



**Vilniaus  
universitetas**

Vilniaus universitetas

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos

4 kurso studentė

Grėta Gudonytė

**Lietuvoje cirkuliuojančio afrikinio kiaulių maro viruso fragmento  
MGF505-10R molekulinė analizė**

Bakalauro darbas

Darbo vadovė:

dokt. Simona Pilevičienė

Vilnius

2020

**Lietuvoje cirkuliuojančio afrikinio kiaulių maro viruso fragmento  
MGF505-10R molekulinė analizė**

**Darbas atliktas Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute**

Darbą atliko: **Grėta Gudonytė** .....

Darbo vadovė: dokt. **Simona Pilevičienė** .....

## TURINYS

DARBE NAUDOTOS SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1 AKM viruso struktūra.....	7
1.2 AKM viruso paplitimas pasaulyje .....	9
1.3 AKM viruso perdavimas .....	10
1.4 Ligos vystymasis .....	12
1.5 Imunitetas AKM virusui ir vakcinų kūrimas.....	14
1.6 Prevencija.....	16
1.7 Diagnostika .....	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	19
2.1. Darbe naudotos medžiagos, prietaisai.....	19
2.1.1. Darbe naudotos medžiagos.....	19
2.1.2. Darbe naudoti prietaisai .....	19
2.2. Darbe naudoti metodai.....	20
2.2.1. DNR ekstrakcija iš gyvūnų kraujo .....	20
2.2.2. DNR ekstrakcija iš gyvūnų organų .....	20
2.2.3. Polimerazės grandininės reakcijos (PGR) taikymas siekiant padauginti norimą AKM viruso fragmentą .....	20
2.2.4. DNR elektroforezė agarozės gelyje .....	22
2.2.5. Tiriamų mėginių DNR sekoskaita .....	22
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	24
3.1. Klasikinės polimerazinės grandininės reakcijos sąlygų tobulinimas.....	24
3.1.1. Specifiškumo įvertinimas.....	24
3.1.2. Pradmens prilydimo temperatūros ir reakcijos mišinio parinkimas .....	24
3.2. Sekvenogramų analizė .....	25
3.3. Lietuviškų sekų sulyginimas su Europos atmainomis .....	26
IŠVADOS .....	46
PADĖKA.....	47
SANTRAUKA .....	48
SUMMARY .....	49
LITERATŪROS ŠALTINIAI .....	50

## DARBE NAUDOTOS SANTRUMPOS

A – adeninas

AKM – Afrikinis kiaulių maras

AKMV – Afrikinio kiaulių maro virusas

C – citozinas

G – guaninas

iRNR – informacinė ribonukleino rūgštis

MGF – multigenų šeima (angl. multigene family)

PGR – polimerazės grandininė reakcija

rpm – apsisukimai per minutę (angl. repeats per minute)

T – timinas

TBE ubferinis tirpalas – tirpalas, sudarytas iš Tris, boro rūgšties ir EDTA

UV – ultravioletinė spinduliuotė

## IVADAS

Afrikinis kiaulių maras – stipriai paplitusi ir didelę socio-ekonominę įtaką daugeliui Europos ir Azijos šalių padariusi kiaulių ir šernų liga. Didžiausią piniginę žalą patiria šalys, kuriose didelę komercijos dalį apima kiaulių auginimo rinka. Be abejo, problema kyla ir žmonių maisto racione, nes prarandant didelius kiaulių ūkius netenkama ir vieno pagrindinių baltymų šaltinio. Ypač ši problema opi tose vietovėse, kur yra sudėtinga gauti kitos, pavyzdžiui, jautienos produkcijos, dėl to, jog nėra sąlygų auginti gyvūnus iš kurių gaunama ši mėsa, be to, jų produkcijos ciklas yra ilgesnis (Costard et al., 2009).

AKM sukeliantis virusas kelia nemažai problemų norint jį suvaldyti, nes pasižymi dideliu kiekiu skirtingų atmainų. Todėl yra sunku atrasti veiksmingą vakcinos variantą, kuris padėtų kiaulių augintojams išvengti protrūkių ūkiuose. Tam, jog būtų įvertinta AKMV formų įvairovė, labai svarbu yra išnagrinėti genetinę šių formų variaciją. Iš pradžių šiam tikslui buvo panaudotas viruso didžiojo kapsidės baltymo p72 genas *B646L*, kuris buvo vienas pirmųjų taikinių bandant suprasti AKMV genetinę įvairovę. Pagal dalinę šio geno sekoskaitą, mokslininkai išskyrė 22 galimus AKMV genotipus (šiuo metu žinomi jau 24) ir sukūrė standartinį AKMV genotipų markerį. Iki šiol tai išlieka pagrindiniu būdu identifikuoti viruso kilmę jam atsiradus naujoje teritorijoje. Norint atlikti tikslesnį genotipavimą yra naudinga išnagrinėti genus *E183L*, *CP205L* ir *B602L*. Toliau gilinantis į kitus geno elementus, pavyzdžiui, multigenų šeimas (angl. multigene family (MGF)), matomi dar smulkesni skirtumai tarp skirtingų izoliatų (Malogolovkin ir Kolbasov, 2019). Lenkijos mokslininkai yra atlikę kelias analizes, tyrinėdami skirtingus fragmentus iš AKMV geno. Savo tyrimuose jie pastebėjo nedidelius pasikeitimus gautose sekose, kurie įrodė, jog vyksta lėta, tačiau nuosekli viruso evoliucija (Mazur-Panasiuk ir Woźniakowski, 2019).

Sanger sekoskaita jau kelis dešimtmečius buvo naudota identifikuoti viruso genotipus ir atsekti viruso introdukavimo kelią į konkrečią šalį, ypač Afrikoje, kuriai būdingas didelis genotipų išsibarstymas. Pirmoji pilno AKMV geno seka, gauta Ispanijoje iš ląstelių kultūroje užaugintos atmainos BA71V, taip pat buvo nusekvenuota naudojant Sanger sekoskaitą. Vėliau buvo paskelbtos dar kelios genomų sekos, gautos panaudojant tą patį metodą, o nuo 2009 metų pasirodė įrašai, gauti pasitelkiant naujos kartos sekoskaitos įrankius. Vis dėlto trumpiems geno fragmentams Sanger sekoskaita vis dar yra tinkama. (Forth et al., 2019). Todėl šio darbo pagrindinė vizija yra panaudoti Sanger sekoskaitos metodiką siekiant suprasti AKMV įvairovę.

## **Darbo tikslas**

Išanalizuoti Lietuvoje cirkuliuojančio Afrikinio kiaulių maro viruso fragmento MGF505-10R nukleotidų seką ir palyginti ją su kitomis viruso atmainomis.

## **Uždaviniai:**

1. Parinkti optimalias PGR sąlygas: ištirti pradmenų specifiškumą, nustatyti tinkamiausią pradmenų prilydimo temperatūrą ir reakcijos mišinį.
2. Įvykdyti Lietuvoje cirkuliuojančio Afrikinio kiaulių maro viruso fragmento MGF505-10R Sanger sekoskaitą.
3. Surasti iki šiol žinomas Afrikinio kiaulių maro viruso atmainų genų sekas.
4. Atlikti Lietuvoje cirkuliuojančios atmainos palyginimą su kitomis rastomis sekomis.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

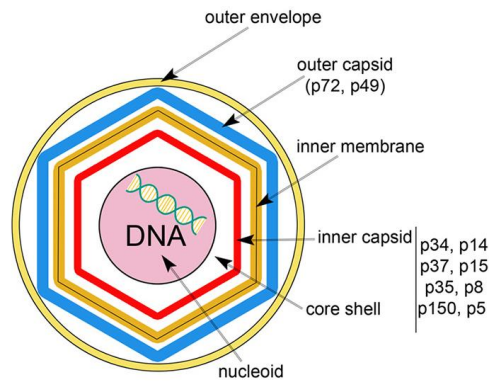
### 1.1 AKM viruso struktūra

Afrikinį kiaulių marą sukelia didelis virusas, turintis dvigrandę DNR ir besireplikuojantis makrofagų citoplazmoje (Sánchez-Cordón et al., 2018). Virusas priklauso šeimai *Asfarviridae* ir yra vienintelis šios šeimos ir genties *Asfivirus* atstovas (Schulz et al., 2017). *Asfarviridae* šeima priklauso nukleocitoplazminių didelių DNR virusų (angl. nucleocytoplasmic large DNA virus (NCLDV)) grupei, kurią sudaro genetiškai ir struktūriškai sudėtingi eukariotiniai virusai. AKMV genomą turi dvigrandę DNR molekulę, susidedančią iš 170-190 kbp ir turinčią 151-167 atviro skaitymo rėmelius, priklausomai nuo atmainos (Alejo et al., 2018).

AKM virusinių genų transkripcija yra stipriai reguliuojama dėka keturių skirtingų klasių informacinių RNR molekulių. Fermentai, reikalingi DNR replikacijai, ekspresuojami iškart po viruso patekimo į citoplazmą. (Inmaculada Galindo ir Covadonga Alonso, 2017).

Proteominės analizės metu buvo identifikuoti 68 viruso baltymai, kurie apimė 39% genomo koduojančios dalies. Jiems priklauso daugybė struktūrinių komponentų, taip pat fermentai ir virusinėje transkripcijoje dalyvaujantys faktoriai (Alejo et al., 2018).

Naudojant pavienių dalelių cryo-EM metodą buvo charakterizuota ekstraląstelinės subrendusios AKMV dalelės ir homotrimerinių p72 baltymo kapsomerų 3D struktūra. Tyrimas parodė, jog AKM virionas turi dvi atskiras ikosaedrinės proteinines kapsides ir dvi lipoproteinines membranas (Paveikslas 1.). Išorinė kapsidė turėjo pleomorfinį išorinį voką ir buvo organizuota į trisimetrus ir pentasimetrus, sudarytus iš p72 baltymo (Andrés et al., 2020). p72 baltymas yra pagrindinis kapsomerų komponentas ir sudaro 33% visos viriono masės (Revilla et al., 2018). Lygiagrečiai išorinės kapsidės yra ikosaedrinės struktūros membrana, uždaranti vidinę kapsidę, kurios pseudoheksameriniai kapsomerai sudaro T = 19 heksagoninę gardelę (Andrés et al., 2020). Toks vokas pro elektroninį mikroskopą atrodo kaip vienasluoksnė lipidinė membrana. Šis sluoksnis susiformavo iš endoplazminio tinklo ir yra sudarytas iš virusinių baltymų p54, p17 ir p12 (Revilla et al., 2018). Vidinė kapsidė, sudaryta iš produktų, gautų iš AKMV poliproteinų pp220 ir pp62, apsupa vidinę šerdį ir DNR turintį nukleoidą (Andrés et al., 2020). Vidinė šerdis taip pat viduje turi DNR surišantį baltymą p10. Be to, šis sluoksnis reguliuoja elementus, reikalingus ankstyvosios iRNR sintezei: transkripcijos mechanizmą, poly(A) polimerazę ir dengiamąjį baltymą (Revilla et al., 2018).



Paveikslas 1.

Genetinio AKM viruso genotipavimo ir subtipavimo strategijos savo tikslui pasiekti naudoja tandeminių sekų pasikartojimus šių baltymų genuose: p72 (*B646L*), p54 (*E183L*), geno *B602L* centriniame variabiliajame regione (CVR) ir intergeniniame regione tarp *I73R* ir *I329L* (Farlow et al., 2018; Malogolovkin et al., 2015). Tyrimai identifikavo mažiausiai 23 atskirus genotipus. Europoje yra paplitę genotipai I ir II. Genotipas I vyravo kaip pagrindinis genotipas vakarų ir centrinėje Afrikoje ir buvo introdukuotas Europoje 1957 ir 1960 metais. Genotipas II vyravo rytų Afrikoje ir į Europą pateko per Gruziją 2007 metais (Sánchez-Cordón et al., 2018).

Dabar naudojami AKM markeriais paremti tyrimai padeda suprasti genetinį atskyrimą tarp izoliatų, tačiau didesnio tikslumo genominiai palyginimai galėtų pagerinti epidemiologinę kontrolę. Stipriai jaučiamas tiek artimų endeminių kamienų, tiek intraepideminio perdavimo metu sugeneruotų kamienų pilno genomo duomenų trūkumas. 2018 metais buvo žinomas tik vienas pilnas AKMV genomus – G-2007/1. Nusekvenavus dar du genomus – G-2008/1 ir G-2008/2, tarpusavyje jie buvo atskirti radus skirtumus septyniuose genuose, tarp jų MGF 110-1 L, X69R, MGF 505-10R, EP364R, H233R, E199L, ir MGF 360-21R (Farlow et al., 2018).

2018 metais Lenkijos mokslininkai nuskaitė pirmą pilną AKMV genomą iš Lenkijoje auginamų individų. Gautos *B646L* ir *E183L* genų sekos parodė, kad virusas priklauso II genotipui. Centrinio variabilaus regiono (CVR) genetinė analizė *B602L* gene parodė unikalių aminorūgščių tandeminių sekų pasikartojimus, kurie nebuvo matomi kamienuose, cirkuliuojančiuose Kaukazo regione ir Rusijoje nuo 2007 metų. Taip pat, tiriant intergeninio regiono (IGR) seką, apimančią regioną tarp *I73R* ir *I3329L* genus koduojančių atvirojo skaitymo rėmelių, pastebėta 10 nukleotidų (GGAATATATA) insercija, kurios nėra Rusijos ir Gruzijos kamienuose. Tokia pati mutacija rasta ir sekose iš Ukrainos (Ukr12/Zapo), Baltarusijos (Bell13/Grodno) ir Lietuvos (Lt14/1490). Tokia mutacija rodo AKMV izoliatų, cirkuliuojančių Europoje, molekulinę evoliuciją (Mazur-Panasiuk et al., 2019a).

Virusas gali nepriklausomai nuo šeimininko ląstelės mechanizmo inicijuoti transkripcinius procesus ir koduoja apie 20 genų, kurie, kaip manoma, yra svarbūs iRNR modifikacijoje ir transliacijoje. Yra žinoma, jog virionas turi nuo DNR priklausančią RNR polimerazę, susidedančią iš kelių subvienetų ir galinčią kontroliuoti virusinių genų ekspresiją priklausomai nuo laiko. Didžioji dalis ankstyvųjų genų priklauso multigenų šeimai (MGF) (Revilla et al., 2018).

Afrikinio kiaulių maro viruso genomo ilgis varijuoja dėl genomo galuose esančių penkių multigeninių šeimų (MGF) genų insercijų ir delecijų. Šių MGF genų funkcija nėra iki galo aiški, jie taip pat nerodo panašumo su kitais žinomais genais. Vis dėlto, buvo pasiūlyta, kad genai šeimose MGF360 ir MGF505 (dar vadinamoje MGF530) yra svarbūs nulemiant šeimininko pasirinkimą ir taip pat dalyvauja interferono (IFN) indukcijos inhibicijoje (Golding et al., 2016; Netherton et al., 2019; Zsak et al., 2001).

## 1.2 AKM viruso paplitimas pasaulyje

Afrikinis kiaulių maras pirmą kartą buvo diagnozuotas Kenijoje 1910 metais (Inmaculada Galindo ir Covadonga Alonso, 2017). Dėl skirtingų perdavimo būdų, tame tarpe dėl apkrėstų maisto atliekų, patenkančių iš Afrikos lėktuvų ir laivų, taip pat dėl erkių pernešimo, liga greitai pateko į Europą. Nuo 1960 metų liga apėmė Ispaniją ir Portugaliją bei kelias kitas vakarų Europos šalis, tačiau rezultate AKM iš Europos buvo išnaikintas 1995 metais (Schulz et al., 2017). Vienintelė vakarų Europos šalis, kurioje liga nebuvo numalšinta nuo 1978 metų iki pat dabar, yra Sardinija (Martínez-López et al., 2015). Antroji ligos banga 2007 metais keliavo per Gruziją, kuri tapo viruso plitimo pradiniu tašku, iš kurio virusas pateko į kitas rytų Europos šalis: Rusijos federaciją (2008 m.), Ukrainą (2012 m.), Baltarusiją (2013 m.), Lietuvą (2014 m.), Latviją (2014 m.), Estiją (2014 m.) Vengriją (2018 m.), Čekiją (2017 m.), Rumuniją (2017 m.), Bulgariją (2018 m.), Moldovą (2018 m.) ir Belgiją (2018 m.). Šis viruso įsitvirtinimas tarp naminių kiaulių ir šernų buvo lemtas apleistumo vykdant užkrato prevenciją (Cwynar et al., 2019).

2013 metais Lietuvos nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas (NMVRVI), ištyręs 10 430 mėginių iš šernų, nepatvirtino AKM buvimo Lietuvoje. Vis dėlto Lietuvos nacionalinė maisto ir veterinarijos tarnyba atliko laboratorinę analizę 2014 metų sausio 24 d. ir tuomet patvirtino pirmus teigiamus AKM atvejus dviejose šernų gaidose. Pirmoji gaidė rasta 40 km nuo Baltarusijos sienos, o antroji 5 km atstumu nuo sienos (Paveikslas 2.). Abu atvejai buvo patvirtinti Europos Sąjungos Afrikinio kiaulių maro Referentinės laboratorijos ir parodė 100% sekos homologiją su Baltarusijoje esančiu AKM viruso tipu. Šis pastebėjimas leido susieti viruso cirkuliaciją su laukinių šernų migracija. Dar

vienas AKM atvejis aptiktas 2014 metų liepos 24 d. didelėje naminių kiaulių fermoje, auginančioje 19 137 gyvūnus. Ūkis laikėsi aukštų biosaugos reikalavimų ir, kadangi buvo Ignalinos ir Utenos regionuose, maždaug 170 km nuo pirmųjų Lietuvos AKM atvejų šernuose, leido teigti, kad prie ligos plitimo prisidėjo žmogus (Cwynar et al., 2019; Gallardo et al., 2014).



Paveikslas 2.

Epidemiologinė AKM situacija tapo didele problema Lietuvai ir kitoms ES šalims. Padidėjusį AKM atvejų skaičių galėjo lemti kelios priežastys, tame tarpe kiaulių fermų išsidėstymas, intensyvi kiaulienos produkcijos gamyba ir laukinių šernų populiacija. Didesnė dauguma naminių kiaulių populiacijos Lietuvoje (60%) auginama dideliuose auginimo centruose, kuriose užtikrinamos aukštos biosaugos sąlygos. Mažųjų fermų sektorius, apimantis 25% naminių kiaulių populiacijos, ir apie 9% kiaulių, auginamų savo reikmėms, yra vietos, kur AKM užkrato rizika yra didelė. Nuo pirmojo protrūkio Lietuvoje 2014 metų sausį iki 2019 metų buvo patvirtinti 405 AKM atvejai tarp naminių kiaulių ir šernų. Šie atvejai įtraukti į 108 oficialias pasaulinės gyvūnų sveikatos organizacijos ataskaitas (Cwynar et al., 2019).

2018 metų rugpjūčio 3 dieną pirmasis AKM protrūkis paskelbtas ir Kinijoje, Shenyang mieste. Praėjus keliems mėnesiams užfiksuoti jau 33 AKM atvejai aštuoniose šalies provincijose. Nors viruso genų seka yra labai panaši į seką, išplitusią pro Gruziją 2007 metais, vis dėlto tiksli viruso kilmė lieka neaiški. Spėjama, kad liga galėjo būti introdukuota į Kiniją iš rytų Europos nelegaliai gabenant kiaulieną (Wang et al., 2018).

### 1.3 AKM viruso perdavimas

Pagrindinis infekcijos plitimo kelias tarp kiaulių yra oro lašeliniu būdu nuo kitų kiaulių ar užkrėstų ūkio bei medžioklės priemonių (Cwynar et al., 2019). Taip pat kiaulėms ligą

perduoti gali šernai. Kiti perdavimo keliai apima kiaulienos gaminius, pašarą, atliekas, užkrėstas virusu, galimi pernešėjai yra ir erkės (*Ornithodoros* sp.) (Cwynar et al., 2019).

Afrikos tapyrai dažniausiai neparodo AKM ligos simptomų, tačiau gali tarnauti kaip tarpiniai viruso šeimininkai ir perduoti jį naminėms kiaulėms. Eksperimentinėse sąlygose naminėms kiaulėms virusą sėkmingai perdavė ir *Potamochoerus* genties laukinės kiaulės (Netherton et al., 2019; Penrith ir Vosloo, 2009).

Nuo epidemijos pradžios 2007 metais iki pirmo atvejo Europos Sąjungos ribose 2014 metais buvo stebėta, jog didžioji dalis infekcijų būdinga kiaulių fermoms su žemais biosaugos reikalavimais. Todėl manyta, kad liga turėtų savaime išnykti šernų populiacijoje, vos tik susirgimas bus sukontroliuotas kiaulių populiacijoje (Chenais et al., 2019). Vis dėlto Lenkijos ir Baltijos šalių patirtis parodė, jog tokia hipotezė buvo klaidinga. Šiose vietovėse infekcija persistavo šernų populiacijoje ir toliau plito nepriklausomai nuo protrūkių naminių kiaulių ūkiuose (Sánchez-Cordón et al., 2018).

Pastebėta, kad be *Ornithodoros* genties erkių, virusą taip pat savo organizme gali išlaikyti ir *Stomoxys* spp. musės. Tikėtina, kad jos perduoda ligą ūkio viduje, bet neperneša viruso iš vienos fermos į kitą. Vis dėlto ištyrus *Stomoxys* muses, surinktas iš AKM paveiktų ūkių Lietuvoje, rezultatai po PGR testo buvo neigiami. Taip pat buvo manyta, jog AKMV galėtų būti perduodamas ir vandeniu, tačiau tai mažai tikėtina, nes viruso dalelių skaičius stipriai prasiskiedžia ir jo tiesiog neužtenka susidaryti infekcinei dozei, kuri AKM ligos atveju yra pakankamai didelė. Tyrimai su graužikais iš AKM paveiktų ūkių parodė neigiamą rezultatą, įrodant, jog šie gyvūnai ligos sukėlėjo taip pat neperduoda (Guinat et al., 2016; Penrith and Vosloo, 2009).

Didelę įtaką AKM plitimui turi žmogus (Woźniakowski et al., 2016). Be to, jog šeimininkai perkelia kiaules ar jų produkciją dideliais atstumais, taip sukeldami galimybę viruso patekimui į kitas šalis, jie taip pat sėkmingai perneša virusą patys judėdami iš užkrėstų vietų į švarias. Tokiu būdu ligos sukėlėjas perkeliamas kartu su ūkio ir medžioklės padargais, kurie turėjo sąlytį su sergančių gyvūnų krauju, seilėmis ar ekskrementais (Chenais et al., 2019).

Pavojingiausias laikas ligos perdavime yra inkubacinis laikotarpis, kuris tęsiasi apie 48 valandas prieš pasireiškiant pirmiesiems simptomams, nes tuo metu susirgimas gali būti sėkmingai perduodamas kitiems individams. Taip pat didelė tikimybė perduoti ligą yra ir prasidėjus simptomams, kai kraujyje ir kituose sekretuose randamos didelės viruso koncentracijos (Penrith ir Vosloo, 2009). Net ir pasveikusios kiaulės dar mažiausiai mėnesį gali perduoti ligos sukėlėją (Eblé et al., 2019; Gallardo et al., 2015b).

Kadangi virusas turi savybę ypatingai ilgai išgyventi baltyminėje aplinkoje, mėsa iš paskerstų ar nugaišusių užsikrėtusių gyvūnų veikia kaip stiprus ligos šaltinis (Taylor et al.,

2020). Virusas yra pakankamai atsparus aukštomis temperatūroms, jį galima inaktyvuoti nebent paveikus 60 °C temperatūra apie 20-30 min. (Bellini et al., 2016). Todėl šviežia, šaldyta, rūkyta, sūdyta ir džiovinta kiauliena gali turėti pakankamą kiekį viruso tam, kad susidarytų infekcinė dozė (Penrith ir Vosloo, 2009). Būtent tokiu būdu per mėsą liga pateko į Europą, kai AKMV užkrėstos kiaulienos atliekos iš laivų buvo sušertos vietinėms kiaulėms (Mazur-Panasiuk et al., 2019b).

#### 1.4 Ligos vystymasis

Klinikiniai simptomai, pasireiškiantys po inkubacinio laikotarpio apima karštinę, paraudusią odą, vangumą, apetito praradimą, akies junginės uždegimą, vėmimą, viduriavimą, padažnėjusį kvėpavimą ir pulsą, persileidimus, cianozę ir koordinacijos sutrikimus. Priklausomai nuo viruso atmainos, mirtingumas gali varijuoti nuo 3 iki 100 %. Dažniausiai AKM infekcija yra lydima leukopenijos ir trombocitopenijos, bet ligos sunkumas gali varijuoti priklausomai nuo viruso atmainos virulentiškumo ir šeimininko. Virusas gali būti randamas visose kraujo frakcijose, tačiau 90% vis dėlto asocijuoti su eritrocitais (Blome et al., 2013).

Tyrimais nustatyta, jog AKM virusas į kiaulių ląsteles patenka makropinocitozės būdu (Karger et al., 2019). Šiam procesui reikia natrio/protonų keitiklio, EGFR aktyvacijos, PI3K ir Pak1 kinazių fosforilinimo kartu su Rho-GTPazės Rac1 aktyvacija. AKM viruso patekimas apima išorinio voko suardymą, kapsidės suardymą ir vidinio voko susiliejimą prieš tai, kai viruso šerdis gali būti paleidžiama iš endosomos (Revilla et al., 2018).

Stuburiniuose šeimininkuose virusas replikuoja vienasbranduolių fagocitų sistemos ląstelėse, pagrindė monocituose ir makrofaguose, nors gali būti užkrėsti ir keli kiti ląstelių tipai, ypač vėlesnėse ligos stadijose (Dixon et al., 2019). Kaulų čiulpų ir kraujo monocitai yra mažiau jautrūs *in vitro* infekcijai nei alveoliniai makrofagai. Bendrai tariant, ląstelės su aukštesniu subrendimo lygiu, ekspresuojančios aukštesnius lygius specifinių makrofagų markerių ir SLA II antigenų buvo jautresnės AKM infekcijai. Imunohistocheminiai tyrimai parodė, kad infekcija pradžioje pasireiškia limfmazgių ir blužnies limfmazgių monocituose ir makrofaguose, vėliau infekuojami megakariocitai, tonzilių epitelinės ląstelės, hepatocitai, inkstų ir endotelinės ląstelės. Naujagimiuose paršiukuose pirminė viremija pasirodo 8 valandos po infekcijos, o antrinė viremija detektuojama 15-24 valandos po infekcijos. Po 30 valandų virusas jau randamas beveik visuose organuose. Viremijos eigoje hemadsorbciniai viruso izoliatai randami prie eritrocitų, taip pat prie limfocitų ir neutrofilų. *In vivo* matoma hemadsorbcija kepenų sinusoiduose, limfiniuose sinusuose ir raudonojoje blužnies pulpoje. Kepenyse be Kupferio ląstelių infekcijos dar matoma eritrofagocitozė, hemadsorbcija ir limfocitų prisijungimas. Kupferio ląstelių ir sinusoidinių cirkuliuojančių ląstelių kiekis didėja ir aktyvuojama IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  ir IL-6 ekspresija. Kiaulės, infekuotos

AKMV kenčia nuo stiprios limfopenijos, kurią lemia limfocitų apoptozė, taip pat indukuota infekuotų makrofagų. Dėl to nukenčia CD4+ T-helperinių ląstelių ir CD8+ citotoksinių T-ląstelių skaičius (Blome et al., 2013). Matoma ir dendritinių ląstelių infekcija, kuri gali būti siejama su humoraliniu imuniniu atsaku (Dixon et al., 2019). Taip pat aprašytos ir chroninės AKM formos, galinčios turėti autoimuninį komponentą ir tokių organų kaip inkstai, plaučiai ir oda imuninių kompleksų suardymas gali sukelti žalą organizmui (Sánchez-Cordón et al., 2018; Sánchez-Vizcaíno et al.).

Aktyvuoti monocitai ir makrofagai išskiria įvairius mediatorius, tokius kaip uždegiminiai citokinai IL-1, IL-6 ir TNF- $\alpha$ . Šie citokinai gali sukelti uždegimą, endotelinių ląstelių aktyvaciją ir apoptozę. Ypatingai svarbus yra TNF- $\alpha$ , galintis sukelti kraujagyslių pokyčius (vazodilaciją ir padidėjusį laidumą) ir moduluojantis kraujagyslių endotelio aktyvacijos statusą. Be to, TNF- $\alpha$  dalyvauja apoptozės kontrolėje (Blome et al., 2013).

Apoptotinės ląstelės randamos 2-4 dienos po infekcijos, pagrinde blužnyje ir limfmazgiuose, o nuo trečios dienos po infekcijos randama ir užkrūčio liaukoje. Priklausomai nuo skirtingų AKMV atmainų, ląstelių degradavimo lygis skiriasi. Buvo pastebėta, kad sveikstančiose kiaulėse virusas išliko limfmazgiuose ir tonzilėse iki 48 dienų po infekcijos. Ligos sukėlėjas buvo įsitvirtinęs ląstelėse, supamose apoptotinių limfocitų (Blome et al., 2013).

Inkstai be kitų organų taip pat patiria patomorfologinius pokyčius, tame tarpe ir hemoragijas. AKMV replikacija mezangialinėse ląstelėse ir inkstų surenkamųjų kanalėlių epitelinėse ląstelėse paaiškina, kodėl virusas gali būti randamas ir šlapime (Blome et al., 2013).

Be monocitų ir makrofagų destrukcijos limfiniuose organuose 3 dienos po infekcijos, tuo pat metu taip pat pastebimos ir pirmosios hemoragijos (Sánchez-Vizcaíno et al.). Stiprios hemoragijos pasireiškia gastrohepatiniuose ir inkstų limfmazgiuose. Taip pat pasireiškia kapiliarų endotelinių ląstelių aktyvacija ir padidėjęs fibrinolitinis aktyvumas, kurio eigoje padidėja fibrino monomerų kiekis. Kartu su AKM infekcija pastebima ir trombocitopenija. Kiaulėse, išgyvenančiose pirmas infekcijos savaites, antikūnais padengtų leukocitų degranuliacija perėjo į antrinę trombocitų agregaciją ir vazoaktyvių aminų išskyrimą. Paveikiama ir koaguliacijos sistema, stebimas aktyvuoto dalinio tromboplastino laiko (angl. activated partial thromboplastin (aPTT)), protrombino laiko (angl. prothrombin time (PT)) ir trombino krešėjimo laiko (angl. thrombin clotting time (TCT)) uždelsimas 4 dienos po infekcijos. Nepriklausomai nuo PTT ir PT, sumažėjo koaguliacijos faktorių lygiai plazmoje. aPTT yra įprastinio koaguliacijos kelio markeris, kuris dažnai paveikiamas DIC sindromu, o padidintos PT reikšmės parodo nebūdingo koaguliacijos kelio įtraukimą. Galiausiai pastebėtas ir C-reaktyvaus baltymo, sreumo amiloido A ir haptoglobino koncentracijos padidėjimas, prasidedantis 3 dienos po infekcijos (Blome et al., 2013; Sánchez-Vizcaíno et al.). Dažniausiai

šie staigios fazės baltymai yra sintetinami hepatocitų stimuliuojant citokinams, ypač TNF- $\alpha$ , IL-1 ir IL-6. Staigios fazės atsaką taip pat gali indukuoti Kupferio ląstelės (Correia et al., 2013).

AKMV koduoja ne vieną baltymą, atsakingą už pirminio imuninio atsako, tame tarpe I tipo interferono (IFN-I), pagrindinio ativirusinio atsako elemento, inhibiciją (Dixon et al., 2019). Sekretuojami I tipo interferonai aktyvuoja signalinį kelią infekuotose ir kitose ląstelėse, kurio pasekoje vykdoma daugiau nei 300 interferono stimuliuotų genų transkripcija. Tokių genų koduojami baltymai indukuoja antivirusinę būseną blokuodami viruso replikacijos ciklą arba aktyvuodami įgimto ir adaptyvaus imuninio atsako komponentus. Pavyzdžiui, Mx baltymai atskiria viruso replikacijos faktorius taip neleisdami efektyviai replikuotis. IFITM baltymai apsunkina viruso patekimą inhibuodami membranos laidumą (Netherton et al., 2019). Manoma, jog MGF genai atlieka svarbų vaidmenį atsakant į tokį įgimtą imuninį mechanizmą (Reis et al., 2016). Ištyrus iki tol konkrečiai funkcijai nepriskirtus AKMV genus, nustatyta, kad *A276R* genas, priklausantis MGF360 šeimai, stabdo IFN- $\beta$  indukciją panaudojant TLR3 ir citozolinį kelią. *A528R* inhibavo NF- $\kappa$ B ir IRF3 dalis IFN I signaliniame kelyje. Genas *I329L* yra funkcinis virusinis TLR3 homologas, stabdantis IFN indukciją per TRIF lygį. Taigi šie genai mažina IFN atsaką paveikdami skirtingas viduląstelinio signalo perdavimo dalis (Correia et al., 2013).

Dar vieni imuninio atsako reguliatoriai AKM atveju yra citokinai, tiksliau dvidešimt keturi jų atstovai, kurių ekspresija stipriai skiriasi lyginant infekuotus ir sveikus makrofagus. Dvidešimties iš jų lygis padidėjo, keturių – sumažėjo (Zhu et al., 2019).

### 1.5 Imunitetas AKM virusui ir vakcinų kūrimas

Afrikos tapyrai ir *Ornithodoros* spp. erkės yra AKMV šeimininkai, kuriuose virusas persistuoja, bet nesukelia ligos. Tuo tarpu, jei yra užkrečiama kiaulė arba šernas, virusas gali laisvai skliti net nesant kontakto su erkėmis kaip vektoriais (Guinat et al., 2016). Ligos sukėlėjas gali replikuotis ir krūmyninėse kiaulėse (*Potamochoerus larvatus*), tačiau kaip ir tapyrų atveju, klinikinių ligos simptomų nėra (Woźniakowski et al., 2016). Šios kiaulės, *Potamochoerus larvatus*, parodė viruso titrus, šimtą kartų žemesnius už paprastai matomus naminėse kiaulėse. Virusų replikacija audiniuose taip pat mažesnė ir, nors B-ląstelių apoptozė limfmazgiuose yra pastebima, ji nėra tokia stipri, kaip naminėse kiaulėse. Kitos struktūros nebuvo paveiktos (Sánchez-Vizcaíno et al.). Nagrinėjant Afrikos tapyrų sąveiką su AKMV ir atlikus serologinius testus nustatyta, jog infekcijos dažnis gyvūnų populiacijoje dažnai yra didesnis nei 80%, tačiau viremija suaugusiuose tapyruose yra reta, paprastai virusas neplinta toliau nei limfmazgiai. Vis dėlto naujagimių gyvūnų organizme viremija randama. Žemo lygio viremija laikosi kelias savaites. Šis laikas gali būti labai svarbus infekcijai patenkant į erkių organizmą (Netherton et al., 2019).

Kiaulės, persirgusios AKM įgyja stiprų imunitetą, taip įrodydamos, kad įmanoma sukurti efektyvią vakciną prieš šią ligą (Revilla et al., 2018). Kelios mokslininkų grupės stengėsi sukurti AKM vakciną technologiją. Išbandyti inaktyvuoti virusai, rekombinantiniai baltymai ir peptidai, DNR vakcinai ir susilpninto viruso vakcinai, tačiau veiksmingo ir saugaus varianto vis dar nerasta (Sang et al., 2020).

Susilpnintos AKMV atmainos sukėlė imuninį atsaką, kuris leido susiformuoti ilgalaikiam atsparumui homologinėms (to paties varianto), bet ne heterologinėms viruso atmainoms (Arias et al., 2017). Šis atsparumas sietas su virusui specifinių T ląstelių atsaku. Tačiau susilpninto AKMV vakcinai sukėlė tam tikrus šalutinius efektus, pvz.: žaizdas, karščiavimą, viremiją, hipergamaglobulemią ir/arba sąnarių tinimą (Revilla et al., 2018). Taip pat pastebėta, jog vakcinai gali sukelti chroninę arba persistuojančią infekciją. Galiausiai sunkumų sukelia ir stabilios ląstelių linijos vakcinai produkcijai trūkumas, nes AKMV geriausiai replikuojasi pirminiuose monocituose ir makrofaguose (Gaudreault ir Richt, 2019).

Atlikus tyrimus su visiškai išveikintu virusu nustatyta, jog nesusidaro joks imunitetas, nei homologinei, nei heterologinei viruso atmainai. Tuo tarpu bandant perkelti antikūnus iš AKMV infekuotų kiaulių į sveikas buvo pastebėta, jog šie antikūnai apsaugo kiaules nuo mirtinos AKMV atmainos (Revilla et al., 2018).

Antigenais ir DNR paremtos subvienetų vakcinai parodė taikininį veiksmingumą su mažiau pašalinių efektų ir didesniu saugumu lyginant su gyvo arba išveiklinto viruso vakcinomis. Keli imunogeniški AKMV baltymai buvo identifikuoti ir ištirti aiškinantis jų reikšmę apsaugoje nuo AKM (Gaudreault ir Richt, 2019). Tarp šių baltymų yra baltymai p54 ir p30, kurie dalyvauja įvairiuose viruso prisitvirtinimo ir patekimo į ląstelę žingsniuose. Deja, imunizacija panaudojant subvienetų vakcinai, paremtas rekombinantiniais p54 ir p30 baltymais, ekspresuotais bakulovirusuose, neapsaugojo nuo virulentinio AKMV kamieno. Panašiai ir panaudojus vakcinai, paremtas baltymais p30, p54, p22 ir p72 ir ekspresuotais bakulovirusuose, neišgautas atsparumas prieš virulentinį AKMV, nors ir buvo susiformavę neutralizuojantys antikūnai. Todėl kilo abejonių dėl antikūnų reguliuojamo AKMV neutralizavimo efektyvumo (Revilla et al., 2018). Buvo atlikti dar keli bandymai, siekiant atrasti veiksmingą mechanizmą vakcinoms. Deja, bet apibendrinus buvo nustatyta, jog DNR ir peptidais paremtos vakcinai, nors ir indukavo specifinį antivirusinį atsaką, paremtą neutralizuojančiais antikūnais arba virusui specifinėmis T-ląstelėmis, tačiau nesudarė jokia apsauga, arba susidariusi apsauga buvo tik dalinė, paveikus vakcinuotas kiaules virulentine AKMV atmaina (Arias et al., 2017).

Kolkas yra manoma, jog gyvo susilpninto ligos sukėlėjo vakcinai (angl. live attenuated vaccine (LAV)) yra daugiausiai vilties teikianti apsauga nuo AKM viruso, tačiau

jos neapsaugo nuo heterologinių viruso atmainų, taip pat sukelia pašalinį poveikį, todėl reikia atlikti daug tyrimų, jog šios kliūtys būtų pašalintos. Be LAV, taip pat plačiai aptariamos subvienetų vakcinos, kurios nesukelia pašalinio poveikio, bet suteikia tik dalinę apsaugą nuo viruso (Arias et al., 2017). Todėl, norint ateityje sukurti efektyvią ir saugią LAV ir subvienetų vakciną, reikia identifikuoti virulentiškumo genus ir atsakomuosius imuninio atsako komponentus. Taip pat reikia išsamiai išanalizuoti molekulinį viruso mechanizmą, kuriuo moduluojama šeimininko imuninė sistema, išsiaiškinti AKMV baltymų reikšmę apsaugoje ir imunopatologijoje ir suprasti įgimtos ir įgytos imuninės sistemos indėlį į ligos sukėlo nukenksminimą (Revilla et al., 2018).

2017 metais Latvijos mokslininkai išbandė pirmąją oralinę šernų vakcinaciją. Imuninio atsako sukėlimui jie naudojo ne modifikuotą virusą, o natūralų, cirkuliuojantį gamtoje, tačiau turintį mažesnę virulentiškumą. Rezultatai parodė, jog šernai buvo apsaugoti nuo ligos, o pašaliniai simptomai buvo neryškūs, pasireiškė tik šiek tiek padidėjusi temperatūra. Tiesa, ši vakcina apsaugo tik nuo II genotipo AKMV atmainos, tačiau tai gali būti pagrindas tolimesnei vakcinos gamybai (Barasona et al., 2019).

#### 1.6 Prevencija

Kadangi AKM protrūkio atveju komercinės kiaulių auginimo fermos patiria didelę žalą ekonominiu ir gyvūnų gerovės atžvilgiu, tokie ūkiai imasi itin griežtų biosaugos priemonių. Visų pirma yra išskiriamos švarios ir užterštos patalpos, įrengiami persirengimo kambariai ir dušai. Taip pat prižiūrimas naujų gyvūnų įvežimas. Jei įmanoma, transporto priemonės turėtų nepatekti į auginimo patalpą, taip pat vežėjai neturėtų kontaktuoti su ūkio darbuotojais ar gyvūnais. Po kiekvieno naudojimo, pervežimo priemonės yra dezinfekuojamos. Visi fermos gyvūnai identifikuojami. Kiekvienas gimimas, mirtis, gyvūno judėjimas iš arba į ūkį turi būti registruojamas tam, jog protrūkio atveju būtų galimas atsekamumas. Turėtų būti vykdomi ir periodiniai vidiniai auditai, savišivertinimai. Galų gale turi būti užtikrinamas tinkamas kritusių gyvūnų ir atliekų pašalinimas (Jurado et al., 2018).

Naminiai kiaulių ūkiai, turintys žemą biosaugos lygį yra vienas pagrindinių veiksnių viruso plitimui. Šiame sektoriuje yra įprasta maitinti kiaules virtuvės atliekomis, o įprastas biosaugos metodikas yra gana sunku įvesti dėl minimalaus lėšų investavimo į tokią sistemą (Cwynar et al., 2019). Vis dėlto net ir namų ūkiuose galima laikytis tam tikrų prevencinių priemonių, kurios galėtų efektyviai sumažinti AKM viruso plitimo riziką. Tokios priemonės yra: jokie maitinimo pamazgomis; vengimas maitinti gyvūnus šviežiu pašaru, surinktu iš AKM paveiktų vietų; kiaulių pirkimas tik iš patikimų ir sertifikuotų šaltinių; gyvūnų laikymas uždara tvarte; žmonių, patenkančių į tvartą ribojimas; žmonių, turinčių kontaktą su gyvūnais, aprūpinimas drabužiais ir avalyne, kuri būtų naudojama tik dirbant; maisto nešimosi

į aptvarą ribojimas; rankų plovimas prieš ir po lankymosi garde; efektyvių dezinfektantų naudojimas prie įėjimo į tvartą; taisyklingas gaišusių gyvūnų ar jų dalių utilizavimas; užtikrinimas, jog šernų ar jų dalių nebus tvarte su kiaulėmis; vengimas lankyti kitas kiaulių fermas (Bellini et al., 2016; Jurado et al., 2018).

Biosauga laisvai besiganančių kiaulių sistemose yra praktiškai neįmanoma, ypač endeminiuose regionuose, kur ganyklos yra įprastas auginimo būdas (pvz.: komunalinėse ganyklose Sardinijoje ar viešuose miškuose Gruzijoje ir Armėnijoje). Toks laisvai besiganančių kiaulių auginimas turėtų būti uždraustas dėl galimybės, jog skirtingi kiaulių būriai gali susitikti ir perduoti ligą, be to, galimas kontaktas su šernais. Kiti galimi veiksmai, be draudimo, yra gyvūnų atskyrimas ir pašaro kontrolė. Taip pat rekomenduojama ir patvarus zonos aptvėrimas vienguba ar dviguba tvora (Bellini et al., 2016; Jurado et al., 2018).

Medžioklė yra leidžiama daugumoje Šiaurės-Rytų Europos miškų ir šernai yra viena dažniausiai medžiojamų rūšių Europoje. Šernai yra jautrūs AKMV ir gali demonstruoti simptomus, panašius į tuos, kurie matomi kiaulėse. Nugaišus šernui arba jį sumedžiojus, infekuoti palaikai, jei nėra tinkamai utilizuojami, gali tiesiogiai arba netiesiogiai užkrėsti kitus individus. Todėl medžiotojai taip pat gali imtis tam tikrų priemonių viruso suvaldymui: jie turi praeiti bent minimalios higienos kursus; sumedžioti šernai turi būti patikrinami dėl AKMV; transportas, kuriuo yra perkeliama šernai, turėtų būti naudojamas tik šiai paskirčiai; sumedžiotų gyvūnų mėšą turi perdirbti tik reikalavimus atitinkančios įstaigos; mėsos dorojimo įrankiai ir apranga turėtų likti dorojimo patalpoje; medžiotojų apranga turėtų būti laikoma specifiniuose maišuose ir po medžioklės į juos grąžinama; batai ir apranga turėtų būti dezinfekuojama po kiekvieno naudojimo; liekanos po mėsos apdoravimo turi būti laikomos specialiuose konteneriuose, kurie turi būti nuolatos dezinfekuojami; atliekų duobės turi būti bent jau 1,5 m gylio, aptvertos ir būti nedideliu atstumu nuo perdirbimo vietos; kiekvienas šernas turi būti individualiai identifikuojamas, o pasitaikius teigiamam AKM atvejui, visi turimi sumedžioti gyvūnai turi būti utilizuojami prižiūrint veterinarui (Bellini et al., 2016; Chenais et al., 2019).

### 1.7 Diagnostika

Pasaulinės gyvūnų sveikatos organizacijos rekomenduojami testai AKMV detekcijai yra: viruso izoliacija, fluorescencinis antikūnų testas (angl. fluorescent antibody test (FAT)) bei realaus laiko ir įprastoji PGR. PGR yra dažniausiai naudojamas metodas tarp nacionalinių referentinių laboratorijų Europos Sąjungoje. Pasitelkiant šią techniką, gaunami tikslūs rezultatai, praktiškai nėra klaidingai teigiamų (angl. false positive) atvejų. Kiti tyrimai, pavyzdžiui, fermentais paremtas imunosorbentinis tyrimas (angl. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)), leidžiantis atlikti didelio masto testavimus, taip pat yra galimi nacionalinėse referentinėse laboratorijose, tačiau jie pasižymi žemesniu analitiniu jautrumu nei

PGR testai. Ieškant AKM antikūnų, Pasaulinė gyvūnų sveikatos organizacija siūlo naudoti ELISA metodą kartu su imunoblotingu (IB) arba netiesiogine imunofluorescencija (NIF) papildomam patvirtinimui. Netiesioginis imunoperoksidazės testas (NIPT) taip pat buvo validuotas Europos Sąjungos referentinės laboratorijos kaip turintis efektyvų analitinį ir diagnostinį jautrumą ir galimas naudoti kaip alternatyvus patvirtinamasis tyrimas, pritaikomas kiaulių serumo analizei (Gallardo et al., 2015a; Zsak et al., 2005).

Buvo atrastas ir naujas imunochromatografinis tyrimo metodas, leidžiantis aptikti viruso antigeną, paremtas monokloninių antikūnų naudojimu prieš didįjį viruso kapsidės baltymą VP72. Šis testas yra greitas ir paprastas ir tinkamas tirti laukinius gyvūnus bei tyrimams laboratorijose, kurios neturi įrangos, reikalingos sudėtingesniems tyrimams (Haines et al., 2013).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Darbe naudotos medžiagos, prietaisai

#### 2.1.1. Darbe naudotos medžiagos

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Vokietija)

QIAamp RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Vokietija)

Thermo Scientific Luminaris Probe High ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, JAV)

TopVision Agarose (Thermo Scientific, JAV)

UltraPure™ 10x TBE buffer (Invitrogen, JAV)

pUC Mix Marker 8 (Thermo Scientific, JAV)

DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Scientific, JAV)

Big Dye™ Terminator (Thermo Scientific, JAV)

Hi-Di Formamide (Thermo Scientific, JAV)

Egzonukleazė I (Thermo Scientific, JAV)

Krevečių šarminė fosfatazė (Thermo Scientific, JAV)

#### 2.1.2. Darbe naudoti prietaisai

Vortex Mixer Classic (VELP Scientifica, Italija)

Vakuuminis kolektorius Laboport N 816 (Laboport, JAV)

Mikrocentrifūga Eppendorf AG22331 5415D (Eppendorf, Vokietija)

Audinių homogenizatorius Tissue lyser II (QIAGEN, JAV)

AB StepOnePlus Real-time PCR System (Thermo Scientific, JAV)

Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, JAV)

PowerPac™ Basic (Bio-Rad, JAV)

ABI PRISM™ 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, JAV)

## 2.2. Darbe naudoti metodai

### 2.2.1. DNR ekstrakcija iš gyvūnų kraujo

Siekiant išgauti genetinę medžiagą tolimesniems tyrimo etapams, buvo atlikta viruso DNR ekstrakcija. Šiam tikslui buvo panaudotas kiaulių ir šernų kraujas. Genetinė medžiaga išskirta iš kraujo panaudojant QIAamp Viral RNA Mini Kit ekstrakcijos rinkinį. Proceso pradžioje gyvūno kraujas gerai sumaišomas ant purtyklės. Tuomet 140 µl iš bendro turimo gyvūno kraujo tūrio buvo sumaišyta su 560 µl AVL buferio, siekiant gauti santykį 1:4. Mišinys inkubuotas 10 min. kambario temperatūroje. Toliau mišinio tūris sumaišytas su 560 µl 96% EtOH ir suneštas į QIAamp Mini spin kolonėlę, patalpintą ant vakuuminio kolektoriaus. Tuomet kolonėlė plauta užnešant po 500 µl buferinių tirpalų AW1 ir AW2. Galiausiai kolonėlės perkeliama nuo vakuuminio kolektoriaus į švarius centrifugavimo mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 13200 rpm greičiu 1 min., siekiant pašalinti kolonėlėje užsilaikiusį tirpalą. Tolesnio etapo metu filtratas išmestas, o kolonėlės perkeltos į 1,5 ml tūrio mėgintuvėlius, ant jų buvo užnešta 125 µl AVE buferio ir inkubuota 1 min. kambario temperatūroje. Kolonėlės tuomet centrifuguotos 6800 rpm greičiu 1 min. Nucentrifugavus kolonėlės pašalintos, o išskirta DNR palikta tolimesniam darbui.

### 2.2.2. DNR ekstrakcija iš gyvūnų organų

Kitas galimas DNR išgavimo būdas yra panaudojant kiaulių ir šernų vidaus organus. Procedūra atlikta pasitelkiant QIAamp RNeasy Mini Kit ekstrakcijos rinkinį. Iš pradžių gaunami nedideliai (~30 mg) gyvūnų organų kiekiai steriliame mėgintuvėlyje su 800 µl RLT buferio ir metaliniu rutuliuku. Jie homogenizuojami 3 min. 30 Hz dažniu patsitelkiant audinių homogenizatorių. Vėliau mėgintuvėlis su lizatu ir metaliniu rutuliuku centrifuguojamas 10000 rpm greičiu 1 min. Tuomet atskirame 2 ml mėgintuvėlyje sumaišoma 500 µl gauto centrifugato su 500 µl 70% EtOH. Mišinys sunešamas į RNeasy mini spin kolonėlę, patalpintą ant vakuuminio kolektoriaus. Toliau kolonėlė plaunama 500 µl RW1 buferio ir du kartus po 500 µl RPE buferio. Kolonėlės tuomet perkeliama į švarius centrifugavimo mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 13200 rpm greičiu 1 min., siekiant pašalinti tirpalo likučius. Galiausiai filtratas išmetamas, o kolonėlės perkeliama į švarius 1,5 ml mėgintuvėlius ir ant jų užnešama 125 µl AVE eliacijos tirpalo. Kolonėlės centrifuguojamos 6800 rpm greičiu 1 min., tuomet kolonėlės pašalinamos, o gauta DNR paliekama tolesniam tyrimui.

### 2.2.3. Polimerazės grandininės reakcijos (PGR) taikymas siekiant padauginti norimą AKM viruso fragmentą

Atlikta PGR siekiant padauginti tikslinį AKM viruso fragmentą MGF505-10R. Pirmiausia parenkamas tinkamas reakcijos mišinys (1 lentelė). Taip pat keičiama pradmens prilydimo / DNR sintezės temperatūra apskaičiuavus  $T_m$  kiekvienam pradmeniui atskirai. Pilnas temperatūrinis režimas matomas 2 lentelėje. Gaunami rezultatai pateikiami fiksuojamu fragmentu elektroferogramoje.

Pradžioje atliekami specifškumo tyrimai, kurių metu su parinktais pradmenimis tikrinamos AKMV skirtingo stiprumo kontrolės ir kitų (paukščių gripo, Koi herpes, Klasikinio kiaulių maro) virusų teigiamos kontrolės. Šis tyrimas padeda nustatyti ar metodas yra jautrus ir galima šiais pradmenimis padauginti tik AKMV fragmentus.

Tinkamiausioms reakcijos sąlygoms nustatyti parenkamos skirtingos pradmens prilydimo temperatūros: 48 °C, 50 °C, 53 °C. Optimali pradmens prilydimo temperatūra parenkama pagal elektroforezės nuotraukas, kurios padeda identifikuoti susidariusius DNR fragmentus.

**1 lentelė.** PGR mišinio sudėtis vienai reakcijai.

Reagentas	Kiekis vienai reakcijai (μl)
Path - $ID^{TM}$ qPCR reakcijos mišinys (2x)/ Maxima Probe/ROX qPCR (2x) reakcijos mišinys	12,5
Tiesioginis pradmuo (20 μM)	1
Atvirkštinis pradmuo (20 μM)	1
Dejonizuotas vanduo	5,5

**2 lentelė.** PGR temperatūrinis režimas.

Žingsnio Nr.	Žingsnio pavadinimas	Žingsnio temperatūra	Žingsnio trukmė	Ciklų skaičius
	UNG aktyvavimas	50 °C	2 min	1
2.	Pirminis DNR denatūravimas	95 °C	10 min.	1
3.	DNR denatūravimas	95 °C	30 s	40
	Pradmens prilydimas /DNR sintezė	48/50/53°C	30 s	
4.	DNR sintezė	72 °C	1 min	

5.	Galutinis ilginimas	72 °C	10 min	1
----	---------------------	-------	--------	---

#### 2.2.4. DNR elektroforezė agarozės gelyje

Pasibaigus polimerazės grandininėi reakcijai, rezultatų identifikavimui reikalinga atlikti elektroforezė. Elektroforezė tai procesas, kurio metu DNR fragmentai arba baltymai yra atskiriami pagal dydį ir / ar krūvį. DNR produktų detekcijai ir tikslinio fragmento nustatymui naudota elektroforezė agarozės gelyje (1,5%). Pagal nustatytą gelio dydį reikalingas agarozės kiekis buvo užpildytas 1x TBE buferiniu tirpalu ir kaitintas. Agarozei ištirpus ir tirpalui pilnai nuskaidrėjus jis buvo vėsinamas. Tolesniame žingsnyje į kolbą su tirpalu pridėta etidžio bromido. Kolbos turinys supiltas į gelio formavimo indą su šukomis. Geliui sustingus ir perkėlus jį į elektroforezės aparatą, į šulinėlius įnešta 5 µl DNR ilgio žymens pUC Mix ir 7 µl tiriamų mėginių, sumaišytų su 3 µl 6x Loading Dye. DNR elektroforezė vykdyta 160V įtampoje 60 min. Procesui pasibaigus, gelis analizuojamas gelių dokumentavimo sistema „ChemiDoc EQ“, Quantity one programa.

#### 2.2.5. Tiriamų mėginių DNR sekoskaita

Parinkus PGR sąlygas ir padauginus AKM viruso fragmentą buvo atlikta turimų mėginių automatizuota Sanger sekoskaita. Sekoskaitos metodas remiasi nukleorūgščių grandinės sekos identifikavimu. Pirmiausia atliekamas produktų valymas naudojant egzozonukleazę I ir krevečių šarminę fosfatazę. Paruošiamas reakcijos mišinys (3 lentelė).

**3 lentelė.** PGR produktų valymo reakcijos mišinys (Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas, 2014).

El. Nr.	Reagento pavadinimas	Kiekis vienai reakcijai, µl
1.	Egzozonukleazė I	0,5 (10 u)
2.	Krevečių šarminė fosfatazė	1 (1 u)
	Viso:	1,5

Į kiekvieną reakcijos mėgintuvėlį dedama po 5 µl PGR produkto, nustatomas atitinkamas temperatūrinis režimas (4 lentelė).

**4 lentelė.** PGR produktų valymo temperatūrinė programa (Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas, 2014).

Žingsnio Nr.	Žingsnio pavadinimas	Žingsnio temperatūra	Žingsnio trukmė
1.	Inkubacija	37 °C	15 min.
2.	Reakcijos stabdymas	85 °C	15 min.

Po to paruoštas sekvenavimo PGR mišinys, kurio turi vienai reakcijai sudarė: 3 µl Big Dye Terminator reakcijos mišinys, 0,6 µl pradmens komplementarių valytam produktui, 11,4 µl dejonizuoto vandens. Į lėkštelės šulinėlius buvo patalpinta po 15 µl reakcijos mišinio ir 5 µl mūsų ankstesnės PGR produkto. PGR metu taikytos šios sąlygos: 1) DNR pirminė denatūracija – 96 °C 1 min.; 2) DNR denatūracija – 96 °C 10 s; 3) Pradmenų prikibimas – 50 °C 5 s; 4) DNR sintezė – 60 °C 4 min. 2 – 4 stadijos kartotos 25 kartus. Reakcijai pasibaigus aparate buvo palaikoma 4 °C temperatūra. Tada atliktas produkto valymas per kolonėles, CENTRI – SEP (Applied Biosystems) kolonėlių paruošimas. Kolonėlės užpilamos 800 µl dejonizuoto  $H_2O$  ir paliekamos 30 – 60 min. kambario temperatūroje. Patikrinama ar nėra stambių burbuliukų. Baigus inkubaciją kolonėlės supurtomos purtykle. Paskui nuimama viršutinė kolonėlių dalis ir perkeliama į naujus mėgintuvėlius. Pašalinamas nereikalingas skystis. Toliau kolonėlės centrifuguojamos 2 min. apie 0,7 rcf. Nucentrifugavus perkeliama į naujus Eppendorf mėgintuvėlius ir tuoj pat naudojamos. Į paruoštą kolonėlę pilama po 20 µl PGR produkto. Centrifuguojama 2 min. apie 0,7 rcf. Tuomet gautas produktas paruoštas denatūracijai. Buvo patalpinta 10 µl Hi-Di formamido ir 5 µl galutinio PGR produkto. Taikyta tokia temperatūrinė programa: 1) Denatūracija 95 °C 5 min.; 2) Šaldymas 4 °C. Po šios reakcijos lėkštelė su denatūracijos produktu patalpinta į daugiakapiliarinį DNR analizatorių.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Klasikinės polimerazinės grandininės reakcijos sąlygų tobulinimas

##### 3.1.1. Specifiškumo įvertinimas

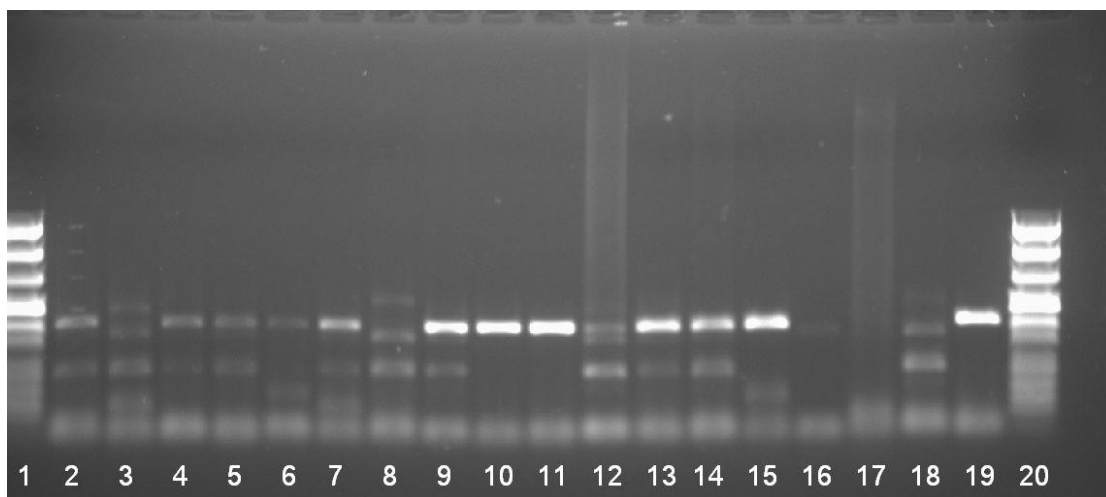
Po klasikinės polimerazės grandininės reakcijos atliekama elektroforezė padeda atskirti viruso fragmentus pagal jų dydį. Klasikinės PGR eksperimentai pradami nuo specifiškumo įvertinimo. Gauti rezultatai parodė, kad skirtingos AKM viruso teigiamos kontrolės (PC19, PC20, PC21, PC22) reaguoja su reakcijos mišinyje esančiais pradmenimis ir susidaro atitinkami fragmentai unikalūs savo dydžiais. Taip pat naudojamos klasikinio kiaulių maro, paukščių gripo ir žuvų Koi herpes virusų teigiamos kontrolės, kurios nereaguoja su reakcijos mišinyje esančiais pradmenimis, tai įrodo tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų specifiškumą (5 lentelė).

**5 lentelė.** Skirtingų kontrolinių medžiagų reakcija su reakcijos mišinyje esančiais pradmenimis

Teigiama kontrolė	Rezultatas
PC19	422 bp
PC20	422 bp
PC21	422 bp
PC 22	422 bp
PC KHV (St3)	-
PC PG (A 17873 O3)	-
PC KKM VSCF 184	-

##### 3.1.2. Pradmens prilydimo temperatūros ir reakcijos mišinio parinkimas

Įrodžius pradmenų specifiškumą tolesni eksperimentai keičiant pradmenų prilydimo temperatūras parodė, kad prilydimo temperatūros keitimas, nuo 48 °C iki 53 °C intervale, didelės įtakos PGR neturi, tačiau mažiausiai nespecifinių produktų susidaro prie 53 °C pradmenų prilydimo temperatūros ir buvo stebima, kad įtakos reakcijai turi pasirenkamas reakcijos mišinys (Paveikslas 3.)



Paveikslas 3. 1, 20 šulinėliai – markeris pUC mix 8; 2 – PC19 ir Path - *ID<sup>TM</sup>* qPCR, 48 °C; 3 – PC19 ir Maxima Probe/ROX qPCR, 48 °C; 4 – PC19 ir Path - *ID<sup>TM</sup>* qPCR, 50 °C; 5 – PC19 ir Maxima Probe/ROX qPCR, 50 °C; 6 – PC19 ir Path - *ID<sup>TM</sup>* qPCR, 53 °C; 7 – PC19 ir Maxima Probe/ROX qPCR, 53 °C; 8 – PC20 ir Path - *ID<sup>TM</sup>* qPCR, 48 °C; 9 – PC20 ir Maxima Probe/ROX qPCR, 48 °C; 10 – PC20 ir Path - *ID<sup>TM</sup>* qPCR, 50 °C; 11 – PC20 ir Maxima Probe/ROX qPCR, 50 °C; 12 – PC20 ir Path - *ID<sup>TM</sup>* qPCR, 53 °C; 13 – PC20 ir Maxima Probe/ROX qPCR, 53 °C; 14 – PC21 ir Path - *ID<sup>TM</sup>* qPCR, 48 °C; 15 – PC21 ir Maxima Probe/ROX qPCR, 48 °C; 16 – PC21 ir Path - *ID<sup>TM</sup>* qPCR, 50 °C; 17 – PC21 ir Maxima Probe/ROX qPCR, 50 °C; 18 – PC21 ir Path - *ID<sup>TM</sup>* qPCR, 53 °C; 19 – PC21 ir Maxima Probe/ROX qPCR, 53 °C.

### 3.2. Sekvenogramų analizė

Parinkus sąlygas ir atlikus fragmentų padauginimą, pasitelkiant Sanger sekoskaitą buvo gautos 48 sekos iš 2014-2017 metų teigiamų AKM mėginių. Sekvenogramų rezultatai buvo analizuoti naudojant programą Chromas lite. Gautos sekos išsaugotos fasta formatu. Peržiūrėjus rezultatus paskaičiuota, jog gautą fragmentą sudarė 373 nukleotidai. Pavyzdį, kaip atrodė šios sekos galima matyti 6 lentelėje.

**6 lentelė.** AKMV fragmentas MGF505-10R, gautas iš Lietuvoje paimtų mėginių.

Lietuvoje nusekvenuotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10R	TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA
---	--

	<p>TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG  TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG  CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT  TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAA</p>
--	--

Toliau mūsų gautos sekos buvo sukeltos į NCBI BLAST programą tam, jog būtų rastos kitos Afrikinio kiaulių maro viruso sekos iš skirtingų šalių. Gautos 68 žinomos AKM atmainų sekos. Kai kurios sekos dubliavosi, pavyzdžiui, buvo rasta tiek pilno genomo seka, tiek kairiojo variabilaus regiono, todėl tokios sekos buvo nebuvo analizuojamos po vieną. Galutinis sekų, kurias lyginome su mūsų fragmentu, skaičius buvo 63. Šios sekos kartu su lietuviškomis sekomis buvo sulyginotos panaudojant programos EMBL-EBI Clustal Omega daugybinį palyginimą.

### 3.3. Lietuviškų sekų sulyginimas su Europos atmainomis

Viena iš rastų sekų atlikus BLAST paiešką buvo Gruzijos izoliatas, kurio genomo sekoskaita atlikta 2007 metais. Sulyginus mūsų turimą seką su šia Gruzijos seka, gautas vieno nukleotido neatitikimas paskutinėje MGF505-10R fragmento padėtyje – vietoje būdingo C mūsų gautose sekose buvo matomas A. Lietuviškoji seka ir fragmentas, iškirptas iš 2007 metų Gruzijos izoliato pateikti lentelėje. Tas pats vieno nukleotido skirtumas matomas ir lyginant su kitomis 13 Europoje cirkuliuojančių Afrikinio kiaulių maro viruso atmainų: ASFV CzechRepublic 2017/1, ASFV Moldova 2017/1, ASFV strain Belgium/Etalle/wb/2018, ASFV/Kyiv/2016/131, ASFV\_HU\_2018, ASFV/LT14/1490, ASFV-wbBS01, ASFV Belgium 2018/1, Georgia 2008/2, Georgia 2008/1, China/2018/AnhuiXCGQ, ASFV/POL/2015/Podlaskie ir Estonia 2014. Dar vienoje viruso atmainoje – Liv13/33 iš Prancūzijos taip pat matytas pokytis. Ten paskutinis fragmento nukleotidas pakeistas iš T į A. Rezultatai matomi 7 lentelėje.

**7 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Europoje paplitusios atmainos. Raudonai pažymėtas besiskiriantis nukleotidas.

<p>Lietuvoje nusekvenuotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCATAAAAATTTATCCTTAT  ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT  ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC  ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA  ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG  GATAAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA</p>
---	--

	<p>TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG  TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG  CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT  TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCA<sup>A</sup></p>
<p>Gruzijos 2007 metų  Afrikinio kiaulių maro  viruso izoliato  framgentas MGF505-  10R</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT  ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT  ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC  ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA  ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG  GATAAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA  TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG  TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG  CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT  TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCA<sup>C</sup></p>

Taip pat to paties vieno nukleotido pakitimas matomas ir lyginant Lietuvoje gautas su sekomis iš Kinijos: ASFV Wuhan 2019-2, ASFV Wuhan 2019-1, ASFV/pig/China/CAS19-01/2019 ir Pig/HLJ/2018.

Dar viena atmaina, kurioje buvo matomas tas pats vienas nukleotido skirtumas yra Afrikoje cirkuliuojanti Mkuzi 1979.

Atlikus palyginimą su kitomis Afrikos atmainomis, pastebėtas tas pats paskutinio nukleotido pasikeitimas į A, tačiau be jo dar buvo pastebimi ir kiti pokyčiai. Dvi atmainos – RSA\_2\_2008 ir Warmbaths, turėjo tuos pačius sekos pakitimus. Abejais atvejais pastebėtas pakitimas 288 pozicijoje iš C Afrikos atainose į T lietuviškoje. Taip pat 307 pozicijoje T Afrikos atmainose pakeistas C lietuviškoje. Šie rezultatai atsispindi 8 lentelėje.

**8 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamų atmainų RSA\_2\_2008 ir Warmbaths. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje  nusekvenotas  Afrikinio kiaulių maro  viruso fragmentas  MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT  ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT  ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC  ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA  ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG  GATAAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA</p>
--	---

	TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAAACAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCA <b>A</b>
Atmainos RSA_2_2008 ir Warmbaths fragmentas MGF505- 10R	TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGCTACTCTATGCTGTGCAGG TTCGGGGCCCCCAAAAAAACAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCA <b>C</b>

Pretoriuskop/96/4 atmaina skyrėsi trimis nukleotidais: 189 padėtyje G pakeistas C; 200 pozicijoje vietoje citozino buvo G; 288 padėtyje C pakeistas T; 373 padėtyje vietoje C buvo A. Šie rezultatai pateikti 9 lentelėje.

**9 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos Pretoriuskop/96/4. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10	TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATAT <b>CTG</b> GATAAAAC <b>CG</b> TTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAAACAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCA <b>A</b>
Afrikinio kiaulių maro viruso Pretoriuskop/96/4	TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC

atmainos fragmentas MGF505-10R	ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATGTG GATAAAACCGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGCTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAAACAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAC
-----------------------------------	--

Warthog atmaina nuo lietuviškosios skyresio tuo, jog MGF505-10R fragmento 77 nukleotidas buvo ne C, o T. 122 pozicijoje T buvo pakeistas C. 189 padėtyje vietoje G buvo C, o 200 padėtyje vietoje C buvo G. 260 padėtyje A pakeistas G. 288 padėtyje C pakeistas T. 373 padėtyje C pakeistas A. Rezultatai patalpinti 10 lentelėje.

**10 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos Warthog. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10	TTTTTGATGTTGCATTCGCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAAACCGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAAACAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAA
Afrikinio kiaulių maro viruso Warthog atmainos fragmentas MGF505-10R	TTTTTGATGTTGCATTCGCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAC ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCATCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATGTG GATAAAACCGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAAGTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGCTACTCTATGCTGTGCAGG

	CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCA <b>C</b>
--	--

Lyginant su Tengani 62 atmaina, 155 fragmento padėtyje nukleotidas iš T, pakeistas į C. 204 padėtyje C pakeistas T. 288 padėtyje C pakeistas T. 366 padėtyje T pakeistas A. 373 C pakeistas A. Šie pasikeitimai matomi 11 lentelėje.

**11 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos Tengani 62. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

Lietuvoje nusekvenuotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10	TTTTTGATGTTGCATTCGCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA A <b>C</b> TTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAAACGGTT <b>T</b> TATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTG <b>T</b> ACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCAC <b>ACC</b> ATCA <b>A</b>
Afrikinio kiaulių maro viruso Tengani 62 atmainos fragmentas MGF505-10R	TTTTTGATGTTGCATTCGCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA A <b>T</b> TTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAAACGGTT <b>C</b> TATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTG <b>C</b> TACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTT TTATCTTCTTAAACTACTCCGTGCAC <b>TCC</b> ATCAC

Kelios Afrikoje cirkuliuojančios Afrikinio kiaulių maro atmainos ir keletas Europoje gautų sekų turėjo tuos pačius pakitimus MGF505-10R fragmente, lyginant su Lietuvoje gautomis sekomis. Šios atmainos buvo 22653/Ca/2014 (Afrika), 26/Ss/2004 (Afrika), 60/Nu/1997 (Afrika), 142\_Nu\_1995 (Afrika), 141/Nu/1990 (Afrika), 85/Ca/1985 (Afrika),

140/Or/1985 (Afrika), 139/Nu/1981 (Afrika), 57/Ca/1979 (Afrika), 56/Ca/1978 (Afrika), 47/Ss/2008 (Afrika), 26544/OG10 (Afrika), BA71 (Europa), NHV (Europa), L60 (Europa), BA71V (Europa), OURT 88/3 (Europa), Benin 97/1 (Afrika), E70 (Europa) ir MS16 (Europa). 90 šių atmainų fragmento MGF505-10R padėtyje vietoje A buvo T, o 98 padėtyje vietoje T buvo A. 155 pozicijoje T buvo pakeistas į C. 185 ir 187 padėtyse G pakeistas į A. 189 padėtyje vietoje G buvo C. 200 padėtis pasikeitė iš C į G, o 204 padėtyje C tapo T. 288 padėtyje C pakeistas į T. 329 pozicijoje vietoje A buvo matomas G. 332 padėtyje esantis T pakeistas į C. 356 pozicijos T taip pat pakeistas C, o 357 padėtyje matomas G pasikeitė į T. Galiausiai matoma, jog paskutinis 373 nukleotidas pasikeitė iš C į A. Visus šiuos pasikeitimus galima matyti 12 lentelėje.

**12 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje bei Europoje gautos sekos. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT  ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT  ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC  ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA  ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG  GATAAAACGGTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA  TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG  TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG  CTCGGGCCCCCAAAAAAACAACCTGAACCTACTTTTATCT  TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCCATCAA</p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos 22653/Ca/2014, 26/Ss/2004, 60/Nu/1997, 142_Nu_1995, 141/Nu/1990, 85/Ca/1985, 140/Or/1985, 139/Nu/1981, 57/Ca/1979, 56/Ca/1978, 47/Ss/2008, 26544/OG10, BA71, NHV, L60, BA71V, OURT 88/3, Benin 97/1, E70 kairiojo variabilaus regiono,</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT  ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT  ACAGAGGCTGCAAAATATAGATTTACCCAATTTGCTATC  ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA  ATTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGGTGTGTG  GATAAAACCGTTCTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA  TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG  TAAAACCGTTAAAAAACTGCTACTCTATGCTGTGCAGG  CTCGGGCCCCCAAAAAAACAACCTAAATCTACTTTTATCT  TCCTTAAACTATGCCGTGCACACCCATCAC</p>

MS16 fragmentas MGF505-10R	
-------------------------------	--

Lyginant su 97/Ot/2012 atmaina, pastebėta, jog Afrikai būdingos sekos 90 padėtyje A pakeistas į T. 98 padėtyje vietoje T buvo A. 155 pozicijoje T buvo pakeistas C. 185 ir 187 padėtyse esančios G molekulės pakeistos į A. 189 padėtyje matomas G pakeistas į C. 200 pozicijoje vietoje C buvo G. 204 padėtyje C buvo pakeistas T. 288 pozicijoje esantis C lietuviškoje sekoje buvo pakeistas į T. 329 padėtyje vietoje A matytas G. 332 pozicijoje T buvo pakeistas C. 356 padėtyje vietoje T buvo C, o 357 vietoje A – T. 373 poziciją lietuviškoje sekoje užėmė ne C, o A. Rezultatai patalpinti 13 lentelėje.

**13 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos 97/Ot/2012. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10	TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAAACGGTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAA
Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos 97/Ot/2012 fragmentas MGF505-10R	TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCAATATAGATTTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ATTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGGTGTGTG GATAAAACCGTTCATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGCTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAACACTAAATCTACTTTTATCT TCCTTAAACTATACCGTGCACACCATCAC

Lyginant su atmaina 72407/Ss/2005, skyrėsi 90 padėtyje esantis nukleotidas (vietoj T buvo C). 98 padėtyje vietoje G buvo A. 155 pozicijoje G pakeistas C. 185 ir 187 padėtyse matytas pasikeitimas iš G į A. 189 pozicijoje G pakeistas C. 200 pozicijoje vietoje C matytas G. 204 padėtis pasikeitė iš C į T. 288 padėtyje vietoje C buvo T. 329 pozicija pasikeitė iš A į G. 332 padėtyje T pakeistas į C. 356 pozicijoje T pakeistas į C, o 357 – G į T. 373 padėtyje C pasikeitė į A. Pasikeitimai gali būti matomi 14 lentelėje.

**14 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos 72407/Ss/2005. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10	TTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAAACGGTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAAACAACCTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAA
Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos 72407/Ss/2005 fragmentas MGF505- 10R	TTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCAAAATATAGATTTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ATTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGGTGTGTG GATAAAACCGTTCTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGCTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAAACAACCTAAATCTACTTTTATCT TCCTTAAACTATGCCGTGCACACCATCAC

Lyginant su Zaire atmaina, buvo matomi šie pokyčiai: 7 pozicijoje T pakeistas A; 25 padėtyje C pakeistas A; 48 pozicijoje C pakeistas G; 55 padėtyje T pakeistas A; 75 pozicijoje T pakeistas A; 77 padėtyje C pakeistas T; 96 pozicijoje C pakeistas G; 154 padėtyje T pakeistas A; 165 pozicijoje C pakeistas G; 174 padėtyje C pakeistas A; 189 pozicijoje G pakeistas C; 196 padėtyje C pakeistas A; 232 pozicijoje C pakeistas G; 271 padėtyje C pakeistas A; 280

pozicijoje C pakeistas A; 288 padėtyje C pakeistas T; 330 pozicijoje T pakeistas A; 351 padėtyje T pakeistas A ir 373 pozicijoje C pakeistas A. Šie pokyčiai atsispindi 15 lentelėje.

**15 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos Zaire. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAACCGTTAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAA</p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos Zaire fragmentas MGF505- 10R</p>	<p>TTTTGTGTTGTTGCATTCGCCATACAAATTTATCCTTAT ACGTTTTACGGTATGTACTTCTCATGCACAAAGTATAC ACAGAGGCTGCATATATACAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA TCTTTATGTTACAAACAATACAGCATGGTGGATATGTG GATACAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TACGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TACAACCGTTACAAAACCTGCTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGTACCTACTTTTATCTT CCTTATACTACTCCGTGCACACCATCAC</p>

Lyginant su atmaina RSA\_2\_2004 matyti skirtumas 7 padėtyje, kur T pakeistas A. 25 pozicijoje taip pat matomas pokytis – C vietoje atsiranda A. 48 padėtyje C pakeistas G. 55 pozicijoje pastebimas T pasikeitimas į A. 75 padėtyje vietoje T matomas A. 96 pozicija parodė pasikeitimą iš C į G. 154 padėtyje T pakeistas A. 165 pozicijoje C pakeistas į G. 174 padėtyje vietoje C matomas A. 189 pozicijoje G pakeistas C. 196 padėtyje matomas pasikeitimas iš C į A. 200 pozicijoje C vietą pakeitė G. 232 padėtyje C pakeistas G. 271 pozicijoje vietoje C buvo A. 280 padėtyje C pakeitė A. 288 pozicijoje C pakeistas T. 330 padėtyje T pasikeitė į A. 351 vietoje T taip pat matytas A. 373 padėtyje C pakeistas į A. Visi pakitimai matomi 16 lentelėje.

**16 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos RSA\_2\_2004. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTTCGCCCATAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAACCGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAACCGTTAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAACTACTCCGTGCACACCATCAA</p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos RSA_2_2004 fragmentas MGF505- 10R</p>	<p>TTTTGTGTTGCATTTCGCCCATCAAATTTATCCTTAT ACGTTTTACGGTATGTACTTCTCATGCACAAAGTATATA CAGAGGCTGCATATATACAATTACCCAATTTGCTATCA TATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTAT CTTTATGTTCAAACAATACAGCATGGTGGATATGTGG ATACAACCGTTTT ATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCATA CGAAAATTGTGG CTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCGTACAACCGTTACAA AACTGCTACTCTATGCTGTGCAGGCTCGGGCCCCAAA AAAACACTGTACCTACTTTTATCTTCCTTACTACTCC GTGCACACCATCAC</p>

Lyginant su atmaina SPEC\_57 skirtumai matėsi šiuose nukleotiduose: 7 (T pakeistas A); 25 (C pakeistas A); 48 (C pakeistas G); 55 (T pakeistas A); 75 (T pakeistas A); 96 (C pakeistas G); 154 (T pakeistas A); 165 (C pakeistas G); 174 (C pakeistas A); 196 (C pakeistas A); 232 (C pakeistas G); 271 (C pakeistas A); 280 (C pakeistas A); 288 (C pakeistas T); 307 (T pakeistas C); 330 (T pakeistas A); 351 (T pakeistas A); 373 (C pakeistas A). Palyginimo rezultatai patalpinti 17 lentelėje.

**17 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos SPEC\_57. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTG<b>A</b>TGTTGCATTTCGCCCAT<b>A</b>AAAATTTATCCTTAT  ACGTTTT<b>A</b>GGGTATG<b>A</b>ACTTCTCATGCACAAAGT<b>A</b>AAT  ACAGAGGCTGCATATAT<b>A</b>GAATTACCCAATTTGCTATC  ATATCACCTTCGAACTGCGGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA  <b>A</b>CTTTATGTT<b>A</b>GAAACAATA<b>A</b>AGCATGGTGGATATCTG  GATA<b>A</b>AACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA  TAG<b>G</b>AAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG  T<b>A</b>AACCGTT<b>A</b>AAAACTG<b>T</b>ACTCTATGCTGTGCAGG  <b>C</b>TCGGGCCCCCAAAAAA<b>A</b>CACTG<b>A</b>ACCTACTTTTATCT  TCCTT<b>A</b>AACTACTCCGTGCACACCAT<b>C</b>A</p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos SPEC_57 fragmentas MGF505-10R</p>	<p>TTTTTG<b>T</b>TGTTGCATTTCGCCCAT<b>A</b>CAAATTTATCCTTAT  ACGTTTT<b>A</b>CGGTATG<b>T</b>ACTTCTCATGCACAAAGT<b>A</b>TATA  CAGAGGCTGCATATAT<b>A</b>CAATTACCCAATTTGCTATCA  TATCACCTTCGAACTGCGGGCGGCAGGAGGTCTTCTT<b>A</b>T  CTTTATGTT<b>A</b>CAAACAATA<b>C</b>AGCATGGTGGATATCTGG  AT<b>A</b>CAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCAT  <b>A</b>CGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG<b>T</b>  <b>A</b>CAACCGTT<b>A</b>CAA<b>A</b>ACTG<b>C</b>TACTCTATGCTGTGCAGG<b>T</b>  TCGGGCCCCCAAAAAA<b>A</b>CACTG<b>T</b>ACCTACTTTTATCTTC  CTT<b>A</b>TACTACTCCGTGCACACCAT<b>C</b></p>

Atmaina LIV\_5\_40 skyrėsi 7 padėtyje esančiu nukleotidu – vietoje T buvo A. 25 pozicijoje C pakeistas į A. 48 padėtyje C pasikeitė į G. 55 padėtyje T pakeistas į A. 75 pozicijoje vietoje T buvo A. 96 padėtyje matomas C pasikeitimas į G. 154 pozicijoje T pakeistas į A. 165 padėtyje vietoje C matytas G. 174 pozicijoje T pakeistas A. 176 padėtyje C pasikeitė į G. 196 pozicijoje T vietoje pastebėtas A. 198 padėtyje taip pat T pakeistas į A. 232 pozicijoje C vietą užėmė G. 271 ir 273 padėtyse T pasikeitė į A. 280 pozicijoje vietoje C buvo A. 330 padėtyje T pakeistas A. 351 pozicijoje matomas pasikeitimas iš T į A. 373 padėtyje C pakeistas A. Šie pokyčiai matomi 18 lentelėje.

**18 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos LIV\_5\_40. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAATTTATCC  TTATACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACA  AAGTAAATACAGAGGCTGCATATATAGAATTAC  CCAATTTGCTATCATATCACCTTCGAACTGCGGC  GGCAGGAGGTCTTCTTAACTTTATGTTAGAAACA  ATAAAGCATGGTGGATATCTGGATAAACGGTTT  TATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCATAAGAAAA  TTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCGTAAA  ACCGTTAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG  CTCGGGCCCCCAAAAAAACAACACTGAACCTACTTTT  ATCTTCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAA</p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos LIV_5_40 fragmentas MGF505-10R</p>	<p>TTTTGTGTTGCATTCGCCCATCAAATTTATCC  TTATACGTTTTACGGTATGTACTTCTCATGCACA  AAGTATATACAGAGGCTGCATATATACAATTACC  CAATTTGCTATCATATCACCTTCGAACTGCGGCG  GCAGGAGGTCTTCTTATCTTTATGTTACAAACAA  TATACCATGGTGGATATCTGGATATATCGGTTTT  ATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCATAAGAAAAT  TGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCGTATAT  CCGTTACAAAACACTGTTACTCTATGCTGTGCAGGC  TCGGGCCCCCAAAAAAACAACACTGTACCTACTTTTA  TCTTCCTTATACTACTCCGTGCACACCATCAC</p>

Atlikus atmainos E75 sulyginimą su lietuviškąja atmaina pastebėti tokie skirtumai: 90 padėtyje vietoje A buvo T; 98 pozicijoje T pakeistas į A; 155 padėtyje T pasikeitė į C; 185 ir 187 pozicijose G pakeistas A; 189 padėtyje G vietą užėmė C; 200 pozicijoje C pakeistas į G; 204 padėtyje C pasikeitė į T; 288 poziciją užimantis C pakeistas T; tarp pozicijų 321 ir 322 lietuviškoje atmainoje yra įtrauktas papildomas A; 329 padėtyje matėsi pasikeitimas iš A į G; 332 pozicijoje T pakeistas į C; 356 padėtyje T pakeistas į C, o 357 – G į T; 373 pozicijoje vietoje C buvo A. 19 lentelėje galima matyti abi sulygintas sekas.

**19 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos E75. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai. Žaliai pažymėtas papildomai įsiterpęs nukleotidas.

<p>Lietuvoje nusekvenuotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAAACGGTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAA AACACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAA</p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos E75 fragmentas MGF505- 10R</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCA AATATAGATTTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ATTTTATGTTAGAAAC AATAAAGCATGGTGGGTGTGTGGATAAAACCGTTCAT CCGCGGCTATCAGGTACAAGCATAGGAAAATTGTGGCT CATTTTATTCATCAGGTTCCCCGTAAAACCGTTAAAAA ACTGCTACTCTATGCTGTGCAGGCTCGGGCCCCCAAAA AACACTAAATCTACTTTTATCTTCTTAAACTATGCCGT GCACACCATCAC</p>

RSA\_W1\_1999 atmainos genome 7 nukleotidas pakeistas iš T į A. 25 padėtis pakeista iš C į A. 48 pozicijoje vietoje C buvo G. 55 padėtyje T pasikeitė į A. 75 pozicijoje pastebėtas pasikeitimas iš T į A. 77 padėtyje C pakeistas į T. 96 pozicijoje vietoje C buvo G. 122 padėtyje T pasikeitė į C. 154 pozicijoje T pakeistas į A. 165 padėtyje vietoje C buvo G. 174 pozicijoje buvo matytas pokytis iš C į A. 189 padėtyje G buvo pakeistas į C. 196 pozicijoje C pasikeitė į A. 200 padėtyje vietoje C matytas G nukleotidas. 232 pozicijos vietą užėmė ne C, o G. 260 padėtyje matytas pasikeitimas iš A į G. 271 poziciją užimantis C pakeistas į A. 280 padėtyje vietoje C buvo A. 288 pozicijoje matytas pasikeitimas iš C į T. 330 padėtyje įvyko

pokytis iš T į A. 351 pozicijoje taip pat nukleotidas iš T pasikeitė į A. 373 nukleotidas iš C pakeistas į A. Rezultatai matomi 20 lentelėje.

**20 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos RSA\_W1\_1999. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAACCGTTAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAACCTACTCCGTGCACACCATCAA</p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos RSA_W1_1999 fragmentas MGF505- 10R</p>	<p>TTTTGTGTGTTGCATTCGCCATACAAATTTATCCTTAT ACGTTTTACGGTATGTACTTCTCATGCACAAAGTATAC ACAGAGGCTGCATATATACAATTACCCAATTTGCTATC ATATCATCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA TCTTTATGTTACAAACAATACAGCATGGTGGATATGTG GATACAACCGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TACGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAAGTTCCCCG TACAACCGTTACAAAACCTGCTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAACACTGTACCTACTTTTATCTT CCTTACTACTCCGTGCACACCATCAC</p>

Atlikus palyginimą su Malawi Lil-20/1 multigenų šeimos 530 nukleotidų seka, pastebėtas pasikeitimas 26 padėtyje iš G į A. 41 pozicijoje T pakeistas į C. 62 padėtyje T pasikeitė į C. 90 pozicijoje vietoje A buvo T. 98 padėtyje matomas pokytis iš T į A. 119 pozicijoje C pakeistas į T. 137 padėtyje C vietą užėmė G. 149 pozicijoje įvyko pokytis iš C į T. 153 padėtyje C pakeistas į A. 155 pozicijoje vietoje T buvo C. 164 padėtyje T pasikeitė į A. 167 pozicijoje G pakeistas į A. 171 padėtyje T vietą užėmė A. 189 pozicijoje įvyko pokytis iš G į C. 198 padėtyje G pakeistas į A. 200 pozicijoje C pasikeitė į G. 221 padėtyje vietoje T buvo G. 227 pozicijoje A pakeistas į G. 237 padėtyje įvyko pokytis iš G į A. 260 pozicijoje A pasikeitė į G. 275 padėtyje vietoje G buvo C. 279 pozicijoje G pakeistas į A. 288 padėtyje C

vietoje buvo T. 294 pozicijoje C pasikeitė į T. 299 padėtyje buvo pokytis iš C į T. 306 pozicijoje A pakeistas į G. 366 padėtyje C vietą užėmė A. 373 pozicijoje C pasikeitė į A. Palyginime naudotos sekos patalpintos 21 lentelėje.

**21 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos Malawi Lil-20/1. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenuotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAA<b>A</b>AATTTATCCTTAT AC<b>G</b>TTTTAGGGTATGAACTTCT<b>C</b>ATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCAT<b>T</b>ATATAGA<b>A</b>TTACCCAATTTGCTATC ATAT<b>C</b>ACCTTCGAACTGCGGC<b>G</b>GCAGGAGGTCT<b>T</b>CT<b>A</b> A<b>C</b>TTTATGTT<b>A</b>GA<b>A</b>ACA<b>A</b>TAAAGCATGGTGGATAT<b>C</b>TG GATAAA<b>A</b>C<b>G</b>GTTTTATCCGCGGCTATCAG<b>G</b>TACA<b>A</b>G<b>C</b>A TAGGAAA<b>A</b>TTGTGGCTCATT<b>T</b>TATTCATCA<b>G</b>GTTCCCCG TAAAAC<b>C</b>GTT<b>A</b>AAAACTG<b>T</b>ACTCT<b>T</b>ATGCT<b>G</b>TGCAG<b>G</b> CTCGGGCCCCCAAAAAA<b>A</b>CACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCAC<b>A</b>CCAT<b>C</b>A<b>A</b></p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos Malawi Lil-20/1 fragmentas MGF505-10R</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCCATAA<b>G</b>AATTTATCCTTAT AT<b>G</b>TTTTAGGGTATGAACTTCT<b>T</b>ATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCA<b>A</b>ATATAGAT<b>T</b>TTACCCAATTTGCTATC ATA<b>C</b>CACCTTCGAACTGCGGC<b>C</b>GCAGGAGGTCT<b>C</b>CT<b>C</b> A<b>T</b>TTTATGTT<b>T</b>G<b>A</b>GACAT<b>T</b>TAAAGCATGGTGGATAT<b>G</b>TG GATAAA<b>G</b>C<b>C</b>GTTTTATCCGCGGCTATCAG<b>T</b>TACA<b>A</b>CA TAGGAAA<b>G</b>TTGTGGCTCATT<b>T</b>TATTCATCA<b>A</b>GTTCCCCG TAAAAC<b>G</b>GTT<b>G</b>AAAACTG<b>C</b>TACT<b>C</b>CATG<b>C</b>CGTGCAG<b>A</b> CTCGGGCCCCCAAAAAA<b>A</b>CACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCAC<b>C</b>CCAT<b>C</b>AC</p>

Po palyginimo su atmaina R35, N10, R25, R7, R8 matėsi šie pasikeitimai sekoje: 9 padėtyje iš A į G; 10 ir 11 nukleotidai iš C į T; 14 pozicijoje iš C į A; 15 padėtyje iš C į T; 17 pozicijoje iš G į C; 18 nukleotidas iš C į G; 19 padėtyje iš T į C; 41 pozicijoje iš T į C; 62 nukleotidas iš T į C; 71 ir 74 pozicijos iš G į A; 90 nukleotidas iš A į T; 98 padėtis iš T į A; 99 pozicija iš G į T; 105 nukleotidas iš G į A; 114 padėtis iš A į T; 117 pozicija iš C į T; 119 nukleotidas iš G į T; 130 padėtis iš G į C; 131 nukleotidas iš C į T; 137 pozicija iš A į G; 149 padėtis iš C į T; 153 nukleotidas iš C į A; 155 pozicija iš T į C; 167 nukleotidas iš G į A; 171 padėtis iš T į A; 177 pozicija iš T į C; 185 ir 187 nukleotidai iš G į A; 189 padėtis iš G į C; 208

pozicija iš T į C; 212 padėtis iš A į G; 215 nukleotidas iš G į T; 221 padėtis iš T į G; 227 ir 260 nukleotidai iš A į G; 275 pozicija iš A į C; 279 ir 282 padėtis iš G į A; 287 nukleotidas iš A į G; 288 pozicija iš C į T; 294 ir 299 nukleotidai iš C į T; 306 padėtis iš A į G; 326 pozicija iš T į A; 373 nukleotidas iš T į A. Šiuos pasikeitimus galima matyti 22 lentelėje.

**22 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamų atmainų R35, N10, R25, R7, R8. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCGGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAA</p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos R35, N10, R25, R7, R8 fragmentas MGF505- 10R</p>	<p>TTTTTGATACCGCCTGCTCCATAAAAATTTATCCTTAT ATGTTTTAGGGTATGAACTTCTTATGCACAAGGTGAAT ACAGAGGCTGCAATATAGATGTACCCGATTTGCTAAC ACAGCACCTTCGAAGCGCGGCAGCAGGAGGTCTCCTTC ATTTTATGTTAGAGACATTAAAGTATGGTGGGTGTGTG GATAAAACGGTTTTATTCGCAGCGATCAGTTACAAACA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCAAAGTTCCCCG TAAAACAGTTGAAGAACTACTACTCCATGCCGTGCAGA CTCGGGCCCCCAAAAAACTCTGAACCTACTTTTATCTT CCTTAAACTACTCCGTGCACACCATCAT</p>

Išanalizavus palyginimą su atmaina Kenya 1950, 14 padėtyje C pakeistas A. 15 pozicijoje vietoje C buvo T. 17 nukleotidas buvo ne G, o C. 18 pozicijoje C vietą užėmė G. 19, 41 ir 62 padėtyje T pasikeitė į C. 74 pozicijoje matytas pokytis iš G į A. 90 nukleotidas pakeistas iš A į T. 98 padėtyje T pakeistas į A, o 99 – G į T. 102 pozicijoje vietoje T buvo C. 105 padėtyje G pakeistas į A. 114 nukleotidas pasikeitė iš A į T. 117 pozicijoje C vietą užėmė T. 119 padėtyje G pasikeitė į T. 130 nukleotidas pakeistas iš G į C, o 131 – iš C į T. 137 pozicijoje esantis A pasikeitė į G. 149 padėtyje C pakeistas į T. 153 pozicijoje C vietą užėmė A. 155 nukleotidas

pasikeitė iš T į C. 167 padėtyje vietoje G buvo A. 171 pozicijoje T pakeistas į A. 177 padėtyje T pasikeitė į C. 185 ir 187 nukleotidai pakeisti iš G į A. 189 poziciją užimantis G pakeistas į C. 208 padėtyje T pakeistas į C. 212 pozicijoje A pasikeitė į G. 215 nukleotidas pakeistas iš G į T. 221 padėtyje T vietoje atsirado G. 227 ir 260 pozicijoje A vietą užėmė G. 275 padėtyje G pakeistas į C. 279 ir 282 nukleotidai pasikeitė iš G į A. 287 pozicijoje vietoje A buvo G, o 288 – vietoje C buvo T. 294 ir 299 padėtyse C pakeistas į T. 306 nukleotidas pasikeitė iš A į G. 326 ir 373 pozicijoje T pakeistas į A. Skirtumai tarp sekų atsispindi ir 23 lentelėje.

**23 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos Kenya 1950. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenuotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGC<b>ATTCGCC</b>CATAAAAATTTATCCTTAT  <b>ACG</b>TTTTAGGGTATGAACTTCT<b>CATGC</b>CACAAAGT<b>AAAT</b>  ACAGAGGCTGC<b>A</b>TATATAG<b>AATTACCC</b>AATTTGCTAT<b>C</b>  <b>ATATC</b>ACCTTCGA<b>ACTG</b>CGGC<b>GGC</b>AGGAGGTCT<b>TCTTA</b>  <b>ACT</b>TTATGTTAG<b>AAACA</b>ATA<b>AAAGC</b>ATGGTGG<b>ATATCTG</b>  GATAAAACGGTTTTAT<b>CCGC</b>GGCTATCAG<b>GTACA</b>AGCA  TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCA<b>GGTT</b>CCCCG  TAAAAC<b>CGTTAAA</b>AACT<b>GTTACTCT</b>ATGCTGTGCAG<b>G</b>  CTCGGGCCCCCAAAAAAC<b>ACTGA</b>ACCTACTTTTATCT  TCCTTAAACTACTCCGTGCACACCAT<b>CAA</b></p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos Kenya 1950 fragmentas MGF505-10R</p>	<p>TTTTTGATGTTG<b>CCCTGCT</b>CCATAAAAATTTATCCTTAT  <b>ATG</b>TTTTAGGGTATGAACTTCT<b>TATGC</b>CACAAAGT<b>GAAT</b>  ACAGAGGCTGC<b>AA</b>TATAG<b>TGTATCCG</b>ATTTGCT<b>AA</b><b>C</b>  <b>ACAGC</b>ACCTTCGA<b>AGCG</b>CGGC<b>AGC</b>AGGAGGTCT<b>CCTTC</b>  <b>ATTTT</b>ATGTTAG<b>AGACAT</b>TAAAG<b>TATGGTGGGTGTGTG</b>  GATAAAACGGTTTTAT<b>TCGC</b>AG<b>CGATCAGTTACA</b>AA<b>CA</b>  TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCA<b>AGTT</b>CCCCG  TAAAAC<b>GGTTGAAG</b>AACT<b>ACTACTCC</b>ATG<b>CCGTGCAG</b><b>A</b>  CTCGGGCCCCCAAAAAAC<b>TCTGA</b>ACCTACTTTTATCTT  CCTTAAACTACTCCGTGCACACCAT<b>CA</b><b>T</b></p>

Atlikus palyginimą su atmaina Ken06.Bus pastebėta, jog 9 padėtyje vietoje A buvo G. 10 ir 11 pozicijoje C pakeistas į T. 14 nukleotidas pasikeitė iš C į A, o 15 iš C į T. 17 padėtyje vietoje G buvo C. 18 padėtyje C vietą užėmė G. 19 nukleotidas buvo ne T, o C. 41 ir 62 pozicijoje T pakeistas į C. 71 ir 74 nukleotidai pakeisti iš G į A. 90 padėtyje vietoje A buvo

T. 98 pozicijoje T pakeistas į A, o 99 – G į T. 105 padėtyje G vietą užėmė A. 114 nukleotidas pasikeitė iš A į T. 117 pozicijoje C pakeistas į T. 119 padėtyje vietoje G buvo T. 130 nukleotido vietoje buvo ne G, o C. 131 pozicijoje C pakeistas į T. 137 A pasikeitė į G. 149 padėtyje buvo pokytis iš C į T. 153 pozicijoje vietoje C buvo A. 155 nukleotidas pasikeitė iš T į C. 167 padėtyje G pakeistas į A. 171 nukleotidas pakeistas iš T į A. 177 pozicijoje vietoje T buvo C. 185 ir 187 nukleotidų vietose matytas ne G, o A. 189 padėtyje G vietą užėmė C. 208 pozicijoje T pakeistas į C. 212 padėtyje galima pastebėti pasikeitimą iš A į G. 215 padėtyje vietoje G buvo T. 221 nukleotidas buvo ne T, o G. 227 padėtyje A pakeistas į G. 255 pozicijoje esantį T pakeitė C. 260 padėtyje vietoje A buvo G. 275 nukleotidas buvo ne A, o C. 279 ir 282 pozicijose G pakeistas į A. 287 padėtyje A pasikeitė į G, o 288 – C į T. 294 ir 299 nukleotidai pakeisti iš C į T. 306 pozicijoje vietoje A buvo G. 326 ir 373 padėtyje T pakeistas į A. Rezultatai matomi ir 24 lentelėje.

**24 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos Ken06.Bus. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

<p>Lietuvoje nusekvenuotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10</p>	<p>TTTTTGATGTTGCATTCGCCATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGAACCTTCTCATGCACAAAGTAAAT ACAGAGGCTGCATATATAGAATTACCCAATTTGCTATC ATATCACCTTCGAACTGCGGCAGCAGGAGGTCTTCTTA ACTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG GATAAACGGTTTTATCCGCGGCTATCAGGTACAAGCA TAGGAAAATTGTGGCTCATTATTATCATCAGGTTCCCCG TAAAACCGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG CTCGGGCCCCCAAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAACTACTCCGTGCACACCATCAA</p>
<p>Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos Ken06.Bus fragmentas MGF505-10R</p>	<p>TTTTTGATACCGCCCTGCTCCATAAAAATTTATCCTTAT ATGTTTTAGGGTATGAACCTTCTTATGCACAAAGGTGAAT ACAGAGGCTGCAAAATATAGATGTACCCGATTTGCTAAC ACAGCACCTTCGAAAGCGCGGCAGCAGGAGGTCTCCTTC ATTTTATGTTAGAGACATTAAAGTATGGTGGGTGTGTG GATAAACGGTTTTATTCGCAGCGATCAGTTACAAACA TAGGAAAATTGTGGCTCATTATTATCAAGTTCCCCG TAAAACAGTTGAAGAACTACTACTCCATGCCGTGCAGA CTCGGGCCCCCAAAAAACTCTGAACCTACTTTTATCTT CCTTAACTACTCCGTGCACACCATCAT</p>

Palyginus su atmaina Ken05/Tk1 pastebėta, jog 14 padėtyje vietoje C buvo A. 15 pozicijoje C pakeistas į T. 17 nukleotidas pasikeitė iš G į C, o 18 – iš C į G. 19 padėtyje vietoje T buvo matomas C. 41 ir 62 pozicijose buvo ne T, o C. 74 padėtyje G pakeistas į A. 90 pozicijoje vietoje A buvo T. 98 padėtyje T vietą užėmė A. 99 nukleotidas buvo ne G, o T. 102 pozicijoje įvyko pasikeitimas iš T į C. 105 padėtyje G pakeistas į A. 114 pozicijoje A pasikeitė į T. 117 nukleotidas vietoje C buvo T. 119 padėtyje G vietą užėmė T. 130 pozicijoje G pakeistas į C, o 131 – C į T. 137 padėtyje įvyko pasikeitimas iš A į G. 149 nukleotido vietoje C pasikeitė į T. 153 pozicijoje C pakeistas į A. 155 padėtyje vietoje T buvo C. 167 pozicijoje G pakeistas į A. 171 padėtyje esantis T pakeistas į A. 177 nukleotido vietoje buvo pasikeitimas iš T į C. 185 ir 187 pozicijoje buvo ne G, o A. 189 padėtyje G pakeistas į C. 208 pozicijoje įvyko pokytis iš T į C. 212 padėtyje A pasikeitė į G. 215 nukleotidas pasikeitė iš G į T. 221 pozicijoje T pakeistas į G. 227 padėtį užėmė ne A, o G. 259 pozicijoje G pasikeitė į A, o 260 – A į G. 275 nukleotidas pakeistas iš G į C. 279 ir 282 padėtyje G pakeistas į A. 287 pozicijoje A pakeistas į G, o 288 – C į T. 294 ir 299 padėtyje esantys C pakeisti į T. 306 pozicijoje vietoje A buvo G. 308 nukleotidas pasikeitė iš C į T. 326 ir 373 padėtyse T pasikeitė į A. Rezultatai patalpinti 25 lentelėje.

**25 lentelė.** AKMV fragmento MGF505-10R sekos iš Lietuvoje paimtų mėginių ir Afrikoje randamos atmainos Ken05/Tk1. Raudonai pažymėti besiskiriantys nukleotidai.

Lietuvoje nusekvenuotas Afrikinio kiaulių maro viruso fragmentas MGF505-10	TTTTTGATGTTGC <b>ATTCGCC</b> CATAAAAATTTATCCTTAT ACGTTTTAGGGTATGA <b>ACTTCTCATGC</b> ACAAAGT <b>AAAT</b> ACAGAGGCTGCAT <b>TATATAGAATTACCC</b> AATTTGCTATC AT <b>ATCACCTTCGAACTGCGGC</b> GGCAGGAGGTCT <b>TCTTA</b> A <b>CTTTATGTTAGAAACAATAAAGCATGGTGGATATCTG</b> GATAAACGGTTTTAT <b>CCGCGGCTATCAGGTACAAGCA</b> TAGGAAAATTGTGGCTC <b>ATTTTATTCATCAGGTTCCCCG</b> TAAAAC <b>CGTTAAAAAACTGTTACTCTATGCTGTGCAGG</b> C <b>TCGGGCCCCCAAAAAAACACTGAACCTACTTTTATCT</b> TCCTTAA <b>ACTACTCCGTGCACACCATCAA</b>
Afrikinio kiaulių maro viruso atmainos Ken05/Tk1 fragmentas MGF505-10R	TTTTTGATGTTGC <b>CCTGCT</b> CCATAAAAATTTATCCTTAT A <b>TGTTTTAGGGTATGA</b> ACTTCT <b>TATGC</b> ACAAAGT <b>GAAT</b> ACAGAGGCTGC <b>AAATATAGATGTATCCG</b> AATTTGCT <b>AAAC</b> A <b>CAGCACCTTCGAA</b> <b>GCGCGCAGCAGGAGGTCTCCTTC</b> A <b>TTTTATGTTAGAGACATTAAAGTATGGTGGGTGTGTG</b>

	GATAAACGGTTTTATTCGCAGCGATCAGTTACAAACA TAGGAAAATTGTGGCTCATTTTATTCATCGAGTTCCCCG TAAACGGTTGAAGAACTATTACTCCATGCCGTGCAGAC CCGGGCCCCCAAAAAAATCTGAACCTACTTTTATCT TCCTTAACTACTCCGTGCACACCATCAT
--	--

## IŠVADOS

1. Parinktos optimalios PGR sąlygos: patikrintas pradmenų specifiskumas, nustatyta tinkamiausia pradmenų prilydimo temperatūra ir reakcijos mišinys.
2. Atlikta Lietuvoje cirkuliuojančio Afrikinio kiaulių maro viruso fragmento MGF505-10R Sanger sekoskaita, kurios rezultate gauti 48 fragmentai.
3. Pasitelkiant NCBI BLAST programą internete buvo surastos 68 žinomos Afrikinio kiaulių maro viruso atmainų genų sekos iš viso pasaulio.
4. Palygintos Lietuvoje cirkuliuojančios atmainos ir kitų rastų atmainų sekos ir pastebėta, jog lietuviškosios sekos skiriasi nuo kitų šalių variantų:
  - Lyginant su Europoje paplitusiomis atmainomis (Georgia 2007/1, ASFV CzechRepublic 2017/1, ASFV Moldova 2017/1, ASFV strain Belgium/Etalle/wb/2018, ASFV/Kyiv/2016/131, ASFV\_HU\_2018, ASFV/LT14/1490, ASFV-wbBS01, ASFV Belgium 2018/1, Georgia 2008/2, Georgia 2008/1, China/2018/AnhuiXCGQ, ASFV/POL/2015/Podlaskie ir Estonia 2014), pastebėtas vieno nukleotido pasikeitimas paskutinėje fragmento padėtyje;
  - Tas pats vieno nukleotido pokytis matomas ir Kinijoje paplitusiose viruso atmainose ASFV Wuhan 2019-2, ASFV Wuhan 2019-1 ir ASFV/pig/China/CAS19-01/2019 ir Pig/HLJ/2018 bei Afrikos atmainoje Mkuzi 1979.
  - Kiti Afrikoje paplitę viruso variantai turėjo daugiau nei vieno nukleotido skirtumą lyginant su lietuviškuoju ir šie skirtumai varijavo priklausomai nuo atmainos.

## PADĖKA

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo baigiamojo darbo vadovei Simonai Pilevičienei už patarimus, pagalbą ir palaikymą rengiant šį darbą.

Taip pat norėčiau išreikšti padėką ir kitiems Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo instituto molekulinės biologijos ir GMO skyriaus kolegoms, kurie visada ištiesdavo pagalbos ranką iškilus neaiškumams.

## SANTRAUKA

Grėta Gudonytė

Lietuvoje cirkuliuojančio Afrikinio kiaulių maro viruso fragmento MGF505-10R molekulinė analizė

Afrikinis kiaulių maras yra smarkiai paplitusi ir didelę socio-ekonominę žalą galinti sukelti gyvūnų liga. Kol kas nėra rastas veiksmingas ir šalutinio poveikio neturintis vakcinas variantas prieš šį susirgimą. Didžiąja dalimi taip yra dėl didelės viruso įvairovės, apimančios 24 skirtingus genotipus ir jų atmainas. Dėl šios priežasties yra svarbu išanalizuoti įvairias viruso atmainas ir jų sąsajas tarpusavyje. Todėl buvo vykdytas šis baigiamasis darbas, kurio metu buvo atlikta vieno iš AKMV genomo fragmentų – MGF505-10R sekoskaita. Panaudojus Sanger metodiką ir išanalizavus gautus rezultatus pastebėta, jog Lietuvoje paplitusioje viruso atmainoje buvo matomas vieno nukleotido skirtumas, lyginant su kitomis Europos atmainomis ir daugiau nei vieno nukleotido skirtumas atlikus palyginimą su žinomomis sekomis iš Afrikos izoliatų. Tai įrodo, jog AKMV yra nuolat kintantis ir turintis skirtingus variantus netgi to paties genotipo ribose.

## SUMMARY

Grėta Gudonytė

### Molecular Analysis of Lithuania Circulating African Swine Fever Virus Fragment MGF505-10R

African swine fever is a widely spreaded suidae disease, having a huge socio-economic impact. To this day, an effective vaccine without any side effects has not been discovered. Main reason for this problem is a wide variety of different African swine fever virus strains that include 24 genotypes and differences inside those. For this reason it is important to analyse each strain and find connections between them. This paper was also written to analyse African swine fever virus Lithuanian isolate. It was done by sequencing using Sanger method. After analysing the results of this experiment it was clear that Lithuanian isolate has a single nucleotide mutation in comparison with other European isolates. After sequence alignments with data from African strains there has been multiple mutations throughout fragment MGF505-10R. These results show that AFSV is continually changing and has different genome variants between genotypes.

## LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Alejo, A., Matamoros, T., Guerra, M., and Andrés, G. (2018). A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. *J. Virol.* 92, e01293-18, /jvi/92/23/e01293-18.atom.
2. Andrés, G., Charro, D., Matamoros, T., Dillard, R.S., and Abrescia, N.G.A. (2020). The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes. *J. Biol. Chem.* 295, 1–12.
3. Arias, M., de la Torre, A., Dixon, L., Gallardo, C., Jori, F., Laddomada, A., Martins, C., Parkhouse, R.M., Revilla, Y., Rodriguez, F. and J.-M., et al. (2017). Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines. *Vaccines* 5, 35.
4. Barasona, J.A., Gallardo, C., Cadenas-Fernández, E., Jurado, C., Rivera, B., Rodríguez-Bertos, A., Arias, M., and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2019). First Oral Vaccination of Eurasian Wild Boar Against African Swine Fever Virus Genotype II. *Front. Vet. Sci.* 6, 137.
5. Bellini, S., Rutili, D., and Guberti, V. (2016). Preventive measures aimed at minimizing the risk of African swine fever virus spread in pig farming systems. *Acta Vet. Scand.* 58, 82.
6. Blome, S., Gabriel, C., and Beer, M. (2013). Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res.* 173, 122–130.
7. Chenais, E., Depner, K., Guberti, V., Dietze, K., Viltrop, A., and Ståhl, K. (2019). Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014–2018. *Porc. Health Manag.* 5, 6.
8. Correia, S., Ventura, S., and Parkhouse, R.M. (2013). Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV. *Virus Res.* 173, 87–100.
9. Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D.U., and Dixon, L.K. (2009). African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2683–2696.
10. Cwynar, P., Stojkov, J., and Wlazlak, K. (2019). African Swine Fever Status in Europe. *Viruses* 11, 310.
11. Dixon, L.K., Islam, M., Nash, R., and Reis, A.L. (2019). African swine fever virus evasion of host defences. *Virus Res.* 266, 25–33.
12. Eblé, P.L., Hagenaars, T.J., Weesendorp, E., Quak, S., Moonen-Leusen, H.W., and Loeffen, W.L.A. (2019). Transmission of African Swine Fever Virus via carrier (survivor) pigs does occur. *Vet. Microbiol.* 237, 108345.
13. Farlow, J., Donduashvili, M., Kokhreidze, M., Kotorashvili, A., Vepkhvadze, N.G., Kotaria, N., and Gulbani, A. (2018). Intra-epidemic genome variation in highly pathogenic African swine fever virus (ASFV) from the country of Georgia. *Virol. J.* 15, 190.
14. Forth, J., Forth, L., King, J., Groza, O., Hübner, A., Olesen, A., Höper, D., Dixon, L., Netherton, C., Rasmussen, T., et al. (2019). A Deep-Sequencing Workflow for the Fast and Efficient Generation of High-Quality African Swine Fever Virus Whole-Genome Sequences. *Viruses* 11, 846.
15. Gallardo, C., Fernández-Pinero, J., Pelayo, V., Gazaev, I., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nieto, R., Fernández-Pacheco, P., Bokhan, S., Nevolko, O., et al. (2014). Genetic Variation among 16.

- African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1544–1547.
17. Gallardo, C., Nieto, R., Soler, A., Pelayo, V., Fernández-Pinero, J., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nurmoja, I., Granta, R., Simón, A., et al. (2015a). Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2555–2565.
  18. Gallardo, M.C., Reoyo, A. de la T., Fernández-Pinero, J., Iglesias, I., Muñoz, M.J., and Arias, M.L. (2015b). African swine fever: a global view of the current challenge. *Porc. Health Manag.* 1, 21.
  19. Gaudreault, N.N., and Richt, J.A. (2019). Subunit Vaccine Approaches for African Swine Fever Virus. *Vaccines* 7, 56.
  20. Golding, J.P., Goatley, L., Goodbourn, S., Dixon, L.K., Taylor, G., and Netherton, C.L. (2016). Sensitivity of African swine fever virus to type I interferon is linked to genes within multigene families 360 and 505. *Virology* 493, 154–161.
  21. Guinat, C., Gogin, A., Blome, S., Keil, G., Pollin, R., Pfeiffer, D.U., and Dixon, L. (2016). Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. *Vet. Rec.* 178, 262–267.
  22. Haines, F.J., Hofmann, M.A., King, D.P., Drew, T.W., and Crooke, H.R. (2013). Development and Validation of a Multiplex, Real-Time RT PCR Assay for the Simultaneous Detection of Classical and African Swine Fever Viruses. *PLoS ONE* 8, e71019.
  23. Inmaculada Galindo, and Covadonga Alonso (2017). African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses* 9, 103.
  24. Jurado, C., Martínez-Avilés, M., De La Torre, A., Štukelj, M., de Carvalho Ferreira, H.C., Cerioli, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., and Bellini, S. (2018). Relevant Measures to Prevent the Spread of African Swine Fever in the European Union Domestic Pig Sector. *Front. Vet. Sci.* 5, 77.
  25. Karger, A., Pérez-Núñez, D., Urquiza, J., Hinojar, P., Alonso, C., Freitas, F.B., Revilla, Y., Le Potier, M.-F., and Montoya, M. (2019). An Update on African Swine Fever Virology. *Viruses* 11, 864.
  26. Malogolovkin, A., and Kolbasov, D. (2019). Genetic and antigenic diversity of African swine fever virus. *Virus Res.* 271, 197673.
  27. Malogolovkin, A., Burmakina, G., Titov, I., Sereda, A., Gogin, A., Baryshnikova, E., and Kolbasov, D. (2015). Comparative Analysis of African Swine Fever Virus Genotypes and Serogroups. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 312–315.
  28. Martínez-López, B., Perez, A.M., Feliziani, F., Rolesu, S., Mur, L., and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015). Evaluation of the risk factors contributing to the African swine fever occurrence in Sardinia, Italy. *Front. Microbiol.* 06.
  29. Mazur-Panasiuk, N., and Woźniakowski, G. (2019). The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol.* 164, 1667–1672.
  30. Mazur-Panasiuk, N., Woźniakowski, G., and Niemczuk, K. (2019a). The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland. *Sci. Rep.* 9, 4556.
  31. Mazur-Panasiuk, N., Żmudzki, J., and Woźniakowski, G. (2019b). African swine fever virus – persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission. *J. Vet. Res.* 63, 303–310.

32. NACIONALINIS MAISTO IR VETERINARIJOS RIZIKOS VERTINIMO INSTITUTAS.

Standartinė darbo procedūra – Avių priono baltymo genotipo nustatymas. 2014, psl. 1 – 11.

33. Netherton, C.L., Connell, S., Benfield, C.T.O., and Dixon, L.K. (2019). The Genetics of Life and Death: Virus-Host Interactions Underpinning Resistance to African Swine Fever, a Viral Hemorrhagic Disease. *Front. Genet.* 10.

34. Penrith, M.-L., and Vosloo, W. (2009). Review of African swine fever: transmission, spread and control. 5.

35. Reis, A.L., Abrams, C.C., Goatley, L.C., Netherton, C., Chapman, D.G., Sanchez-Cordon, P., and Dixon, L.K. (2016). Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. *Vaccine* 34, 4698–4705.

36. Revilla, Y., Pérez-Núñez, D., and Richt, J.A. (2018). African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches. In *Advances in Virus Research*, (Elsevier), pp. 41–74.

37. Sánchez-Cordón, P.J., Montoya, M., Reis, A.L., and Dixon, L.K. (2018). African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry. *Vet. J.* 233, 41–48.

38. Sánchez-Vizcaíno, P.J.M., Martínez-López, B., Martínez-Avilés, M., Martins, C., Boinas, F., Michaud, V., Jori, F., Etter, E., Albina, E., and Roger, F. Scientific review on African Swine Fever. 142.

39. Sang, H., Miller, G., Lokhandwala, S., Sangewar, N., Waghela, S.D., Bishop, R.P., and Mwangi, W. (2020). Progress Toward Development of Effective and Safe African Swine Fever Virus Vaccines. *Front. Vet. Sci.* 7, 84.

40. Schulz, K., Staubach, C., and Blome, S. (2017). African and classical swine fever: similarities, differences and epidemiological consequences. *Vet. Res.* 48, 84.

41. Taylor, R.A., Condoleo, R., Simons, R.R.L., Gale, P., Kelly, L.A., and Snary, E.L. (2020). The Risk of Infection by African Swine Fever Virus in European Swine Through Boar Movement and Legal Trade of Pigs and Pig Meat. *Front. Vet. Sci.* 6, 486.

42. Woźniakowski, G., Frączyk, M., Niemczuk, K., and Pejsak, Z. (2016). Selected aspects related to epidemiology, pathogenesis, immunity, and control of African swine fever. *J. Vet. Res.* 60, 119–125.

43. Zhu, J.J., Ramanathan, P., Bishop, E.A., O'Donnell, V., Gladue, D.P., and Borca, M.V. (2019). Mechanisms of African swine fever virus pathogenesis and immune evasion inferred from gene expression changes in infected swine macrophages. *PLOS ONE* 14, e0223955.

44. Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T.G., Neilan, J.G., Kutish, G.F., Moore, D.M., and Rock, D.L. (2001). African Swine Fever Virus Multigene Family 360 and 530 Genes Are Novel Macrophage Host Range Determinants. *J. Virol.* 75, 3066–3076.

45. Zsak, L., Borca, M.V., Risatti, G.R., Zsak, A., French, R.A., Lu, Z., Kutish, G.F., Neilan, J.G., Callahan, J.D., Nelson, W.M., et al. (2005). Preclinical Diagnosis of African Swine Fever in Contact-Exposed Swine by a Real-Time PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 43, 112–119.