

**ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ИЗОЛЯТЫ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ  
В ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ПО ГЕНУ B602L****А.К. Сибгатуллова**

**Реферат.** Вирус африканской чумы свиней имеет свои генетические механизмы изменчивости. Большой интерес для научного сообщества представляет проблема эволюционной изменчивости генома вируса АЧС. А именно проблема эволюционной изменчивости генома вируса АЧС, изучение функций отдельных генов, их роли во взаимодействии с клеткой – хозяином и влияние на эволюционную изменчивость, как самого вируса, так и восприимчивого организма. Разнообразие генетических вариантов вируса является главным свойством этого возбудителя, а также отсутствие вакцины против данной болезни. Имея данные о генетической особенности вируса АЧС, а также изучении варибельности известных генов позволяют расширить сведения о характере генетических изменений, а также получить молекулярно-эпизоотологическую картину циркуляции вируса АЧС как на территории Российской Федерации, так и в мире в целом. Анализ ряда маркерных генов позволят комплексно оценить генетические изменения вируса АЧС и их возможные фенотипические проявления. Изучение гена B602L позволяет более точно проводить дифференциацию европейских и азиатских изолятов внутри одного генотипа. Проведен филогенетический анализ по гену B602L шестидесяти отечественных изолятов вируса АЧС выделенных на территории Российской Федерации с 2016 по 2017 гг. В результате исследования, использованные, в работе изоляты удалось разбить на два кластера. Анализ полученных данных показал высокую консервативность изолятов и штаммов и позволил установить их генотипическую принадлежность. До сих пор остается не выясненным характер генетических и фенотипических изменений в геноме вируса АЧС.

**Ключевые слова:** африканская чума свиней, изоляты, ген, филогенетическое древо, домашние свиньи, дикие кабаны.

**Введение.** Африканская чума свиней (АЧС) – это контагиозная вирусная болезнь, поражающая домашних свиней и диких кабанов всех пород и возрастов. Это ДНК содержащий вирус, относящийся к семейству *Asfiviridae* рода *Asfivirus* [13, 16].

Летальность у восприимчивых животных достигает 100% (высокая степень патогенности) [21]. Это заболевание оказывает разрушительные последствия для мировой свиноводческой отрасли, поскольку влечет за собой огромные экономические потери, складывающиеся из затрат на проведение карантинных и ветеринарно – санитарных мероприятий (убой всего поголовья) на территории очага болезни [1].

Вирус АЧС является катастрофой для любой страны. Поскольку в настоящее время вирус АЧС продолжает распространяться и регистрироваться в новых европейских, азиатских странах являющихся ранее благополучными.

Циркуляция вируса АЧС среди домашних свиней, а также попадание вируса в дикую природу к кабанам усложняет ликвидацию заболевания [6, 12].

На сегодняшний день до сих пор не разработана безопасная и эффективная коммерческая вакцина против АЧС [7, 10, 20]. Вирус АЧС обладает большой эволюционной скоростью изменчивости ( $3,31 \times 10^{-4}$  замен/позиция/год с экспоненциальным ростом 0,01 в год-1) по сравнению с другими крупными ДНК содержащими вирусами АЧС [3].

Изоляты вируса АЧС различаются по своим биологическим свойствам, поэтому вопрос их группирования и классификации, а также

генотипирования и сероиммунотиповой идентификации является главенствующим [2, 4, 5].

Генетическую варибельность вируса АЧС изучают методом секвенирования определенных фрагментов геномов или проведение полногеномного и сравнения их с известными изолятами и штаммами.

Цель исследования – провести филогенетический анализ отечественных изолятов вируса африканской чумы свиней по гену B602L.

**Условия, материалы и методы.** Исследования проводились на базе ФГБНУ «Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии». Объектами исследования являлись 60 отечественных изолятов вируса АЧС выделенных на территории Российской Федерации с 2016 по 2017 гг. Во всех исследованных образцах было показано наличие генома вируса АЧС при исследовании методом ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК осуществляли набором «Рибо-сорб» (Интерлабсервис, Россия), согласно инструкции производителя. Реакцию ПЦР проводили в амплификаторе «МахуGeneGradient», (США). Температурный режим и количество циклов для прибора «CFX96Touch» составлял: 3 мин денатурации при температуре 94°C; отжиг праймеров при 53°C – 30 сек, элонгация при 72°C – 45 сек. (40 циклов).

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 гель-документирующей системе

«ChemiDoc MP» («Bio-RadLaboratories», США) в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Очистка полученных из геля ПЦР-продуктов осуществлялась с применением набора «Cleanup - standard» (Евроген, Россия).

Набором Bigdyeterminator v3.1 (Applied Biosystems, США) проводилась сиквенсовая реакция в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование нуклеотидных последовательностей гена B602L, вируса АЧС проводили с использованием специфических для определённого фрагмента генома праймеров:

ORF9L-F1

(5'AATGCGCTCAGGATCTGTAAATCGG3');

ORF9L-R2

(5'TCTTCATGCTCAAAGTGCGTATACCT3')

[9].

Далее полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена вируса АЧС собирали и выравнивали с использованием компьютерной программы «BioEdit v.7» [15]. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями гена вируса АЧС взятых из базы данных «GenBank» с использованием программы «BLASTN» (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [8]. Для построения дендрограммы применяли метод «Bootstrap» (максимального правдоподобия) с анализом 1000 случайных выборок, с использованием программы «Mega 7.0» [17].

**Результаты и обсуждение.** Наиболее известным и информативным маркером для изучения генетического разнообразия между отечественными изолятами и штаммами вируса АЧС считается ген B602L. Он часто используется в молекулярно-генетических исследованиях. Этот маркерный ген позволяет более точно выявлять филогенетические взаимоотношения между штаммами вируса АЧС. Ген B602L (CVR) располагается в центральной варибельной области генома. Является наиболее варибельным участком генома и

содержит повторы длиной 12 п.н. В гене B602L локализовано большое количество повторяющихся аминокислотных тетрамеров они варьируются по количеству и составу у различных штаммов и изолятов вируса АЧС [14, 22].

В настоящее время известно, что все исследованные отечественные изоляты выделенные на территории Российской Федерации имеют только один из вариантов центральной варибельной области гена B602L(CVR1) [19].

Следует отметить, что у эстонских изолятов второго генотипа выделенных в популяции дикого кабана, были обнаружены два генетических варианта (CVR-1 и CVR-2), содержащих семь и десять тетрамеров [18]. До сих пор неизвестны причины варибельности гена B602L однако имеются данные о том, что белок рВ602L кодируемый таким же геном принимает участие в корректировке правильности формирования вторичных и третичных структур капсидного белка р72 и является неструктурным белком, который исключен из процесса репликации вируса АЧС [22].

Этот ген, как и многие другие, позволяет выявить изменения среди изолятов вируса АЧС. Поэтому для определения филогенетического родства отечественных изолятов выделенных на территории Российской Федерации с 2016 по 2017 гг. нами была определена нуклеотидная последовательность этого гена.

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» (рис. 1). Анализ изолятов вируса АЧС проводился программой «MEGA v.5.2». Построенная дендрограмма отражает филогенетические отношения штаммов и изолятов из стран Европы и Азии, представляющие II генотип вируса (табл. 1).

Таблица 1 – Изоляты вируса АЧС из стран Европы и Азии, взятые из генбанка и использованные при построении филогенетического древа по гену B602L

Код штамма вируса	Страна	Выделен от	Год	Генотип	Код последовательности в Генбанк
Georgia 2007/1	Грузия	Дикий кабан	2007	II	FR682468.2
Belgium/Estalle/wb/2018	Бельгия	Свиньи	2019	II	MK543947
Belgium 2018/1	Бельгия	Свиньи	2019	II	LR536725
Estonia 2014	Эстония	Свиньи	2014	II	LS478113
Wuhan 2019-2	Китай	Свиньи	2019	II	MN393477
China/2018/AnhuiXGO	Китай	Свиньи	2018	II	MK128995
Pig/HIJ/2018	Китай	Свиньи	2018	II	MK333180

Также для сравнения изолятов нами был выбран референс – штамм референс-штаммом «Georgia 2007/1» (FR682468.2), который впервые был обнаружен в 2007 году.

Согласно филогенетическому анализу по гену В602L все исследованные изоляты и штаммы вируса АЧС по степени гомологии

разделились на два кластера. Так, сорок восемь изолятов отечественного происхождения были сгруппированы в один кластер с изолятами и штаммами из стран Европы и Азии. Анализ нуклеотидных последовательностей этих изолятов показал высокую консервативность (100 % гомология).

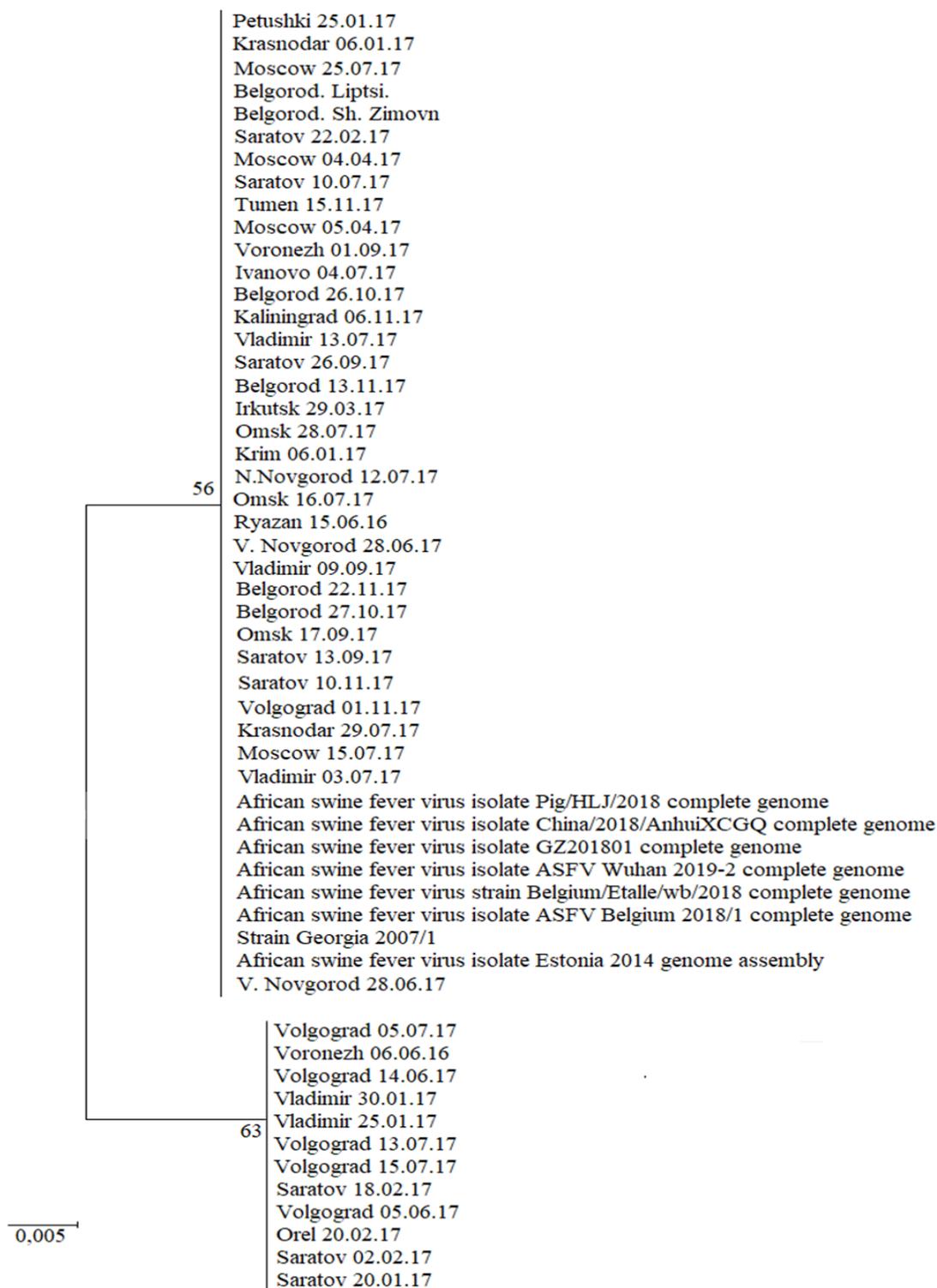


Рис. 1 – Филогенетическое древо, построенное по методу «Bootstrap (максимального правдоподобия)» на основании данных нуклеотидных последовательностей В602L изолятов вируса АЧС, выделенных на территории РФ с 2016 г. по 2019 г.

Во втором кластере представлены двенадцать отечественных изолятов, их группирование произошло благодаря имеющимся идентичным единичным заменам в нуклеотидной последовательности.

**Выводы.** Таким образом, согласно проведенному филогенетическому анализу по гену B602L удалось установить, что выделенные на территории Российской Федерации отечественные изоляты с 2016 по 2017 года

оказались идентичными (100% гомология) и принадлежат ко второму генотипу.

В дальнейшем обнаружение большого количества новых изолятов с генетическими мутациями в нуклеотидных последовательностях по гену B602L позволит провести их дифференциацию.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МК-2000.2017.11 от 22.02.17.

### Литература

1. Африканская чума свиней на территории Российской Федерации: экономические последствия / В.М. Гуленкин, И.М. Клиновицкая, О.Н. Петрова и др. // Ветеринария сегодня. 2017. №4. С.23-27.
2. Белянин С. А., Васильев А. П., Колбасов Д. В. Вирулентность изолятов вируса африканской чумы свиней // Ветеринария Кубани. 2011. №5. С. 9-10.
3. Вирус африканской чумы свиней: использование генетических маркеров при анализе путей его распространения / А. Мазлум, А.С. Иголкин, Н.Н. Власова и др. // Ветеринария сегодня. 2019. №3. С. 3-14. doi:10.29326/2304-196X-2019-3-30-3-8.
4. Принципы классификации изолятов вируса африканской чумы свиней/ И.Ф. Вишняков, А.В. Киселёв, Ю.И. Петров и др. // Актуальные проблемы вирусологии: тезисы докладов научной конференции. п. Гвардейский: Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук. 1994. С.25-26.
5. Сероиммунологическая классификация природных изолятов вируса африканской чумы свиней / И.Ф. Вишняков, Н.И. Митин, Ю.И. Петров и др. // Актуальные вопр. ветеринарной вирусологии: материалы науч.-практ. конф. «Классическая чума свиней - неотложные проблемы науки и практики». Покров: ВНИИВВиМ, 1995. С. 141-143.
6. Структура современного ареала распространения африканской чумы свиней в Российской Федерации / В. А.Журавлева, В.М. Лыска, А.П. Васильев и др. // Ветеринария. 2017. №11.С. 1-8.
7. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response / C.L. Afonso, M.E. Piccone, K.M. Zaffuto // J Virol 78:1858–1864. doi: 10.1128/JVI.78.4.1858-1864.2004.
8. A greedy algorithm for aligning DNA sequences / Z. Zhang, S. Schwartz, L.Wagner et al. // Journal of Computational Biology. 2000. Vol. 7. P. 203-214. DOI: 10.1089/10665270050081478.
9. Amino acid tandem repeats within a late viral gene define the central variable region of African swine fever virus / P.M. Irusta, M.V. Borca, G.F. Kutish et al. // Virology. 1996. Vol. 220. P. 20 – 27. DOI:10.1006/viro.1996.0281.
10. Approaches and perspectives for development of african swine fever virus vaccines/ M.Arias, Torre de la, A.Dixon et al. // Vaccines. 2017. Vol. 5, N 4. P.1-20.
11. African swine fever virus replication and genomics/ L.K. Dixon, D.A. Chapman, C.L. Netherton et al. // Virus Res. 2013. Vol.173. P. 3–14. DOI:10.1016/j.virusres.2012.10.020.
12. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars / C. Gabriel, S. Blome, A. Malogolovkin et al. // Emerg. Infect. Dis. 2011. Vol. 17. № 12. P. 2342-2345.
13. Dixon L. K., Costa J. V., Escibano J. M. Family Asfarviridae. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses // San Diego. 2000. P. 159–165.
14. Gallardo C., Mwaengo D. M., Macharia J. M. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72 and pB602L (CVR) genes // Virus Genes. 2009. Vol. 38. N 1. P. 85-95.
15. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symp. Ser. 1999. Vol. 41. P. 95-98. DOI:10.14601/Phytopathol\_Mediterr-14998u1.29.
16. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank african swine fever virus immunogenic and protective proteins/ J. K. Jancovich, D. Chapman, D.T. Hansen // Journal of Virology. 2018. Vol. 92. N 8. P. 19-17.
17. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D.Peterson et al. // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. № 12.P. 2725 – 2729.DOI: 10.1093/molbev/mst197.
18. Molecular characterization of African swine fever virus (ASFV) isolates circulating in the Eastern European Union countries 2014–2016/ R. Nieto, A. Soler, I. Nurmoja et al. // Proc. 10th Annual Meeting EPIZONE, 27–29 September 2016. Madrid, 2016. P. 164.DOI:10.3390/pathogens9070582.
19. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions / R.J. Nix, C. Gallardo, G. Hutchings et al. //Arch Virol. 2006. Vol.151. N 12. P.2475 – 2494.
20. Revilla Y. Perez-Nunez Y.D., Richt J.A. African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches // Adv Virus Res. 2018. Vol. 100. P. 41 – 74.
21. Sanchez-Vizcaino J.M. African swine fever // Diseases of Swine. – 9th ed. – Ames, Iowa. 2006. P. 93 – 102.
22. The African swine fever virus nonstructural protein pB602L is required for formation of the icosahedral capsid of the virus particle/ C. Epifano, J. Krijnse-Locker, M. L. Salas et al. //J. Virol.2006.P. 12260–12270.DOI: 10.1128/JVI.01323-06.

### Сведения об авторах:

Сибгатуллова Адыля Камилевна - ассистент, e-mail: sibgatullova92@mail.ru  
Казанский государственный аграрный университет, г. Казань, Россия.

DOMESTIC ISOLATES OF THE AFRICAN SWINE FEVER VIRUS IN THE PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE B602L GENE

A.K. Sibgatullova

**Abstract.** African swine fever virus has its own genetic mechanisms of variability. Of great interest to the scientific community is the problem of the evolutionary variability of the ASF virus genome. Namely, the problem of the evolutionary variability of the ASF virus genome, the study of the functions of individual genes, their role in interaction with the host cell and the impact on the evolutionary variability of both the virus itself and the susceptible organism. The diversity of genetic variants of the virus is the main property of this pathogen, as well as the lack of a vaccine against this disease. Having data on the genetic features of the ASF virus, as well as the study of the variability of known genes, allow us to expand information about the nature of genetic changes, as well as to obtain a molecular epizootological picture of the circulation of the ASF virus both in the Russian Federation and in the world as a whole. Analysis of a number of marker genes will make it possible to comprehensively assess the genetic changes in the ASF virus and their possible phenotypic manifestations. The study of the B602L gene allows more accurate differentiation of European and Asian isolates within the same genotype. Phylogenetic analysis for the B602L gene of sixty domestic isolates of the ASF virus isolated in the Russian Federation from 2016 to 2017 was carried out. As a result of the study, the isolates used in the work were divided into two clusters. Analysis of the obtained data showed the high conservation of isolates and strains and made it possible to establish their genotypic affiliation. The nature of genetic and phenotypic changes in the genome of the ASF virus still remains unclear.

**Key words:** african swine fever, isolates, gene, phylogenetic tree, domestic pigs, wild boars.

**References**

1. African swine fever in the Russian Federation: economic consequences / V.M. Gulenkin, I.M. Klinovitskaya, O.N. Petrova et al. // *Veterinary science today*. 2017. № 4. P.23 - 27.
2. Belyanin S. A., Vasiliev A. P., Kolbasov D. V. Virulence of African swine fever virus isolates // *Veterinary of Kuban*. 2011. No. 5. P. 9-10.
3. African swine fever virus: the use of genetic markers in the analysis of its spread / A. Mazlum, A.S. Igolkin, N.N. Vlasova et al. // *Veterinary science today*. 2019. №3. PP. 3–14. doi:10.29326/2304-196X-2019-3-30-3-8.
4. Principles of classification of African swine fever virus isolates / I.F. Vishnyakov, A.B. Kiselev, Yu.I. Petrov et al. // *Actual problems of virology: abstracts of scientific conference reports*// Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences. - p. Guards. 1994. P.25 – 26.
5. Seroimmunological classification of natural African swine fever virus isolates / I.F. Vishnyakov, N.I. Mitin, Yu.I. Petrov et al. // *Topical issues. veterinary virology: materials of scientific and practical. conf. "Classical swine fever - urgent problems of science and practice"* VNIIVViM. Pokrov, 1995. S. 141 - 143.
6. The structure of the modern distribution area of African swine fever in the Russian Federation / V.A. Zhuravleva, V.M. Lyska, A.P. Vasiliev et al. // *Veterinary*. 2017. № 11. S. 1 - 8.
7. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response/ C.L. Afonso, M.E. Piccone, K.M. Zaffuto // *J. Virol* 78:1858–1864. doi: 10.1128/JVI.78.4.1858-1864.2004.
8. A greedy algorithm for aligning DNA sequences/ Z. Zhang, S. Schwartz, L. Wagner et al. // *Journal of Computational Biology*. 2000. Vol. 7. P. 203 – 214. DOI: 10.1089/10665270050081478.
9. Amino acid tandem repeats within a late viral gene define the central variable region of African swine fever virus/ P. M. Irusta, M.V. Borca, G.F. Kutish et al. // *Virology*. 1996. Vol. 220. P. 20 – 27. DOI:10.1006/viro.1996.0281.
10. Approaches and perspectives for development of african swine fever virus vaccines/ Arias M., Torre de la, Dixon A. et al. // *Vaccines*. 2017. Vol. 5. N 4. P.1-20.
11. African swine fever virus replication and genomics/ L.K. Dixon, D.A. Chapman, C.L. Netherton et al. // *Virus Res*. 2013. Vol.173. P. 3–14. DOI:10.1016/j.virusres.2012.10.020.
12. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars / C. Gabriel, S. Blome, A. Malogolovkin et al. // *Emerg. Infect. Dis*. 2011. Vol. 17. № 12. P. 2342-2345.
13. Dixon L. K., Costa J. V., Escribano J. M. Family Asfarviridae. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses* // San Diego. 2000. P. 159 –165.
14. Gallardo C., Mwaengo D. M., Macharia J. M. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72 and pB602L (CVR) genes. // *Virus Genes*. 2009. Vol. 38. N 1. P. 85 – 95.
15. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999. Vol. 41. P. 95 – 98. DOI:10.14601/Phytopathol\_Mediterr-14998u1.29.
16. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank african swine fever virus immunogenic and protective proteins/ J. K. Jancovich, D. Chapman, D.T. Hansen // *Journal of Virology*. 2018. Vol. 92, N 8. – P. 2217-2219.
17. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson et al. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30. № 12. P. 2725 – 2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197.
18. Molecular characterization of African swine fever virus (ASFV) isolates circulating in the Eastern European Union countries 2014–2016/ R. Nieto, A. Soler, I. Nurmoja et al. // *Proc. 10th Annual Meeting EPIZONE*, 27–29 September 2016. Madrid, 2016. P. 164. DOI:10.3390/pathogens9070582.
19. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions / R.J. Nix, C. Gallardo, G. Hutchings et al. // *Arch Virol.* - 2006. Vol.151. № 12. P.2475 – 2494.
20. Revilla Y. Perez-Nunez Y. D., Richt J. A. African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches // *Adv Virus Res*. 2018. Vol. 100. P. 41 – 74.
21. Sanchez-Vizcaino J.M. African swine fever // *Diseases of Swine*. – 9th ed. – Ames, Iowa, 2006. P. 93 – 102.
22. The African swine fever virus nonstructural protein pB602L is required for formation of the icosahedral capsid of the virus particle / C. Epifano, J. Krijnse-Locker, M. L. Salas et al. // *J. Virol*. 2006. P. 12260–12270. DOI: 10.1128/JVI.01323-06.

**Authors:**

Sibgatullova Adylya Kamilevna – Assistant, e-mail.ru : sibgatullova92@mail.ru  
Kazan State Agrarian University, Kazan, Russia.