. Вариабельные области генома вируса АЧС отличаются у изолятов с разной историей происхождения. Так, изоляты вируса АЧС в Саратовской области («Saratov 20.01.17» и «Saratov 18.02.17») генетически идентичны по межгенному

участку I73R/I329L, что свидетельствует об общности их происхождения. Для того чтобы изучить динамику распространения отечественных изолятов с различным географическим происхождением обладающими мутациями в MGF110 нами был проведен пространственно-временной анализ. Множество единичных замен было обнаружено у отечественных изолятов выделенных с 2008 по 2017 гг. Впервые восемь единичных замен было обнаружено у изолята выделенного от домашней свиньи из Ставропольского края в 2008 году. Далее на этой же территории была зарегистрирована вспышка вируса АЧС. Обнаруженный изолят с одиннадцатью заменами был найден у домашней свиньи осенью в 2008 году. Спустя два года после обнаружения изолята на территории Ростовской области в июле 2010 года был выявлен изолят с десятью единичными заменами выделенный от домашней свиньи. Осенью 2011 года была зафиксирована вспышка у свиньи на территории Краснодарского края, в патологическом материале которой был идентифицирован вирус, также содержащий девять единичных замен в мультигенном семействе 110. Таким образом, циркуляция отечественных изолятов с генетическими изменениями с 2008 по 2011 гг. происходила среди домашних свиней в Центральном ФО.

Через пять лет после последней вспышки, вирус АЧС был найден в Северо-Западном ФО на территории Псковской области в июне и августе 2016 года, патологические материалы были выделены от домашней свиньи и дикого кабана. Два изолята полученные от этих животных содержали по восемь единичных замен. Затем в феврале 2017 года на территории Саратовской области Приволжского ФО были зарегистрированы две вспышки АЧС от двух домашних свиней. Всего у этих двух изолятов было выявлено двадцать три единичные замены. Далее в Самарской области вспышка заболевания была зарегистрирована на территории Самарской области. Изолят вируса АЧС с одиннадцатью заменами был обнаружен у домашних свиней. Вновь вспышка АЧС была зафиксирована в Южном ФО в Волгоградской области в июне 2017 года у домашней свиньи. Изолят от этого животного содержал одиннадцать замен при анализе MGF 110. Далее циркуляция изолята вируса АЧС с восемью нуклеотидными заменами происходила на территории Омской области Сибирского ФО среди популяции домашних свиней. Результаты географического картирования показали, что одиннадцать изолятов вируса АЧС обнаруженных на территории РФ с 2008 по 2017 гг. обладали множественными заменами в мультигенном семействе 110. Поэтому полученные нами данные не позволили провести разделение изолятов на кластеры.

Таким образом, проведенные исследования показали, что межгенный участок I73R/I329L и MGF110 являются переменными среди отечественных изолятов вируса АЧС и могут быть использованы для анализа гетерогенности вирусной популяции. Изоляты вируса АЧС с генетическими изменениями, по двум

маркерным генам обнаруженных в популяциях домашних свиней и диких кабанов могут быть использованы для отслеживания распространения возбудителя и установления источника заноса.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Итоги исследований

1. Проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей пяти маркерных участков генома у отечественных изолятов вируса АЧС, циркулировавших на территории РФ с 2008 по 2019 гг.

2. Генетических изменений в генах EP402R и мультигенном семействе MGF505 не обнаружено.

3. Показано, что 12 отечественных изолятов вируса АЧС содержат единичную замену в гене B602L. Филогенетический анализ на основании генетической изменчивости маркера B602L позволил провести предварительное разделение этих изолятов на две группы внутри одного генотипа.

4. Анализ нуклеотидных последовательностей гена 4L фрагмента MGF110 показал наличие множественных замен у всех проанализированных 11 отечественных изолятов вируса АЧС.

5. При анализе межгенного участка I73R/I329L у двух изолятов обнаружена уникальная вставка из десятинуклеотидного тандемного повтора, а у шести отечественных изолятов выявлено множество единичных замен.

6. Проведение географического картирования по генетическим изменениям на основе межгенного участка I73R/I329L позволило сгруппировать изоляты вируса АЧС, выделенных на территории Российской Федерации, в два кластера, что позволяет отслеживать динамику распространения изолятов на территории РФ.

4.2 Практические предложения

1. В международную базу данных «GenBank» выложены фрагменты нуклеотидных последовательностей межгенной области I73R/I329L полевых изолятов вируса АЧС под номерами: «MT901177» и «MT901178».

2. Полученные нуклеотидные последовательности маркерных генов B602L, I73R/I329L, MGF110 можно использовать для дифференциации современных отечественных, европейских и азиатских изолятов и штаммов вируса АЧС.

3. Полученные данные по маркерным генам B602L, I73R/I329L, MGF110 позволяют провести хронологическое отслеживание изолятов с мутациями вируса АЧС, циркулирующих на территории Российской Федерации.

4.3 Перспективы дальнейшей разработки

Для дальнейшего изучения данной темы целесообразно продолжить исследование B602L, MGF110, межгенного участка I73R/I329L и других генов вируса АЧС с последующим проведением полногеномного секвенирования

современных отечественных изолятов вируса АЧС выделенных на территории Российской Федерации, что позволит полнее изучить изменения генома вируса АЧС, происходящие в ходе его естественной эволюции.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Результаты мониторинговых исследований на вирус АЧС, проведенных в ГНУ «ВНИИВВиМ» Россельхозакадемии в период с 2013 по 2015 год/ **А.К. Сибгатуллова**, И.П. Синдрякова, И.А. Титов, Д.А. Кудряшов, Д.В. Колбасов// IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» – Т. 2. – Москва, 2017. – С.364 – 365.

2. Анализ маркерных генов (I73R/I329L; B602L; CD2V) изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных на территории Российской Федерации в 2016 – 2017 годах / И.А. Титов, Д.А. Кудряшов, М.В. Шкаликова, **А.К. Сибгатуллова** // Молодежь и наука XXI века: материалы Междунар. науч.– практ. конф. 20–21 сент. 2017. – Т. 2. – Ульяновск, 2017. – С. 157-161.

3. Поиск новых маркерных генов изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных на территории Российской Федерации в 2016–2017 годах / **А.К. Сибгатуллова**, М.В. Шкаликова, Д.А. Кудряшов, И.А. Титов // Молодежь и наука XXI века: материалы Междунар. науч. конф. – Ульяновск: УлГАУ, 2018. – Том II. – С. 490-494.

4. Власов М.Е., Особенности течения африканской чумы у свиней, инфицированных изолятами вируса АЧС, выделенными в Российской Федерации/ М.Е. Власов, **А.К. Сибгатуллова**, В.М. Балышев// Ветеринария. – 2019. – № 4. – С.15-19.

5. Анализ генетических маркеров изменчивости изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных на территории Российской Федерации/ **А.К. Сибгатуллова**, М.В. Нефедьева, Д.А. Кудряшов, М.Е. Власов, И.А. Титов// Ветеринария. – 2020. – № 2. – С. 14 – 19.

6. Сибгатуллова, А.К. Генетические маркеры вируса африканской чумы свиней/ **А.К. Сибгатуллова**, М.Е. Власов, И.А. Титов// Ветеринария. – 2020. – № 4. – С. 21 – 26.

7. Characteristics of african swine fever virus isolated from domestic pigs and wild boars in the Russian federation and south Ossetia/ M. Vlasov, A. Imatdinov, I. Titov, N. Vasković, V. Lyska, T. Sevskikh, **A. Sybgatullova**, E. Pivova, S. Morgunov, V. Balyshev // Acta Veterinaria-Beograd. – 2020. – Vol. 70, N 1. – P. 58 – 70.

8. Сибгатуллова, А.К. Пространственно-временные характеристики результатов генотипирования по межгенному участку I73R/I329L изолятов вируса АЧС, циркулирующих на территории Российской Федерации/ **А.К. Сибгатуллова**, М.Е. Власов, Д.А. Лунина// Ветеринария. – 2021. – № 1. – С.29-33.

9. Сибгатуллова А.К. Распространение африканской чумы свиней в Тверской области/ **А.К. Сибгатуллова**, М.Е. Власов, Д.А. Лунина// Ветеринария. – 2021. – № 5. – С.24-30.

10. Сибгатуллова А.К. Ген В602L маркер внутригенотиповой дифференциации российских изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных на территории Российской Федерации/ **А.К. Сибгатуллова**, И.А. Титов// Ветеринария. – 2021. – № 7. – С. 27-32.

11. Сибгатуллова А.К. Анализ мультигенного семейства 110 и 505 (9R-10R) вируса африканской чумы свиней/ **А.К. Сибгатуллова**, И.А. Титов// Ветеринария. – 2021. – № 10. – С. 20-26.

Подписано в печать 11.04.2022 г.

Формат 60x90 1/16. Усл. печ. л. 1

Тираж 80 экз.

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»