



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistro studijų programos II kurso studentė

Greta NARODOVSKAJA

Magistro baigiamasis darbas

**Galimas vabzdžių vaidmuo Afrikinio kiaulių maro viruso pernešime**

Darbo vadovė: Doc. Dr. Jurga Turčinavičienė

Vilnius 2020

## TURINYS

TURINYS.....	2
Santrumpos.....	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Afrikinis kiaulių maras.....	7
1.2. Afrikinis kiaulių maro virusas.....	8
1.2.1. Viruso plitimo būdai.....	9
1.3. Afrikinio kiaulių maro geografinis paplitimas.....	13
1.3.1. Afrikinio kiaulių maro viruso genotipų geografinis paplitimas.....	14
1.4. Afrikinio kiaulių maro viruso identifikavimo metodai.....	16
2. MEDŽIAGOS, APARATŪRA IR METODAI.....	20
2.1. Vabzdžių rinkimas.....	20
2.2. Mėginių kodavimas ir DNR išskyrimas (1 etapas).....	21
2.3. DNR išskyrimas iš vabzdžių naudojant DNeasy® rinkinį (2 etapas).....	21
2.4. Iš vabzdžių išskirtos DNR paruošimas polimerazinei grandininei reakcijai.....	22
2.5. Polimerazinė grandininė reakcija.....	23
2.6. Gelio elektroforezė.....	24
2.6.1. Agarozės gelio paruošimas.....	24
2.6.2. DNR mėginių ruošimas.....	24
2.6.3. Elektroforezės aparato parengimas ir mėginių įleidimas.....	24
2.6.4. Amplifikuotų DNR sekų įvertinimas.....	24
2.7. Statistinė analizė.....	25
2.7.1. Filogenetinio medžio konstravimas.....	25
2.7.2. Haplotipų tinklo braižymas.....	26
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	27
3.1. Vabzdžių, kuriuose rastas Afrikinis kiaulių maro virusas, analizė.....	27
3.2. Statistinė analizė.....	29
3.2.1. Genotipų nustatymas ir palyginimas.....	29

3.2.2. Tiriamų sekų palyginimas su Rytų, Centrine Europa ir Kaukazo regionu .....	34
3.2.3. Numatyti eksperimentai .....	37
IŠVADOS .....	38
PADĖKA .....	39
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	40
SANTRAUKA .....	49
SUMMARY .....	50
Priedai .....	51

## Santrumpos

**DNR** – deoksiribonukleino rūgštis

**RNR** – ribonukleino rūgštis

**PGR** – polimerazinė grandininė reakcija

**TBE** – tris – boro rūgštis

**min** – minutės

**val** - valandos

**sek** - sekundės

**ml** - mililitrai

**μl** – mikrolitrai

**m** – metai

**nt** - nukleotidai

**km** - kilometrai

**aps/ min** – apsisukimai per minutę

**bp** - bazių pora

**kbp** – kilobazių pora

**pvz** - pavyzdys

**UV** – ultravioletinė spinduliuotė

**AKM** – afrikinis kiaulių maras

**AKMV** – afrikinis kiaulių maro virusas

**mln** – milijonas

**JAV** – Jungtinės Amerikos Valstijos

**dH<sub>2</sub>O** – distiliuotas vanduo

**OIE** – Pasaulio gyvūnų sveikatos organizacija

**IPT** – imunoperoksidazės testas

**ELISA** – imunofermentinės analizės tyrimo metodas

**V** – voltai

**mA**

–

miliamperai

## IVADAS

Afrikinis kiaulių maras (AKM) – susirgimas, kurį Pasaulio gyvūnų sveikatos organizacija, dėl didelio mirtingumo, yra įtraukusi į privalomų pranešti ligų atvejų sąrašą. Afrikinio kiaulių maro virusas sukelia ženkliai didesnę sanitarinę, socialinę bei ekonominę poveikį nei kiti gyvūnų užsikrėtimai. Diagnozavus šią ligą, yra taikomi regioniniai, nacionaliniai bei tarptautiniai prekybos apribojimai. AKM paveikia naminius ir laukinius kiaulinių šeimos gyvūnus, nepriklausomai nuo veislės ir amžiaus, tačiau tai nėra zoonotinė liga, todėl ji nedaro poveikio visuomenės sveikatai. Liga yra sukeliama inkapsuliuoto, dvigrandės DNR viruso, priklausančio *Asfarviridae* šeimai (Yoo *et al.*, 2020).

Afrikinis kiaulių maro virusas pirmą kartą nustatytas Kenijoje 1920 m. 1950 metais virusas išplito Europoje, įskaitant Ispaniją, Portugaliją, Italiją, Prancūziją. Besilaikant griežtų naikinimo priemonių, 1990 m. Afrikinis kiaulių maras buvo išnaikintas Europoje, išskyrus Italijai priklausančią salą – Sardiniją. 2007 metais AKMV antrą kartą paplito vienoje iš Europos valstybių – Gruzijoje ir nuo tada yra aptinkamas daugelyje valstybių. 2014 metais virusas pasklido Rusijoje, Armėnijoje, Azerbaidžane, Ukrainoje, Baltarusijoje, Lenkijoje, Latvijoje, Estijoje ir Lietuvoje (Zhao *et al.*, 2019; Pautienius *et al.*, 2018).

Afrikinis kiaulių maras tarp naminių kiaulių ir laukinių šernų gali būti perduodamas tiesioginiu ir netiesioginiu būdu. Ūkiuose, paveiktuose AKM, viruso plitimą palengvina žemas biologinio saugumo lygis, tačiau kaip jis patenka į fermas, kuriose įgyvendintas aukšto biologinio saugumo lygis, nėra žinoma. Vienas iš AKMV galimų patekimo būdų į tokius biologinio saugumo ūkius gali būti per vabzdžius. Toks viruso perdavimas galėtų paaiškinti didėjančią maro protrūkį vasaros sezono metu tam tikrose Europos valstybėse. Negalima tvirtai teigti, kad vabzdžiai perduoda virusą kiaulių bandose, tačiau tai yra vienas iš galimų patekimo mechanizmų (Olesen *et al.*, 2018). Šio mokslinio darbo metu buvo įvertinta skirtingų vabzdžių rūšių įtaka Afrikinio kiaulių maro viruso pernešime.

### **Darbo tikslas:**

Nustatyti afrikinio kiaulių maro sukėlėjus vabzdžiuose bei įvertinti galimus viruso pernešėjus iš gamtinių židinių į kiaulių fermas.

### **Darbo uždaviniai:**

- išskirti DNR iš vabzdžių, sugautų AKM protrūkių metu bei iš gaudyklių Afrikiniu kiaulių maro virusu užkrėstose teritorijose;
- identifikuoti AKM virusą PGR metodu ir įvertinti viruso paplitimą skirtingose vabzdžių rūšyse;
- Nusekvenavus AKM viruso vp72 geno dalines DNR sekas, palyginti su kitose šalyse paplitusiais AKMV genotipais.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Afrikinis kiaulių maras

Afrikinis kiaulių maras (AKM) – užkrečiama kiaulinių (Suidae) šeimos liga, kuri gali būti perduodama įvairaus amžiaus ir lyties naminiams bei laukiniams šios šeimos atstovams. Maro ligos klinikiniai požymiai pasireiškia tik naminėms ir laukinėms kiaulėms bei europiniams šernams. Laukinės Afrikos kiaulės, Afrikos karmočiai (*Phacochoerus africanus*, *Phacochoerus aethiopicus*), krūmyninės kiaulės (*Potamochoerus porcus*, *Potamochoerus larvatus*) ir didžiosios miškinės kiaulės (*Hylochoerus meinertzhageni*) – besimptomiai AKMV nešiotojai ir galimi viruso plitimo šaltiniai. AKM yra ne zoonotinė liga, tačiau ji sukelia didelį socioekonominį poveikį. Didžiausi padariniai pastebimi šalyse, kuriose yra plėtojama kiaulininkystė bei vyksta gyvų kiaulių ir kiaulienos eksportas (Gallardo *et al.*, 2015; OIE, 2019).

Afrikinis kiaulių maras daro tiesioginį poveikį šalių ekonomikai, kadangi, paplitus ligai, turi būti nustatomos kontrolės priemonės. Kontrolės priemonės apima eksporto ribojimus, kiaulių ir mėsos kontrolę, gyvulių karantiną (Arias *et al.*, 2018). Kiaulininkystė nuolat auga dėl didėjančios kiaulienos paklausos. Kiaulių mėsa – svarbus žmogaus mitybos baltymų šaltinis daugelyje šalių, ypatingai tose srityse, kur kyla sunkumų auginant galvijus (Mazur – Panasiuk *et al.*, 2019). Būdai, naudojami AKM kontroliuoti, daro didelę įtaką maisto pramonės ekonomikai dėl didelio kiekio gyvulių, sergančių Afrikiniu kiaulių maru, kuriuos reikia utilizuoti. Svarbius ekonominius nuostolius Afrikoje patiria smulkūs ūkiai, kurie nesiima veiksmingų priemonių biologiniam saugumui užtikrinti. Patyrus ekonominius nuostolius, daugumai ūkininkų trūksta finansinių išteklių verslui atnaujinti.

Siekiant išnaikinti ligą įvairiose valstybėse, yra naudojami drastiški ir brangūs kontrolės būdai. Kuboje, kiaulių marui paplitus šalyje, buvo panaudota 9,4 mln JAV dolerių kovai su liga (įskaitant ir užsikrėtusių gyvulių sunaikinimą). Manoma, kad Ispanijoje, kiaulių, užsikrėtusių Afrikiniu kiaulių maru, sunaikinimo programa per pastaruosius 5 metus kainavo 92 mln. JAV dolerių. Atsižvelgiant į kiaulių produkciją, auginimą bei sunaikinimo išlaidas, apskaičiuota, kad AKM patekimo į Jungtines Amerikos valstijas užkirtimas kainuoja 4500 mln. JAV dolerių, tai sudaro beveik 5 % visos kiaulienos pardavimo vertės (Costard *et al.*, 2009). Pagal Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerijos 2018 metų, rugpjūčio 10 dienos, pateiktus duomenis, Afrikinio kiaulių maro židinių naikinimui išleista 18 mln. eurų (zur.lt, 2018).

AKM pirmą kartą aprašytas Kenijoje 1920 m., kaip ūmus hemoraginis karščiavimas, sukėlęs naminių kiaulių mirtingumą, siekiantį 100 procentų. Pastebėta, kad ligos protrūkiai kilo naminėms kiaulėms turint artimą kontaktą su laukinių gyvūnų rūšimis, ypač Afrikiniais karmočiais (*Phacochoerus aethiopicus* ir *Phacochoerus africanus*). Infekcijos šaltiniu nustatytas virusas, kurį nešiojo Afrikiniai karmočiai, neturintys jokių klinikinės ligos požymių (Galindo ir Alonso, 2017; Petrov *et al.*, 2018).

## 1.2. Afrikinis kiaulių maro virusas

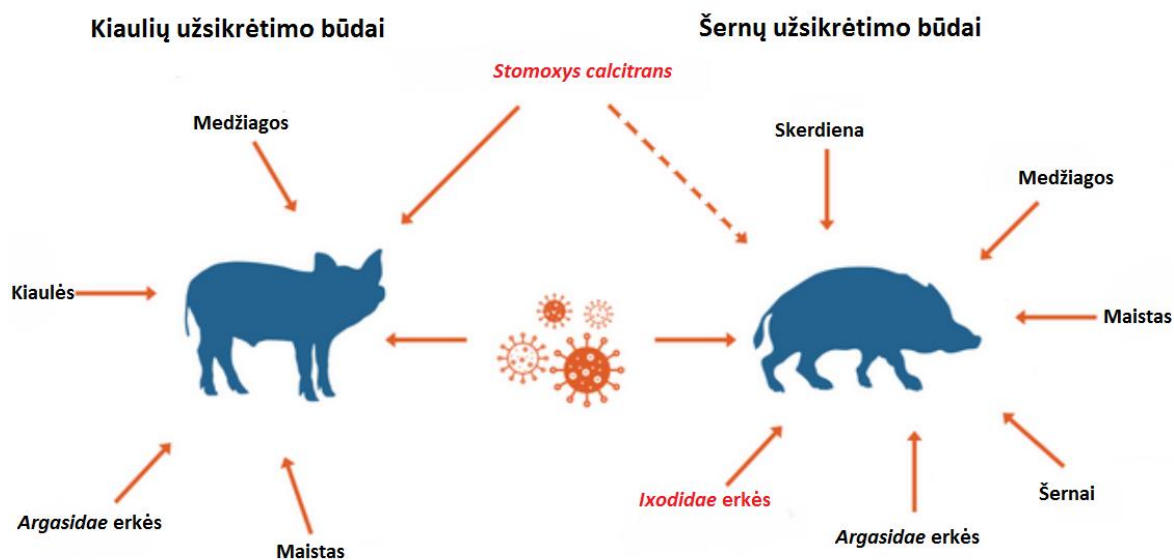
Afrikinis kiaulių maro virusas (AKMV) – vienintelis *Asfaviridae* šeimos narys, priklausantis *Asfivirus* genčiai (Keßler *et al.*, 2018). Tai ikosaedro formos virusas, susidedantis iš koncentrinėjų sluoksnių ir dvivijės DNR molekulės, kurios ilgis nuo 170 kbp iki 193 kbp. DNR sudaro konservatyvų regioną, kurio ilgis – 125 kilobazių poros ir du variabilūs galai. Genomo ilgis skiriasi priklausomai nuo multigenų šeimos narių praradimo arba prijungimo. Multigenų šeimos yra randamos kairiame arba dešiniame variabiliame regione. Afrikinio kiaulių maro virusinę DNR sudaro nuo 151 iki 167 atviro skaitymo rėmelių, kurie koduoja 54 struktūrinius baltymus ir apie 100 polipeptidų tam tikrose užkrėstose ląstelėse, makrofaguose bei monocituose. AKMV yra vienintelis iki šiol žinomas deoksiribonukleino rūgštį turintis arbovirusas (pernešamas nariuotakojų). Pagrindiniai viruso kapsidės komponentai: p72 baltymas, du struktūriniai baltymai p30 ir p54, polibaltymas pp62. Nustatyta, kad p72, p30, p54 ir pp62 pasižymi didžiausiomis antigeniškumo savybėmis tarp baltymų, atsakingų už antikūnų aktyvavimą infekcijos metu (Gallardo *et al.*, 2015; Alonso *et al.*, 2018).

P72 – pagrindinis Afrikinio kiaulių maro viruso baltymas, kuris koduojamas B646L geno. Šis baltymas pasižymi labai stipriomis antigeninėmis ir imunogeninėmis savybėmis. Susintetintas p72 tolygiai pasiskirsto tarp tirpios citoplazmos ir endoplazminio tinklo, susieto su membranomis. Buvo atliktas tyrimas, kurio metu kiaulėms įleista rekombinantinė vakcina. Vakciną sudarė p72 ir kiti virusiniai baltymai, ekspresuojami bakulovirusų sistemoje. Rezultatai parodė, kad p72 antikūnai geba užkirsti kelią AKMV prisijungimui prie makrofagų, tačiau, jie negali atlikti antikūnų sukeltos imuninės apsaugos. Atlikus dviejų p72 koduojamų genų, gautų iš Ugandos ir Dominikos Respublikos, Afrikinio kiaulių maro viruso padermių, sekų analizę, nustatyta, kad p72 yra labai konservatyvus, nepaisant jo išskyrimo iš skirtingų pasaulio vietų. Atlikta sekų analizė patvirtino, kad p72 antigeniškumas yra stabilus ir tinkamas AKMV serologiniams testams atlikti (Jia *et al.*, 2017).



### 1.2.1. Viruso plitimo būdai

Didelis viruso kiekis esantis ant maisto, medžiagų arba biologinių vektorių ir gyvūnų organizme suteikia galimybę infekcijai plisti tarp kiaulinių ir šernų tiesioginiu arba netiesioginiu būdu. Tiesioginis būdas – esant kontaktui tarp neužkrėstų ir užkrėstų gyvulių (naminės kiaulės, laukiniai šernai, Afrikiniai karpočiai), netiesioginis būdas – per užkrėstus daiktus, medžiagas, netinkamai apdorotą užkrėstą maistą arba biologinius vektorius – erkes (*Argasidae*) (1 pav.) (Guinat *et al.*, 2016).



**1 pav.** Galimi AKMV perdavimo keliai kiaulėse ir laukiniuose šeruose. *Stomoxys calcitrans* musės išskiriamos kaip galimas viruso perdavimo būdas kiaulėms. *Ixodidae* erkės yra žymimos raudona spalva, kadangi nėra duomenų, įrodančių kietųjų erkių gebėjimą pernešti virusą laukiniams šernams (Pagal Fila ir Woźniakowski, 2020).

Afrikinis kiaulių maro virusas gali būti laisvai perduodamas tarp užkrėstų kiaulių arba šernų tiesioginio kontakto metu per burną, nosį arba odą, tačiau yra nustatyta, kad plitimas aerozoliu galimas esant mažam atstumui tarp gyvūnų. Kiaulės, nurijusios maisto medžiagas, vandenį, kurių paviršius yra užkrėstas virusu taip pat gali susirgti Afrikiniu kiaulių maru (Brown and Bevins, 2018; Beltrán-Alcrudo *et al.*, 2018).

Gauti rezultatai rodo erkių gebėjimą perduoti Afrikinį kiaulių maro virusą. *Argasidae* šeimai priklausančios *Ornithodoros moubata* ir *Ornithodoros erraticus* erkės gali atlikti viruso pernešimo ir platinimo, per įkandimo vietas, vaidmenį Rytų Afrikoje, Pirėnų pusiasalyje, Kaukaze ir pietų Europoje, tačiau kitose šalyse šis reiškinys nėra užfiksuotas. Pagal 2018 metais

pateikiamus duomenis, nėra aptikta duomenų apie *Ornithodoros* paplitimą Europos žemyne (išskyrus pietų Europą). Tyrimai, atlikti su kita, *Ixodidae*, šeima, kuri yra didžiausia erkių grupė Europos žemyne, patvirtino, kad šie nariuotakojai nedalyvauja Afrikinio kiaulių maro viruso pernešime. Kadangi *Ornithodoros* erkių nėra aptikta didžiojoje Europos dalyje, o atlikti tyrimai su *Ixodidae* šeima patvirtina, kad jos nėra AKMV nešiotijos, mokslininkai kelia prielaidą, kad vabzdžiai, mintantys gyvūnų krauju ir pernešantys patogenus, yra galimi Afrikinio kiaulių maro viruso platintojai (Fila ir Woźniakowski, 2020; ECDC, 2018; Frant *et al.*, 2017).

Musės yra dažni vabzdžiai ūkiniuose pastatuose, kuriuose laikomi gyvūnai. Šie vabzdžiai turi tiesioginį kontaktą su užkrėstomis medžiagomis, tokiomis kaip užkrėstos negyvos kiaulės ir jų išskyros, todėl daroma prielaida, kad vabzdžiai gali būti svarbus kiaulių ligų plitimo rizikos veiksnys. Įrodyta, kad musės dažnai juda tarp kiaulių fermų (dažniausiai per 2 – 3 km atstumą), ypatingai esant stipriam vėjui, todėl, veikdamos kaip mechaniniai vektoriai, gali paskatinti ligų plitimą. Musės, kurios neperneša patogenų savo kraujuje, gali juos transportuoti mechaniškai ant kūno paviršiaus arba išmatose. Kraujasiurbiai vabzdžiai patogenus gali perduoti per kraują, todėl didžiausias dėmesys buvo sutelktas į jų tyrimus (Dixon *et al.*, 2019; Herm *et al.*, 2020; Fila ir Woźniakowski, 2020).

Rudeninė piktmusė (*Stomoxys calcitrans*) (2 pav.) – visame pasaulyje plačiai paplitęs kraujasiurbis vabzdys, kuris daro didelę ekonominę įtaką gyvulininkystės srityje. *S. calcitrans* patinai ir patelės minta krauju ir yra laikomi agresyviais ir aktyviais vabzdžiais. Šie kraujasiurbiai suvartoja apie 11 – 15  $\mu$ l kraujo per vieną įsisiurbimo kartą. *Stomoxys calcitrans* patogenus perduoda mechaniniu būdu. Visų pirma, kraujasiurbis vabzdys nutūpia ant užsikrėtusio gyvūno, siurbia jo kraują, gyvulys pajunta įkandimo skausmą ir gynybinių judesių būdu nutraukia kraujo čiulpimo procesą. Piktmusė nuskrenda ir nutūpia ant kito, sveiko gyvūno, siurbia jo kraują ir, seilių pagalba, perduoda burnos dalyje esančius patogenus į neužsikrėtusiojo



2 pav. *Stomoxys calcitrans* (Baldacchino *et al.*, 2013).

gyvulio organizmą. *Stomoxys calcitrans* gebėjimas pernešti patogenus ant sveiko galvijo buvo įrodytas moksliniais tyrimais, kurių metu nustatyta, kad rudeninė piktmusė geba regurgituoti užkrėsta kraują. Regurgitacija – procesas, kurio metu įsiurbtas kraujas pakartotinai grįžta į vabzdžio burnos ertmę. Atradimas apie *S. calcitrans* mokėjimą regurgituoti kraują, leido suprasti, kad ši parazitų rūšis gali atlikti labai svarbų vaidmenį ligų pernešimo procese (Showler ir Osbrink, 2015; Salem *et al.*, 2012; Fila ir Woźniakowski, 2020; Baldacchino *et al.*, 2013). Nepaisant rudeninių piktmusių gebėjimo įsiurbtą kraują gražinti į burnos ertmę, svarbu paminėti, kad patogenų išgyvenamumui įtakos gali ir turėti vabzdžių virškinimo sekrecija.

A. S. Olesen su kolegomis (Olesen *et al.*, 2018; Olesen *et al.*, 2018) atliko du mokslinius tyrimus siekiant plačiau sužinoti apie *Stomoxys calcitrans* poveikį Afrikiniam kiaulių marui. Vykdamt pirmąjį eksperimentą, buvo siekiama nustatyti, ar *Stomoxys calcitrans* gali būti laikomas Afrikinio kiaulių maro viruso pernešėju. Kiaulės buvo oraliniu būdu inokuliuotos homogenizuotomis arba nepažeistomis, torte esančiomis piktmusėmis. Prieš muses sušeriant gyvuliams, jos 1 val buvo maitinamos AKMV užkrėstu krauju. 7 iš 8 tirtų gyvūnų pasireiškė Afrikinio kiaulių maro klinikiniai požymiai. Pirmojo bandymo rezultatai patvirtino, kad *S. calcitrans* veikia kaip AKM mechaninis vektorius ir patogeną nešiojančio vabzdžio patekimas į sveiką organizmą oraliniu būdu gali sukelti infekciją. Antrojo tyrimo metu buvo tiriamas viruso išgyvenamumas ir pasiskirstymas skirtingose *Stomoxys calcitrans* organizmo vietose. Bandymo metu rudeninės piktmusės buvo maitinamos krauju, užkrėstu Afrikinio kiaulių maro virusu, naudojant membraninį maitintuvą su parafilmu membrana (3 pav.). AKMV užkrėstu krauju vabzdžiai buvo maitinami 1 val. *S. calcitrans* eutanazijos būdu buvo užšaldytos po šėrimo praėjus 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 ir 72 valandoms. Visos musės buvo atšildytos ir perpjautos į tris dalis: burnos dalis, galva ir kūnas (krūtinė ir pilvas). Ištyrus 8 piktmusių burnos ertmę, rasti maži AKM viruso deoksiribonukleino rūgšties kiekiai vabzdžių mėginiuose, kurie buvo užšaldyti po 0, 3 ir 12 maitinimo valandų. Galvos ir kūno mėginiuose aptiktas didesnis kiekis



**3 pav.** *Stomoxys calcitrans* vabzdžių maitinimas and membraninio maitintuvo (Olesen *et al.*, 2018).

Afrikinio kiaulių maro viruso DNR ir nuo 90 iki 100 % tiriamų bandinių teigiami praėjus mažiau nei 36 valandoms po maitinimo. Svarbu paminėti, kad keliuose galvos ir kūno mėginiuose viruso deoksiribonukleino rūgštis aptikta praėjus trimis dienoms po šėrimo. Gauti rezultatai rodo, kad kraujasiurbės musės virusą geba pernešti mažiausiai 12 valandų po mitinimosi užkrėstu krauju. AKMV DNR aptikimas *Stomoxys calcitrans* organizmuose praėjus iki 36 valandų po mitimo proceso patvirtina faktą, kad rudeninės piktusės atlieka svarbų vaidmenį Afrikinio kiaulių maro plitime ūkiuose, kuriuose yra didelis biologinis saugumas (Olesen *et al.*, 2018; Rivers ir Geiman, 2017).

Pavojingiausiais laikomi tokie patogenai, kurie kelia pavojų žmonių ir gyvūnų gyvybei, o kambarinė musė (*Musca domestica*) yra priskiriama prie šių mikroorganizmų nešiotojų. Šie vabzdžiai geba pernešti didelę įvairovę patogenų. *M.domestica* gyvenimo ciklas labai priklauso nuo aplinkos temperatūros. Esant didesnei temperatūrai, vystymosi ciklas trunka trumpiau. Svarbu paminėti, kad išmatose ir organinėse atliekose temperatūra yra didesnė nei aplinkoje, todėl šis faktas leidžia vabzdžiams vystytis esant nepalankioms sąlygoms, pavyzdžiui, žiemos ciklo metu. Moksliniai tyrimai patvirtina, kad *Musca domestica* gali perduoti bakterinius, virusinius ir grybelinius patogenus, kurie sukelia žmonių ir gyvūnų ligas. Įrodyta, kad kambarinė musė nešioja patogenus burnos ertmėje ir ant plaukų, kurie dengia kūnelį ir kojas. Mikroorganizmų, kurie sukelia susirgimus, aptikta *M. domestica* išmatose ir seilėse. Be kambarinių musių ūkiuose randama *Calliphora vomitoria* ir *Lucilia sericata* (Fila ir Woźniakowski, 2020).

*Lucilia* ir *Calliphora* mėsmusių gentis, priklausančios *Calliphoridae* šeimai, dažniausiai aptinkami vabzdžiai ant dvėselienos. Patelės padeda tūkstančius kiaušinėlių žaizdose arba atvirose angose. Išsiritusios lervos pradeda misti audiniais iškart po išsiritimo. Kadangi Afrikinis kiaulių maras aptinkamas užkrėstų gyvūnų kraujuje ir beveik visuose audiniuose, lervos turi tiesioginį sąlytį su AKMV. Atliktas mokslinis tyrimas, kurio metu buvo siekiama išsiaiškinti ar mėsmusių lervos, augančios ir besimaitinančios Afrikinio kiaulių maro virusu užkrėstais audiniais, gali veikti kaip mechaninis vektorius. Gauti rezultatai paneigė šią hipotezę, tačiau svarbu nepamiršti apie sparvinių vabzdžius, kurie, labai tikėtina, atlieka labai svarbų vaidmenį AKM plitime (Forth *et al.*, 2017).

*Tabanidae* (Sparvinių) šeima – vienas iš galimų mechaninių vektorių, platinančių Afrikinį kiaulių maro virusą. Lyginant su *Stomoxys calcitrans*, *Tabanidae* šeimai priklausančios vabzdžiai yra didesni ir gali skristi didesnius atstumus. Šios musės gali būti daugelio virusinių

patogen mechaniniai vektoriai. Priešingai nei *S. calcitrans*, sparviniai nesiveisia ūkiuose, kur yra laikomi gyvuliai, todėl gali turėti artimesnį kontaktą su miškuose gyvenančiais šernais. Be to, šios musės besimaitindamos išsiurbia 5 kartus daugiau kraujo lyginant su rudeninėmis piktusėmis, tai lemia didesnę viruso infekcijos tikimybę. Svarstant, koks viruso kiekis reikalingas užkrėsti gyvūną, svarbu atsižvelgti į gyvulio sveikatos būklę. Silpnos ir ligotos kiaulės yra jautresnės infekcijai dėl prastesnės imuninės sistemos, todėl patogeno kiekis ligai sukelti yra mažesnis. Virusui pasklidus organizme, jis gali toliau plisti tarp gyvūnų, esančių toje pačioje fermoje. Didelis kaulių kiekis mažame plote sukuria palankias sąlygas *Stomoxys calcitrans*, *Musca domestica*, *Calliphoridae*, *Tabanidae* vabzdžiams perduodant virusą (Fila ir Woźniakowski, 2020).

Afrikinio kaulių maro viruso plitimas vabzdžių pagalba yra didelis iššūkis tiek mažo, tiek didelio saugumo ūkiams, auginantiems ir veisiantiems kiaules. Šiuo metu trūksta duomenų, paaiškinančių netiesioginio viruso patekimo mechanizmą į aukščiausio biologinio saugumo ūkius. Naujų galimų AKMV vektorių identifikavimo tyrimai yra labai svarbūs, kadangi naujų biologinių ir mechaninių vektorių atradimas leis tiksliau suprasti viruso plitimo kelius, efektyviau kontroliuoti maro plitimą ir sustiprinti gyvulių ūkių auginimą (Mazur – Panasiuk *et al.*, 2019; Rovid Spickler, 2019).

### 1.3. Afrikinio kaulių maro geografinis paplitimas

Pirmą kartą aptikus Afrikinį kaulių marą 1920 m., jis greitai paplito daugelyje Afrikos valstybių, tačiau pirmasis įvežtinis maro atvejis užfiksuotas Portugalijoje 1957 m. Manoma, kad AKMV į Portugaliją pateko per užkrėstą kaulių ėdalą, kadangi šis būdas yra labai efektyvus virusui plisti dideliais atstumais. Portugalijoje Afrikinis kaulių maras užfiksuotas kaulėse, kurios buvo šeriamos netoli Lisabonos oro uosto (Boinas *et al.*, 2011). Sėkmingai išnaikinus ligą, ji vėl atsinaujino 1960 m. ir išplito daugelyje Europos šalių: 1995 m. Ispanijoje (Mur *et al.*, 2012), 1964 m. Prancūzijoje (Zsak *et al.*, 2005), 1964 m. Italijoje (Zhu ir Meng, 2020), 1978 m. Maltoje (de Carvalho *et al.*, 2012), 1978 m. Sardinijos saloje (Mur *et al.*, 2016), 1985 m. Belgijoje (Schulz *et al.*, 2019) ir 1986 m. Olandijoje (de Carvalho *et al.*, 2013). Nepaisant išplitimo, 1995 metais virusas Europoje buvo išnaikintas. Daugelį metų Afrikinis kaulių maras buvo fiksuojamas tik Sardinijos saloje ir Afrikos valstybėse, tačiau 2007 m. buvo paskelbta apie pirmąjį užsikrėtimo atvejį Gruzijoje. Manoma, kad kaulės šalyje užsikrėtė misdamos užterštomis viešojo maitinimo atliekomis, atkeliavusiomis laivu. Gruzija yra laikoma

pagrindine viruso baze, iš kurios AKM išplito daugelyje Europos valstybių. Visų pirma, virusas paplito kaimyninėse Gruzijos šalyse: 2007 m. Armėnijoje (Sargsyan *et al.*, 2018), Azerbaidžane, Rusijos Federacijoje (Misinzo *et al.*, 2012). 2012-2013 metais pranešti pirmieji viruso atvejai Baltarusijoje ir Ukrainoje. 2014 metais virusas pasiekė Europos Sąjungos valstybes: Lietuvą, Latviją, Estiją, Lenkiją. Šiuo metu Afrikinio kiaulių maro viruso atvejų užfiksuojama laukinių šernų ir naminių kiaulių organizmuose pastarosiose valstybėse. (Brown ir Bevins, 2018; Cwynar *et al.*, 2019; Rowlands *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2017). 2017-2018 m. duomenimis, su AKMV protrūkio problemomis šiuo metu susiduria ir Belgija, Bulgarija, Čekijos Respublika, Vengrija, Moldova ir Rumunija. Pranešta, kad nuo 2014 m. Europos sąjungos valstybėse Afrikinio kiaulių maro viruso užsikrėtė virš 12 000 šernų ir daugiau kaip 1 300 naminių kiaulių (Chenais *et al.*, 2019).

2014 metų sausio 24 dieną Lietuvos maisto ir veterinarijos tarnyba patvirtino pirmąjį Afrikinio kiaulių maro protrūkį Varėnos rajone dviems šernų skerdenoms. Pirmoji skerdena rasta 40 km nutolusi nuo Baltarusijos sienos, o antroji – 5 km. Atlikus infekuotų gyvūnų genų sekoskaitą nustatyta 100 % sekos homologija su Baltarusijos AKMV tipu. Šis įvykis parodė, kad virusas į Lietuvą pateko migruojant infekuotiems laukiniams šernams. Antrasis AKM atvejis nustatytas naminių kiaulių, aukšto biologinio saugumo, ūkyje, kuris įsikūręs Ignalinos ir Utenos rajonuose. Atstumas tarp pirmojo ir antrojo užsikrėtimo atvejų, apie 170 km.

Afrikinio kiaulių maro viruso epidemiologinė padėtis Lietuvoje turi būti laikoma rimta šalies problema dėl intensyvaus gyvulių auginimo ir didelio laukinių šernų paplitimo. 2010 metų duomenimis, naminių kiaulių populiacija Lietuvoje – 500 000, didžioji jų dalis (apie 60 %) auginama veisimo centruose su aukštu biologinio saugumo lygiu. 25 % gyvulių veisiama mažose ūkiuose ir 9 % laikomi lauke esančiose auginimo sistemose, turinčiose aukštą AKM užsikrėtimo riziką. Apibendrinant, nuo pirmojo ligos protrūkio Lietuvoje, iš viso patvirtinti 405 naminių kiaulių ir laukinių šernų užsikrėtimo atvejai (Cwynar *et al.*, 2019; vmvt.lt, 2016).

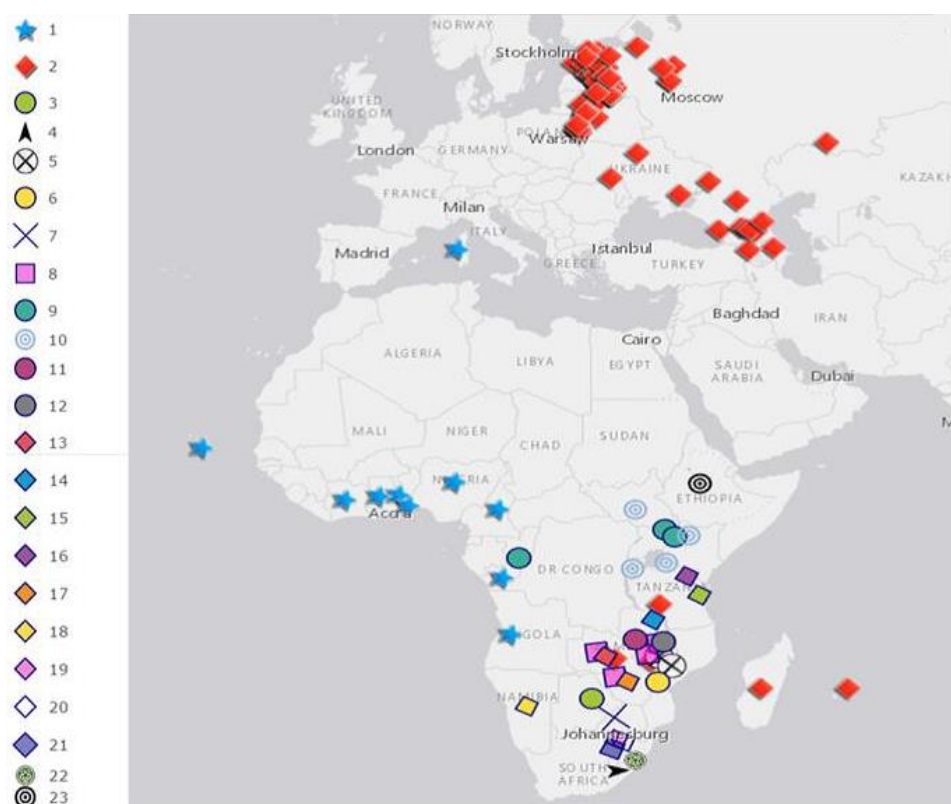
### 1.3.1. Afrikinio kiaulių maro viruso genotipų geografinis paplitimas

Pagrindinio kapsidės baltymo p72, kurį koduoja genas B646L, sekoskaita identifikavo 24 skirtingus Afrikinio kiaulių maro viruso genotipus (Achenbach *et al.*, 2017). Šios didelės genetinės įvairovės paplitimas priklauso nuo laukinių, naminių gyvūnų ir patogenų

platinimo nevaržomai judant maro protrūkio vietose. Visi 24 genotipai yra randami Afrikoje, tuo tarpu tik I ir II aptikti už šio žemyno ribų (4 pav.) (Brown ir Bewins, 2018; Arias *et al.*, 2017).

Ilgą laiką Afrikinio kiaulių maro viruso genotipai buvo aptinkami tik Afrikoje, tačiau 1957 ir 1960 metais I genotipas išplito Pirėnų pusiasalyje, Europos šalyse, Brazilijoje, Karibuose, o šiuo metu randamas Sardinijos saloje. 2007 m. iš Rytų Afrikos į Gruziją buvo įvežtas naujasis - II genotipas. II genotipas greitai pasklido Gruzijoje ir išplito Rusijos Federacijoje, Kaukaze ir Rytų Europos valstybėse (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2015; Gallardo *et al.*, 2018).

Naujo Afrikinio kiaulių maro viruso genotipo paplitimas Rytų Europos valstybėse sukėlė didelį mokslininkų susidomėjimą. Siekiant iširti II genotipo pokyčius bėgant laikui, buvo



**4 pav.** Afrikinio kiaulių maro viruso genotipų paplitimas Afrikos ir Europos žemynuose. Simboliai žymi 23 genotipus, paskutinis – 24 genotipas nėra pavaizduotas. Skaičius prie simbolio atitinka genotipą. (Arias *et al.*, 2017).

atlikti tyrimai, kurių metu surinkti ir palyginti 2007-2011 m. surinkti II genotipo mėginiai. Rezultatai parodė, kad II genotipas mažai pakito per 4-is metus. Afrikinio kiaulių maro mėginių genetinis panašumas įrodė, kad genotipas yra kilęs iš vieno bendro šaltinio (Mologolovkin *et al.*, 2012). Atliekant kitą mokslinį tyrimą, kurio tikslas – sužinoti daugiau apie Afrikinio kiaulių maro

viruso plitimą ir epidemiologiją, buvo analizuojamos Lenkijoje ir Lietuvoje išskirtos AKMV sekos. 2014 m. buvo surinkti mėginiai Lietuvoje ir Lenkijoje nuo nugaišusių šernų, atliekama bandinių sekoskaita ir gauti rezultatai lyginami su genais iš 2013 m. Baltarusijos, 2012 m. Rusijos ir 2007 m. Gruzijos. Palyginus rezultatus nustatyta, kad AKMV Lietuvos ir Lenkijos mėginių sekos 100 % homologinės su Rytų Europos valstybių sekomis. Rezultatai parodė, kad pastarųjų dviejų valstybių (Lietuvos ir Lenkijos) sekos turi pasikartojantį intarpą, kuris aptiktas ir mėginiuose iš Baltarusijos ir Ukrainos valstybių, tačiau nerastas Rytų Europos šalyse, įskaitant Rusijos Federaciją ir Gruziją. Šis sutapimas patvirtina faktą, kad Afrikinis kiaulių maro virusas į Lietuvą pateko per Baltarusiją (Sánchez-Cordón *et al.*, 2018; Gallardo *et al.*, 2014).

#### 1.4. Afrikinio kiaulių maro viruso identifikavimo metodai

Iki šiol nėra nei vakcinos, nei gydymo būdo nuo Afrikinio kiaulių maro viruso (Arias *et al.*, 2017). Kontrolės prieš AKMV grindžiamos klasikiniiais ligos kontrolės metodais, įskaitant gyvulių stebėjimą, epidemiologinius tyrimus, užkrėstų židinių sunaikinimą. Pasyvus kiaulių stebėjimas, pagrįstas AKMV klinikinių požymių aptikimu ir dideliu mirtingumu atlieka pagrindinį vaidmenį siekiant identifikuoti ligą ankstyvoje stadijoje. Be to, atsižvelgiant į faktą, kad užkrėstas gyvūnas gali būti pasyvus viruso nešiotojas, kiaulių priežiūra ir stebėsena teikia vertingų duomenų apie ligos vystymosi eigą ir veiksmingų kontrolės priemonių pritaikymą. Tačiau, gauti greitą Afrikinio kiaulių maro viruso diagnozę, būtina laboratorinė įranga ir molekuliniai tyrimai, kurie leis laiku identifikuoti ligą ir ją sustabdyti (Gallardo *et al.*, 2015).

Afrikinio kiaulių maro viruso molekuliniai tyrimai vykdomi atliekant B646L geno, 3' galo, realaus laiko polimerazinę grandininę reakciją. Atvirasis skaitymo rėmelis koduoja pagrindinį kapsidės baltymą p72, kuris skirstomas į 24 atskirus genotipus. Maro protrūkio metu, p72 genotipavimas gali būti naudojamas nustatyti viruso kilmei. Norint atskirti pogrupius tarp glaudžiai susijusių AKMV, atliekama tandemiškai pasikartojančių sekų, esančių B646L geno centriniame variabiliame regione ir tarpgeniniame regione tarp I73R ir I329L genų, analizė. Kiti genų regionai: E183L (koduojantis p54 baltymą), CP204L (koduojantis p30 baltymą), EP402R (koduojantis CD2v baltymą) yra naudojami analizuoti Afrikinį kiaulių maro virusą skirtingose pasaulio vietose ir, tokiu būdu, sekti viruso plitimą (OIE, 2019; Ge *et al.*, 2018; Mologolovkin *et al.*, 2015).

Afrikinio kiaulių maro viruso identifikavimui reikalingi gyvūnai, kurie anksčiau sirgo arba šiuo metu nešioja AKMV. Tinkamas kiaulių maro ligos nustatymas apima specifinių viruso



antigenų arba DNR ir antikūnų aptikimą. Aptikta liga gali būti skirtingose vystymosi stadijose, dėl šios priežasties būtina iširti tiek virusą, tiek antikūnus (Gallardo *et al.*, 2015; Beltrán-Alcrudo *et al.*, 2018).

Pasaulinė gyvūnų sveikatos organizacija (OIE) rekomenduoja atlikti šiuos testus viruso identifikavimui: viruso išskyrimas, tiesioginių fluorescencinių antikūnų metodas (FAT), realaus laiko PGR, įprastinis PGR testas, imunofermentinės analizės tyrimo metodas (ELISA). Polimerazinės grandininės reakcijos testai yra plačiausiai naudojami Europos Sąjungoje. PGR yra plačiai naudojamos dėl jautrumo, kuris suteikia ankstyvos ligos stadijos identifikavimo privalumą. Per paskutinius 20 metų sukurta didelė įvairovė PGR testų, kurie geba atpažinti įvairius viruso genotipus. Testai yra sukurti viruso vp72 geno sekų identifikavimui mėginiuose. Kitas naudojamas metodas – ELISA. Imunofermentinės analizės tyrimo metodas leidžia tirti didelį kiekį bandinių, tačiau jis yra ne toks jautrus kaip polimerazinė grandininė reakcija, todėl nėra toks paklausus.

Afrikinio kiaulių maro antikūnų aptikimui naudojama ELISA – antikūnų atrankai. Imunofermentinės analizės rezultatams patvirtinti atliekamas imunoblotingas arba netiesioginė imunoflorescencija. Netiesioginės imunoperoksidazės testas (IPT) pasižymi veiksmingu analitiniu bei diagnostiniu jautrumu ir gali būti naudojamas kaip alternatyva imunoblotingui arba netiesioginei imunoflorescencijai. IPT privalumas lyginant su kitais testais – lengvas pritaikymas daugeliui mėginių ir pigumas (kadangi nereikia brangios fluorescencinio mikroskopo įrangos).

Afrikinio kiaulių maro diagnozavimas turi būti pagrįstas virusologiniais, logoanatominiais, epizoonotiniais, serologiniais ir klinikiniais tyrimais. 1 lentelėje yra pateikiami pagrindiniai AKM tyrimai ir jų charakteristikos (Gallardo *et al.*, 2015; Gallardo *et al.*, 2019; Beltrán-Alcrudo *et al.*, 2018).

**1 lentelė.** Afrikinio kiaulių maro laboratorinės diagnostikos metodų apžvalga (Beltrán-Alcrudo *et al.*, 2018).

Viruso išskyrimo metodas	Laikas (val.)	Jautrumas	Mėginio rūšis	Komentarai
Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)	5 - 6	XXX	Audiniai, kraujas, ląstelių kultūros, erkės, vabzdžiai	Labiausiai paplitęs metodas. Jautrus kontaminacijai. Aptinka tiek gyvą, tiek mirusį virusą
Hemadsorbcinė reakcija (HadR)	168 – 504	XX	Kiaulių makrofagai	Naudojamas tik kai kuriose etaloninėse laboratorijose
Tiesioginių fluorescencinių	1,25	XXX	Kriopjūvis, tepinėlis, ląstelių	Rekomenduojama, jei nėra PGR arba nėra patirties. Reikalingas

antikūnų metodas (FAM)			kultūra	fluorescencinis mikroskopas. Nepakankamai jautrus praėjus savaitei po užkrėtimo
ELISA	3	X	Serumas, audiniai	Paprastai nenaudojamas. Nepakankamai jautrus praėjus savaitei po užkrėtimo
Antikūnų išskyrimo metodas	Laikas (val.)	Jautrumas	Mėginio rūšis	Komentarai
ELISA	3	X	Serumas	Atrankos testas. Yra laboratoriniai vidiniai ir komerciniai rinkiniai
Imunoblotingas (IB)	3	X	Serumas	Patvirtinantis testas. Nėra komercinių rinkinių
Netiesioginių fluorescencinių antikūnų metodas (nFAM)	4	XXX	Serumas, plazma	Patvirtinantis testas. Nėra komerciškai prieinamų reagentų. Būtinai fluorescencinis mikroskopas

Šiuo metu Afrikiniam kiaulių maro diagnozavimui naudojami būdai leidžia užtikrintai identifikuoti virusą bet kurioje ligos stadijoje. Tačiau AKMV diagnozavimą apsunkina ligos klinikinių formų ir simptomų panašumas su kitais susirgimais, pavyzdžiui, Klasikiniu kiaulių maru. Dabartinė Afrikinio kiaulių maro padėtis Europoje skatina mokslininkus patikrinti dabar atliekamų viruso identifikavimo testų jautrumą, specifiškumą bei efektyvumą. 2015 m. Gallardo su kolegomis (Gallardo *et al.*, 2015) atliko tyrimą, kurio metu buvo palygintos AKM diagnostikos testų savybės, įskaitant jautrumą ir specifiškumą. Tyrimų metu buvo naudojami trys AKMV izoliatai priklausantys p72 II genotipui. Naudoti mėginiai iš gyvulių, kurios buvo auginamos Afrikiniu kiaulių maru užkrėstose Europos šalių teritorijose ir iš gyvūnų, naudotų AKMV eksperimentiniuose tyrimuose. Siekiant identifikuoti virusą, buvo naudojami trys PGR metodai: OIE nurodytas paprastas, OIE nurodytas realaus laiko ir „Roche“ įmonės sukurtas „Universal ProbeLibrary“ (UPL) realaus laiko. Remiantis 165 trumpais hidrolizės zondais, UPL leidžia sukurti realaus laiko polimerazinės grandininės reakcijos mėginius per kelias sekundes ir iširti virš 5 milijonų bet kurio sekvenuoto organizmo transkriptų virtualioje erdvėje. Lengvai naudojama „ProbeFinder Assay“ programinė įranga rodo taikiniui būdingas pradmenų sekas ir atitinkamą „Universal ProbeLibrary“ zondą. Palyginus visas technikas, nustatyta, kad UPL polimerazinė grandininė reakcija tik 6 % skiriasi nuo OIE nurodyto realaus laiko PGR metodo ir 12 % skirtumas lyginant su paprastu PGR. „Roche“ sukurtas būdas leidžia anksčiau nustatyti ligą ir išsiskiria jautrumu. AKM antikūnų nustatymo efektyvumui tirti buvo naudojami penki metodai: trys komerciniai ELISA, OIE nurodytas ELISA ir imupoeroksidazės testas. Lyginant

ELISA ir imunoperoksidazės metodus, IPT buvo pranašesnis jautrumu ir gebėjimu antikūnus aptikti mažoje koncentracijoje. Apibendrinant, galima teigti, kad „Universal ProbeLibrary“ realaus laiko PGR ir imunoperoksidazės testas buvo patikimiausi AKM aptikimo būdai (Gallardo *et al.*, 2015; lifescience.roche.com, 1999).

Viruso identifikavimo būdai aktyviai naudojami tyrimuose su vabzdžiais. Olesen su kolegomis (Olesen *et al.*, 2018; Olesen *et al.*, 2018) atliko du tyrimus su *Stomoxys calcitrans* piktmusėmis (plačiau tyrimai aprašyti 1.2.1. poskyryje). Mokslinių tyrimų metu, Afrikinio kiaulių maro viruso aptikimui vabzdžiuose, buvo pritaikytas realaus laiko polimerazinės grandininės reakcijos metodas. Bandymuose, viruso identifikavimui, buvo panaudotas vp72 genas, o antikūnų detekcijai – ELISA.

2019 metais, Estijoje, buvo atliktas tyrimas, kurio metu norėta įvertinti vabzdžių, kaip galimų mechaninių vektorių, gebėjimą platinti Afrikinio kiaulių maro virusą. Aptikus AKM viename iš Estijos kiaulių ūkių, užkrėstoje fermoje gaudyklėmis atsitiktinai sugauta 15 skirtingų vabzdžių rūšių. Deoksiribonukleino rūgštis, išskirta iš vabzdžių, buvo analizuojama realaus laiko PGR metodu, naudojant p72 geną. Nedidelis virusinės DNR kiekis buvo rastas tik dvejuose musių ir dvejuose uodų mėginiuose. Atsižvelgiant į lėtą viruso plitimą ūkyje, gauti tyrimų rezultatai negali patvirtinti vabzdžių, kaip mechaninių vektorių, vaidmens. Norint įvertinti vabzdžių vaidmenį Afrikinio kiaulių maro viruso plitime, reikia analizuoti didesnę vabzdžių kiekį, įskaitant kraujasiurbius, kurie yra aptinkami už ūkio pastato ribų (Herm *et al.*, 2020).

## 2. MEDŽIAGOS, APARATŪRA IR METODAI

Tyrimai buvo atliekami nuo 2019.02.01 Vilniaus universiteto Zoologijos katedros laboratorijose.

### 2.1. Vabzdžių rinkimas

Vabzdžius rinko Vilniaus universiteto zoologijos katedros dėstytojai nuo 2018 m. iki 2019 m. Vabzdžiai buvo gaudomi naudojant *Nzi* gaudykles (5 pav.) bei entomologinius tinklelius (AKM protrūkio vietose). Gaudyklės buvo statomos kiaulių fermų teritorijose, regionuose, kur buvo aptikta AKMV užsikrėtusių šernų.



**5 pav.** *Nzi* gaudyklė kiaulių komplekso teritorijoje, Poškaičiuose, Nemenčinės seniūnija, Vilniaus rajonas.

*Nzi* gaudyklės – geriausia priemonė *Stomoxys* genties musių rinkimui. Naudojant šį būdą yra sugaunama aštuonis kartus daugiau vabzdžių lyginant su geriausiai vertinama gaudykle (Vavoua). Kitas *Nzi* gaudyklės privalumas – didelių vabzdžių patekimas į tinklą (Mihok, 2002; Desquesnes *et al.*, 2013).

Sugauti vabzdžiai saugojami mėgintuvėliuose, 96 % etilo alkoholyje.

## 2.2. Mėginių kodavimas ir DNR išskyrimas (1 etapas)

Mėginių kodavimas ir DNR išskyrimas buvo atliekamas toliau nurodyta tvarka:

1. Paruošiama aplinka darbui: 96 % etilo alkoholiu nudezinfekuojami paviršiai ir darbo priemonės.
2. Virš spiritinės lemputės įkaitinami pinceto galai ir įmerkiami į etilo alkoholį.
3. Išimamas vabzdys iš mėgintuvėlio, perkeliamas ant objektinio stiklelio ir paliekamas 2 min. tam, kad išgaruotų etilo alkoholis.
4. Įkaitinama entomologinė adata virš spiritinės lemputės.
5. Sąsiuvinyje pažymima toliau išvardinta informacija apie vabzdį: identifikacinis numeris, rinkimo data, rinkimo vieta.
6. Biologinio mikroskopo (Nikon) pagalba, naudojant entomologinę adatą, keletą kartų įduriama į vabzdžio pilvelio sritį. Vabzdžio pilvelis badomas siekiant užtikrinti didesnę išskiriamos DNR kiekį.
7. Į mėgintuvėlį su vabzdžiu įpilama 180 µl ATL buferio (Qiagen) ir 20 µl proteinazės K (Qiagen). Mėgintuvėlyje esantis turinys išmaišomas vorteksuojant sukuriniame maišytuve (Eppendorf).
8. Visi žingsniai (1 – 7) kartojami su kiekvienu vabzdžiu atskirai.
9. Mėgintuvėliai su vabzdžiais dedami į besisukančią mėgintuvėlių maišyklę (Stuart), kuri įstatyta į termostatą (Thermo Fisher Scientific). Mėgintuvėliai maišyklėje paliekami per naktį, esant 56 °C.

## 2.3. DNR išskyrimas iš vabzdžių naudojant DNeasy<sup>®</sup> rinkinį (2 etapas)

Tolesniam vabzdžių išskyrimui buvo naudojamas DNeasy<sup>®</sup> kraujo ir audinių rinkinys (Qiagen).

DNeasy<sup>®</sup> kraujo ir audinių rinkinį sudaro:

1. DNeasy mini kolonėlės, esančios 2 ml surinkimo tūbelėse;
2. Surinkimo tūbelės (2 ml);
3. AL buferis;
4. AW1 buferis;
5. AW2 buferis;
6. AE buferis.

Vabzdžių deoksiribonkleino rūgštis išskiriama remiantis DNeasy<sup>®</sup> protokolu:

1. Įpilama 200 µl AL buferio į mėginį (mėgintuvėlį, kuriame saugomas tiriamas vabzdys), kruopščiai išmaišoma vorteksuojant sukuriniame maišytuve ir inkubuojama 10 min. esant 70°C.
2. Įpilama 200 µl 96 % etanolio į mėginį, kruopščiai išmaišoma vorteksuojant.
3. 2 žingsnyje paruoštas mišinys automatine pipete (Eppendorf) perpilamas į minikolonėlę ir centrifuguojamas 6000 x g 1 minutę.
4. Minikolonėlė perkeliama į naują tūbelę (senoji išmetama), įpilama 500 µl AW1 buferio ir centrifuguojama 6000 x g 1 minutę.
5. Minikolonėlė perkeliama į naują tūbelę (senoji išmetama), įpilama 500 µl AW2 buferio ir centrifuguojama 3 min. maksimaliu greičiu (20.000 x g).
6. Minikolonėlė perkeliama į 1,5 ml tūbelę (sena surinkimo kolonėlė išmetama). Automatine pipete įpilama 50 µl AE buferio tiesiogiai ant filtro ir inkubuojama kambario temperatūroje 1 min.
7. Centrifuguojama 6000 x g 1 min.
8. Išskirta DNR saugoma -20°C.

#### 2.4. Iš vabzdžių išskirtos DNR paruošimas polimerazinei grandininei reakcijai

Tyrimuose naudoti Afrikinio kiaulių maro viruso kapsidės baltymo P72 pradmenys - P72-F ir P72-R (2 lentelė) (Luo *et al.*, 2017).

**2 lentelė.** Duomenys apie tyrimuose naudotus P72 pradmenis (Luo *et al.*, 2017).

Kapsidės baltymo P72 pradmenys		
P72-F	5'-GGT TGG TAT TCC TCC CGT G-3'	Produktai 326 bp ilgio
P72-R	5'-GAT TGG CAC AAG TTC GGA C-3'	

Polimerazinei grandininei reakcijai naudojami reagentai:

1. H<sub>2</sub>O (Thermo Fisher Scientific);
2. Pradmuo P72-F;
3. Pradmuo P72-R;
4. DreamTaq™ polimerazė (Thermo Fisher Scientific).

Visi reagentai, kurie bus naudojami polimerazinės grandininės reakcijos metu, yra atšildomi kambario temperatūroje. Atitirpę reagentai centrifuguojami centrifugoje (IKA). Fermentai turi būti laikomi ledo vonelėje norint išvengti reakcijų pradžios.

Vienos polimerazinės grandininės reakcijos galutinis tūris – 25 µl (3 lentelė).

**3 lentelė.** Darbo metu naudoti reagentai ir jų kiekiai.

Reagentai	1 mėginys (µl)	10 mėginių (µl)
ddH <sub>2</sub> O	8,5	85
P72-F pradmuo	1	10
P72-R pradmuo	1	10
Dream Taq polimerazė	12,5	125
Bendras	23 µl reagentų tirpalo + 2 µl DNR	

Visų pirma, pilamas distiliuotas vanduo, po to, likusieji reagentai. Mėginių paruošimas turi vykti steriliomis sąlygomis, siekiant maksimaliai sumažinti užsikrėtimo riziką, todėl darbai atliekami PGR bokse (Telstar). Paruošiama 10 mėgintuvėlių amplifikacijai. Pirmi 8 mėgintuvėliai yra sunumeruojami eilės tvarka nuo 1 iki 8. Likusieji du - neigiamai ir teigiamai kontrolėms atlikti. Vienas pažymimas K<sup>-</sup> (neigiama amplifikacijos kontrolė), kitas K<sup>+</sup> (teigiama amplifikacijos kontrolė). Į mėgintuvėlius, sunumeruotus 1 – 8, pilama po 23 µl pagaminto tirpalo ir po 2 µl DNR. Į K<sup>-</sup> mėgintuvėlį pilama 23 µl pagaminto tirpalo ir 2 µl ddH<sub>2</sub>O, o į K<sup>+</sup> 23 µl tirpalo ir 2 µl teigiamo DNR pavyzdžio.

## 2.5. Polimerazinė grandininė reakcija

Paruošti mėgintuvėliai, su 8 tiriamaisiais mėginiais ir 2 kontrolėmis, yra sustatomi į amplifikatorių (Eppendorf), nustatoma polimerazinės grandininės reakcijos programa (4 lentelė.), pagal (Luo *et al.*, 2017).

**4 lentelė.** Tyrimų metu atliekamos polimerazinės grandininės reakcijos ypatybės.

Temperatūra (°C)	Ciklo trukmė (min.)	Ciklo pakartojimų skaičius
95	5	-
95	0,5	40

52	0,5	
72	0,5	
72	10	-
4	-	-

## 2.6. Gelio elektroforezė

### 2.6.1. Agarozės gelio paruošimas

Ruošiama 100 ml agarozės gelio, kuriame agarozės miltelių koncentracija – 1,5 %, TBE buferio – 10 %. Kolboje sumaišoma 90 ml dH<sub>2</sub>O, 10 ml 10X TBE elektroforezės buferio (Thermo Fisher scientific) ir 1,5 g agarozės miltelių (Thermo Fisher Scientific). Gautas tirpalas atsargiai sumaišomas ir šildomas mikrobangų krosnelėje (Galanz) tol, kol kolboje visiškai ištirpsta agarozės milteliai. Tirpalą atvėsinus iki kambario temperatūros, įlašinami 3 lašai 0,07 % etidžio bromido (Inno-train). Paruoštas skystas agarozės gelis atsargiai supilamas į vonele, įstatomos šukutės, gelis paliekamas stingti 30 min.

### 2.6.2. DNR mėginių ruošimas

Ant parafilmo juostelės, 5 µl tiriamojo DNR mėginio sumaišomi su 1 µl MassRuler dažais (Thermo Fisher Scientific). Ši procedūra atliekama su kiekvienu tiriamu mėginiu ir teigiama bei neigiama kontrolėmis atskirai.

### 2.6.3. Elektroforezės aparato parengimas ir mėginių įleidimas

Į elektroforezės kamerą (Amersham Biosciences) įdedamas sustingęs agarozės gelis, išimamos šukutės, įpilama 10 % koncentracijos TBE elektroforezės buferio. Į pirmąjį šulinėlį automatinė pipete suleidžiami 6 µl FastRuler malekulinio masės žymens (markerio) (Thermo Fisher Scientific), į likusius - paruošti deoksiribonukleino rūgšties mėginiai, kontrolės. Uždaroma kamera, prijungiami laidai, nustatoma 15 V įtampa, 350 mA elektros srovės stipris, įjungiamas elektroforezės energijos tiekėjas (Amersham Biosciences). Elektroforezės trukmė – 20 minučių.

### 2.6.4. Amplifikuotų DNR sekų įvertinimas



Sekų įvertinimas atliekamas žemiau nurodyta seka:

1. Iš kameros gelis su amplifikuotomis sekomis perkeliamas į UV vaizdavimo kamerą (UVITEC).
2. Kompiuteryje, susietame su ultravioletinės spinduliuotės vaizdavimo kamera, įjungiama „FireReader“ programa, paspaudžiama „Start Preview“ funkcija.
3. Vaizdo, matomo kompiuteryje, pagalba, gelis lygiai padedamas ant stiklinio vaizdavimo kameros paviršiaus.
4. Uždaromos kameros durelės, nuspaudžiamas UV mygtukas, programoje paspaudžiama „Auto Exposure“ funkcija.
5. Mėginiai, kuriuose nustatomos viruso sekos, yra saugomi šaldiklyje, likusieji – pašalinami.

## 2.7. Statistinė analizė

### 2.7.1. Filogenetinio medžio konstravimas

Siekiant statistinius metodus padaryti prieinamus filogenetinių medžių analizei, naudota MEGA 7.0 programa. Ši programa suteikia galimybę įvertinti evoliucinius atstumus tarp skirtingų nukleotidų arba amino rūgščių sekų. Pritaikyti artimiausių kaimynų sujungimo (Neighbor – Joining) ir mažiausios evoliucijos (Minimum-Evolution) metodai remiantis Ge ir kolegų bei Gallardo ir kolegų straipsnių duomenimis (Ge *et al.*, 2018; Gallardo *et al.*, 2014).

Norint atlikti sekų palyginimą, visų pirma, sekos yra sukeliomos iš sekvenavimo dokumentų. Mega programoje atidaromos DNR sekos, kurias norima palyginti. Atliekamas daugybinis sekų sulyginimas naudojant ClustalW algoritmą. Sekos turi būti vienodo ilgio, todėl yra nukerpami sekų galai. Apdorojus sekas, ieškomas tinkamiausias modelis filogenetiniam medžiui sudaryti: spaudžiama „MODELS“, iššokusiam laukelyje pasirenkama „Find best DNA/Protein models“. Atsidariusiam laukelyje matoma daug siūlomų modelių, tačiau tinkamiausiu laikomas tas, kurio yra mažiausia BIC ir didžiausia lnL vertės. Pasirinkus tinkamiausią modelį, braižomas filogenetinis medis. Nustatomas reikiamas kiekis Bootstrap (savirankos metodas) pakartojimų. Ši funkcija yra statistinė, pakartotinai atliekama procedūra, kuri nurodo filogenetiniame medyje esančių šakų patikimumą. Jei Bootstrap yra 95 % ar daugiau, ji laikoma patikima (Kumar *et al.*, 2008; Nei ir Kumar, 2000).

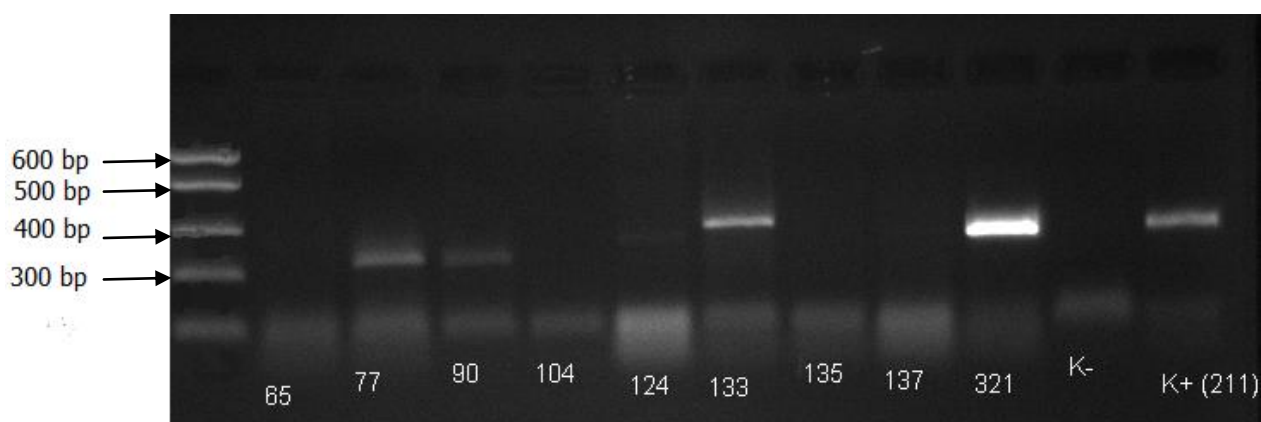
### 2.7.2. Haplotipų tinklo braižymas

Norint nubraižyti haplotipų tinklą, MEGA programoje sutvarkytos sekos yra eksportuojamos NEXUS formatu. Tinklas braižomas PopART programa. Atidaromos sekos, parenkamamas tinklas, šiame moksliniame tyrime pasirinktas TCS (Templeton, Crandall, Sing).

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Vabzdžių, kuriuose rastas Afrikinis kiaulių maro virusas, analizė

Darbo metu buvo išskirta deoksiribonukleino rūgštis iš 370 vabzdžių. Siekiant identifikuoti vabzdžius, kurių organizme yra Afrikinis kiaulių maro virusas, amplifikuota DNR taikant polimerazinės grandininės reakcijos metodą ir atlikta gelio elektroforezė fragmentams analizuoti. 6 pav. yra pateikiama elektroforegramos nuotrauka, kuri buvo gauta atliekant vieną iš darbų laboratorijoje.



**6 pav.** Polimerazinės grandininės reakcijos elektroforegrama. Kairiajame šone yra įpiltas molekulinis žymuo, kuris yra sužymėtas nuo 300 iki 600 bp. 65, 77, 90, 104, 124, 133, 135, 137, 321 numeriais pažymėti tirti mėginiai. K- - neigiama kontrolė, K+ (211) – teigiama kontrolė, kuriai buvo naudojamas 211 mėginys. 133 ir 321 mėginiuose matomi teigiami Afrikinio kiaulių maro viruso sekų fragmentai, kurie yra virš 300 bazių porų (326 bp). 77 ir 90 numeriais pažymėtuose mėginiuose taip pat įžiūrimi blankūs fragmentai, tačiau jie yra žemiau nei kontrolinis mėginys, tai reiškia, jog amplifikavosi kitas fragmentas.

Gelio elektroforezės rezultatai parodė, kad iš visų tirtų (370) mėginių, 18-oje aptiktas Afrikinis kiaulių maro virusas. Duomenys apie teigiamus AKMV bandinius pateikti 5 lentelėje.

**5 lentelė.** Informacija apie mėginius, kuriuose identifikuotas Afrikinis kiaulių maro virusas.

Mėginio identifikacinis kodas	Vabzdžio rūšis	Rinkimo būdas, patalpoje ar lauke
P72-5	<i>Lucilia sericata</i> (Calliphoridae)	Entomologiniu tinkleliu, lauke
P72-6	<i>Lucilia sericata</i> (Calliphoridae)	Entomologiniu tinkleliu, lauke
P72-28	<i>Staphylinidae</i>	Entomologiniu tinkleliu, lauke

P72-58	<i>Musca domestica (Muscidae)</i>	Entomologiniu tinkleliu, patalpoje
P72-62	<i>Cynomyia (Calliphoridae)</i>	Entomologiniu tinkleliu, patalpoje
P72-67	Lerva (gyva), <i>Steribia nigriceps (Piophilidae)</i>	Iš užkasto šerno lavono, lauke
P72-94	<i>Stomoxys calcitrans (Muscidae)</i>	Gaudykle, lauke
P72-95	<i>Stomoxys calcitrans (Muscidae)</i>	Gaudykle, lauke
P72-103	<i>Culicidae</i>	Gaudykle, lauke
P72-111	<i>Stomoxys calcitrans (Muscidae)</i>	Gaudykle, lauke
P72-120	<i>Calliphoridae</i>	- (nėra duomenų)
P72-122	<i>Musca domestica (Muscidae)</i>	Entomologiniu tinkleliu, lauke
P72-123	<i>Musca domestica (Muscidae)</i>	Entomologiniu tinkleliu, lauke
P72-130	<i>Stomoxys calcitrans (Muscidae)</i>	Gaudykle, lauke
P72-182	<i>Musca domestica (Muscidae)</i>	Entomologiniu tinkleliu, patalpoje
P72-184	<i>Stomoxys calcitrans (Muscidae)</i>	Entomologiniu tinkleliu, patalpoje
P72-194	Pseudoscorpiones	Gaudykle, lauke
P72-211	<i>Stomoxys calcitrans (Muscidae)</i>	Gaudykle, lauke

Pagal lentelėje pateikiamus duomenis matoma, kad virusas aptiktas šiose vabzdžių šeimose: 10 individų *Muscidae* (6 - *Stomoxys calcitrans*, 4 - *Musca domestica*), 4 *Calliphoridae* individai (2 - *Lucilia sericata*, 1 - *Cynomyia* (nenustatyta rūšis), 1 (nenustatyta gentis ir rūšis)), 1 *Staphylinidae* (nenustatyta gentis ir rūšis), 1 *Culicidae* (nenustatyta gentis ir rūšis), 1 *Piophilidae* (*Steribia nigriceps*). Taip pat, ištyrus Pseudoscorpiones būriui priklausančio nariuotakojų DNR, rezultatai patvirtino AKMV buvimą. Gaudyklės buvo statomos lauke, kiaulių maro užkrėstose teritorijose, tuo tarpu entomologiniu tinkleliu buvo gaudoma ūkiuose ir aplink juos, AKM protrūkio metu. Lerva buvo surinkta nuo užkasto šerno lavono.

18 vabzdžių, kuriuose buvo aptiktas Afrikinis kiaulių maro virusas, rinkti skirtingose Lietuvos vietose. Pagal gautus teigiamus mėginių rezultatus sukurtas vabzdžių rinkimo vietų Lietuvoje žemėlapis (7 pav.). Šaltupys, Sviliai ir Ažuolų Būda – vietovės, kuriose užfiksuoti AKM židiniai. Poškaičiuose, kuriuose buvo statomos gaudyklės, sugauta daugiausia AKMV nešiotųjų – 5, Ažuolų Būdoje – 3, Papilėje – 3, Šaltupyje – 2, Sviliuose – 2, Sirvyduose – 1, Trakų rajone - 2.

Iš NZI gaudyklėmis sugautų vabzdžių daugiausia buvo ištirta *S. calcitrans*. Aštuoniuose iš 94 buvo aptiktas virusas, kai tuo tarpu iš 41 *Calliphoridae* šeimos vabzdžių nustatytas tik vienas teigiamas mėginys. Tuo tarpu, AKM protrūkių metu, iš fermų išorėje sugautų 58 vabzdžių, 7-iose individuose buvo rastas AKMV (*Musca*, *Lucilia*, *Staphylinidae*), bet *S. calcitrans* neturėjo viruso DNR. Iš 42 vabzdžių, tirtų fermų viduje, vienas *Stomoxys* individas turėjo viruso DNR. Gauti rezultatai rodo, kad *S. calcitrans* galėtų būti AKMV vektorius, nes kaip įrodyta Olesen ir kolegų aprašytoje publikacijoje (Olesen *et al.*, 2018), *Stomoxys calcitrans*, besimaitindamas užsikrėtusio gyvūno krauju, gali pernešti virusą kitam gyvūnui.



**7 pav.** Vietovės, kuriose buvo pagauti vabzdžiai su Afrikinio kiaulių maro virusu. Raudonais ženklais pažymėtos aptikslės vietos ir jų pavadinimas.

## 3.2. Statistinė analizė

### 3.2.1. Genotipų nustatymas ir palyginimas

Atlikus daugybinių sulyginimą su genų banko sekomis MEGA (versija: MEGA-X) programoje, sulyginus sekas, jų analizei tiko tik 217 nukleotidų (nt), nes sekų iš genų banko regionai ne visiškai sutapo su mūsų tiriamomis sekomis. Siekiant klasifikuoti 18 viruso izoliatų, kurie buvo gauti iš vabzdžių, į 24 prieš tai aprašytus pagrindinius Afrikinio kiaulių maro viruso genotipus, buvo sudarytas filogenetinis kaimyninės jungties medis. Pasirinktas vidinių šakų filogenetinis testas ir 1000 pradinės įkelties pakartojimų. Kimura-2 parametrų modelis pasirinktas kaip deramiausias remiantis „ModelTest“. Tyrimų metu gautos sekos buvo lyginamos su kituose

moksliniuose straipsniuose pateiktomis sekomis, kurios skiriasi geografinėmis vietomis ir rinkimo data. Detalesnė informacija apie visas naudotas sekas yra pateikta 6 lentelėje.

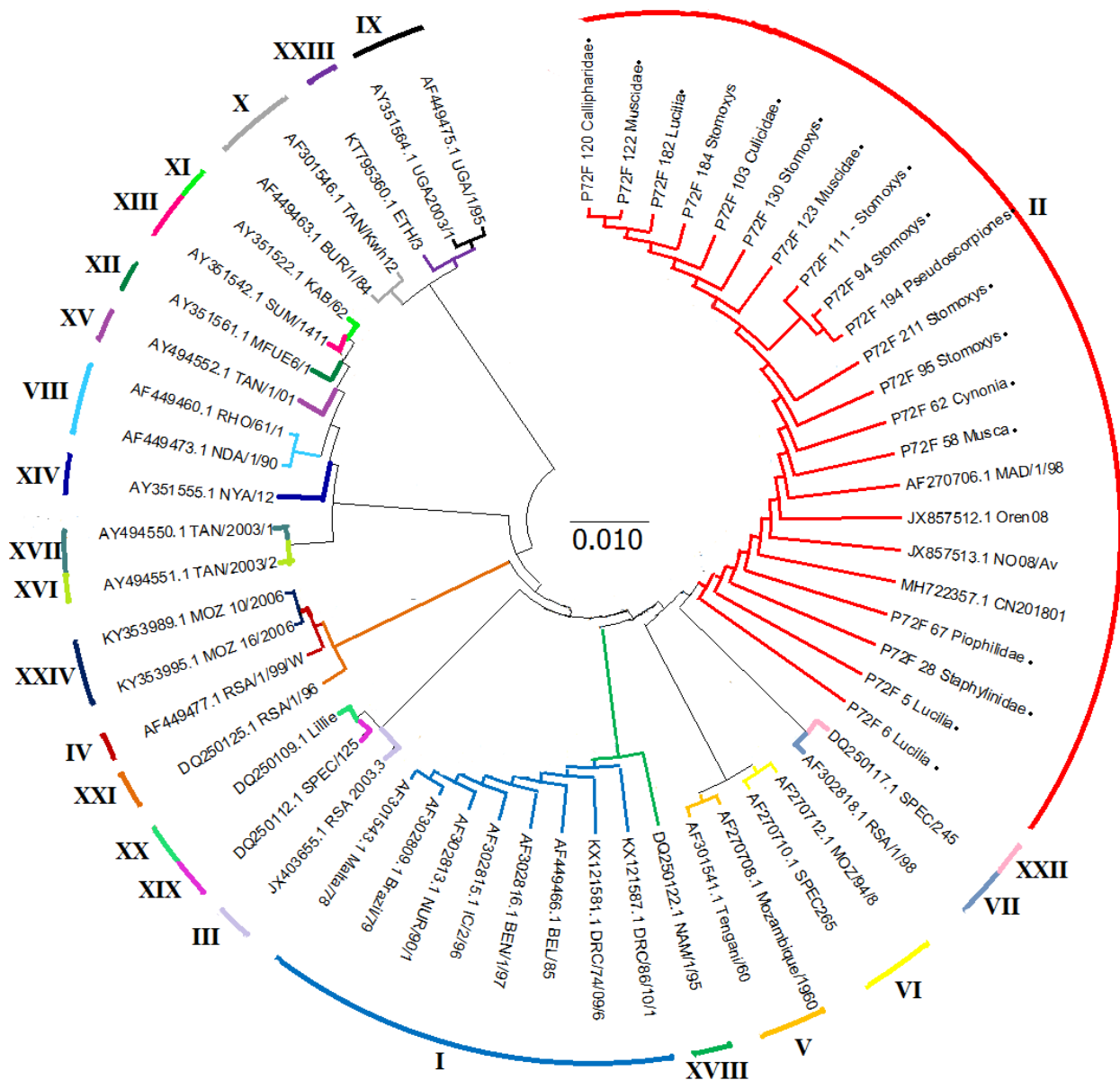
**6 lentelė.** Duomenys apie 58 AKMV izoliatus, kurie buvo panaudoti kuriant filogenetinį medį.

Viruso pavadinimas	Kilmės šalis	Mėginių rinkimo metai	Šaltinis (nuoroda)	Genbank prieigos numeris
P72F 5 <i>Lucilia</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 6 <i>Lucilia</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 28 <i>Staphylinidae</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 58 <i>Musca</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 62 <i>Cynonia</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 67 <i>Piophilidae</i>	Lietuva	-	Šis tyrimas	-
P72F 94 <i>Stomoxys</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 95 <i>Stomoxys</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 103 <i>Culicidae</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 111 <i>Stomoxys</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 120 <i>Calliphoridae</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 122 <i>Muscidae</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 123 <i>Muscidae</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 130 <i>Stomoxys</i>	Lietuva	2018	Šis tyrimas	-
P72F 182 <i>Lucilia</i>	Lietuva	2019	Šis tyrimas	-
P72F 184 <i>Stomoxys</i>	Lietuva	2019	Šis tyrimas	-
P72F 194 Pseudoscorpiones	Lietuva	2019	Šis tyrimas	-
P72F 211 <i>Stomoxys</i>	Lietuva	2019	Šis tyrimas	-
MAD/1/98	Madagaskaras	1998	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF270706.1
Oren08	Rusija	2008	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	JX857512.1
NO08/Av	Rusija	2008	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	JX857513.1
CN201801	Kinija	2018	Ge <i>et al.</i> , 2018	MH722357.1
SPEC/245	Pietų Afrika	1992	Quembo <i>et al.</i> , 2017	DQ250117.1
RSA/1/98	Pietų Afrika	1998	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF302818.1
MOZ/94/8	Mozambikas	1994	Boshoff <i>et al.</i> , 2007	AF270712.1
SPEC 265	Mozambikas	1994	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF270710.1
Mozambique/1960	Mozambikas	1960	Quembo <i>et al.</i> , 2017	AF270708.1
Tengani/60	Malavis	1960	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF301541.1
NAM/1/95	Namibija	1995	Boshoff <i>et al.</i> , 2007	DQ250122.1
DRC/86/10/1	Kongo Demokratinė Respublika	2010	Mulumba-Mfumu <i>et al.</i> , 2017	KX121587.1

DRC/74/09/6	Kongo Demokratinė Respublika	2009	Mulumba-Mfumu <i>et al.</i> , 2017	KX121581.1
BEL/85	Belgija	1985	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF449466.1
BEN/1/97	Beninas	1997	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF302816.1
IC/2/96	Dramblio Kaulo Krantas	1996	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF302815.1
NUR/90/1	Sardinija	1990	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF302813.1
Brazil/79	Brazilija	1979	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF302809.1
Malta/78	Malta	1978	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF301543.1
RSA 2003.3	Pietų Afrika	2003	Quembo <i>et al.</i> , 2017	JX403655.1
SPEC/125	Pietų Afrika	1987	Boshoff <i>et al.</i> , 2007	DQ250112.1
Lillie	Pietų Afrika	1973	Boshoff <i>et al.</i> , 2007	DQ250109.1
RSA/1/96	Pietų Afrika	1996	Quembo <i>et al.</i> , 2017	DQ250125.1
RSA/1/99/W	Pietų Afrika	1999	Boshoff <i>et al.</i> , 2007	AF449477.1
MOZ 16/2006	Mozambikas	2006	Quembo <i>et al.</i> , 2017	KY353995.1
MOZ 10/2006	Mozambikas	2006	Quembo <i>et al.</i> , 2017	KY353989.1
TAN/2003/2	Tanzanija	2003	Misinzo <i>et al.</i> , 2014	AY494550.1
TAN/2003/1	Tanzanija	2003	Misinzo <i>et al.</i> , 2014	AY494551.1
NYA/12	Zambija	1986	Boshoff <i>et al.</i> , 2007	AY351555.1
NDA/1/90	Malavis	1990	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF449473.1
RHO/61/1	Zimbabvė	1961	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF449460.1
TAN/1/01	Tanzanija	2001	Misinzo <i>et al.</i> , 2014	AY494552.1
MFUE 6/1	Zambija	1982	Lubisi <i>et al.</i> , 2005	AY351561.1
SUM/1411	Zambija	1983	Boshoff <i>et al.</i> , 2007	AY351542.1
KAB/62	Zambija	1983	Boshoff <i>et al.</i> , 2007	AY351522.1
BUR/1/84	Burundžio Respublika	1984	Bastos <i>et al.</i> , 2003	AF449463.1
TAN/Kwh12	Tanzanija	1968	Misinzo <i>et al.</i> , 2014	AF301546.1
ETH/3	Etiopija	2011	Quembo <i>et al.</i> , 2017	KT795360.1
UGA2003/1	Uganda	2003	Mwiine <i>et al.</i> , 2019	AY351564.1
UGA/1/95	Uganda	1995	Mwiine <i>et al.</i> , 2019	AF449475.1

Filogenetinis medis (8 pav.) parodo, kad šiame darbe gautos virusų sekos sudaro vieną grupę ir visiškai (100 %) sutampa su mėginiais (NO08, MAD/1/98, CN201801, Oren08), kurie priklauso II Afrikinio kiaulių maro viruso genotipui. Šis nukleotidų išsidėstymo sutapimas patvirtina, kad visi Lietuvoje surinkti vabzdžiai yra viruso, kuris priklauso II genotipui, nešiotojai. Palyginus Lietuvoje esančio viruso nukleotidų pasiskirstymą, pastebėta, kad 15 tiriamų sekų yra identiškos, tačiau 3 (P72F 111 *Stomoxys*; P72F 94 *Stomoxys*, P72F 194 *Pseudoscorpiones*) skiriasi vienu nukleotidu. 15 mėginių šimtas šešiasdešimt devintoje pozicijoje yra guaninas, tuo tarpu kitose trijuose – adeninas. Izoliatų, priklausančių tam pačiam genotipui ir besiskiriančių dideliu metų skirtumu identiškumas pagrindžia Mologolovkin ir kolegų (2012) išsakytą mintį, kad II genotipas mažai keičiasi laikui kintant. Manoma, kad Afrikinio kiaulių

maro virusas Lietuvoje ir rytų Azijoje esančioje valstybėje Kinijoje, kurioje pirmas Afrikinio kiaulių maro atvejis užfiksuotas 2018 m. (Kim *et al.*, 2019), yra kilę iš to paties šaltinio, kadangi nukleotidų išsidėstymas sekose – identiškas.

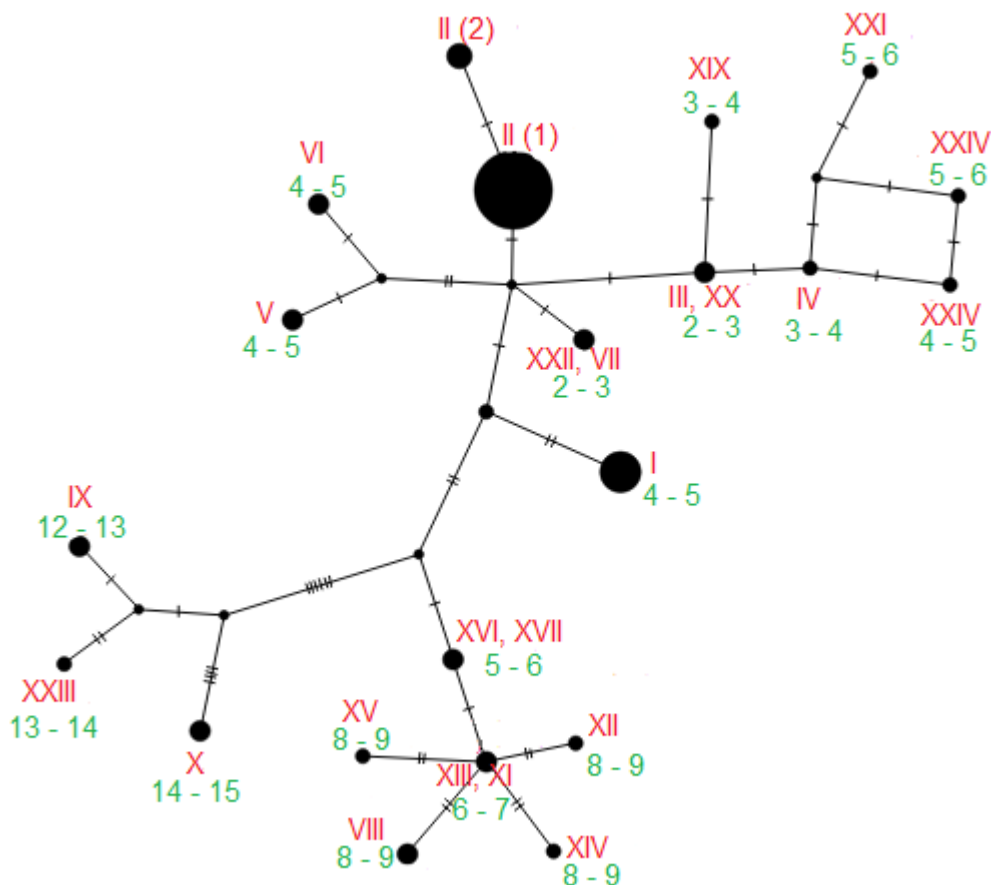


**8 pav.** Kaimyninės jungties medis, simbolizuojantis Afrikinio kiaulių maro viruso 24 genotipų pasiskirstymą. Kiekviena spalva nurodo skirtingą genotipą, kurie atitinkamai sužymėti romėniškais skaitmenimis. Šio tyrimo sekos tokia tvarka: P72F, mėginio identifikacinis kodas, vabzdžio rūšis, apskritimo simbolis (•). Kiekviena seka, kuri buvo panaudota iš kitų šaltinių įvardijama tokia tvarka: GenBank prieigos numeris, viruso pavadinimas. Mastelis (0.010) atitinka pakeistų aminorūgščių skaičių, tenkantį vienai vietai.

Norint palyginti Afrikinio kiaulių maro viruso ryšius tarp atskirų genotipų populiacijos lygmenyje, buvo sudarytas haplotipų tinklas (9 pav.). Haplotipų tinkle esančių sekų



ilgis – 217 bp. Tinklą sudaro 22 genetinės grupės. Tame pačiame apskritime esantys organizmai turi vienodą nukleotidų seką. Kiekvieną apskritimą sudaro nuo 1 iki 28 viruso sekų. Skirtingiems genotipams priklausančios sekos nuo mūsų tiriamų,



**9 pav.** Haplotipų tinklas, vaizduojantis Afrikinio kiaulių maro viruso genetinį paplitimą. Apskritimai nurodo genetinių grupių pasiskirstymą. Apskritimo dydis priklauso nuo virusų kiekio, priskiriamo figūrai. Brūkšnių kiekis nurodo mutacijų skaičių haplotipuose. Raudona spalva nurodytos genotipų grupės, kurioms yra priskiriami virusai, išsidėstę kiekviename apskritime. Žalia spalva nurodytas mutacijų skaičius lyginant su II (1) ir II (2) sekomis.

kurios priklauso II (1) ir II (2) apskritimams, skiriasi nuo 0 iki 15 mutacijų. Detalesnė informacija apie virusų pasiskirstymą kiekviename haplotipe ir mutacijų skaičių yra pateikta 1 priede.

Išanalizavus gautus duomenis, nustatyta, kad mūsų tiriamos sekos tarpusavyje skiriasi viena mutacija (II (1) ir II(2)), todėl jos atsiskyrė į du atskirus apskritimus. Visos sekos yra lyginamos su II (1) – II (2) apskritimais, kuriuose pasiskirstė mūsų tiriamos sekos. Sekos, priklausančios II Afrikinio kiaulių maro viruso genotipui, yra artimiausios III, VII, XX, XVIII ir XXII genotipams, kadangi skirtumas tarp organizmų – 2 nukleotidai lyginant su II (1), 3 nukleotidai lyginant su II (2). 3 - 4 nukleotidų skirtumas pastebėtas lyginant su IV ir XIX genotipais, 4 – 5 mutacijos aptiktos vienodinant su I, V, VI, XXIV grupėmis. 5 – 6 nukleotidų

skirtumas užfiksuotas tarp mūsų analizuojamų sekų ir XVI, XVII, XXI, XXIV genotipams priskiriamų sekų. 6 – 7 mutacijas turi sekos iš XI ir XIII grupių, 8 - 9 iš VIII, XII, XIV ir XV genotipų, 12 - 13 iš IX genotipo, 13 - 14 iš XXIII. Didžiausias skirtumas – 14 – 15 nukleotidų, nustatytas tarp II ir X genotipų. Įdomu tai, kad tam tikruose apskritimuose pasiskirstė virusai iš skirtingų genotipų, tai reiškia identišką nukleotidų seką.

Išanalizavus genotipų pasiskirstymą Afrikos žemyne (4 pav.), ir palyginus su haplotipų tinkle pasiskirsčiusiomis sekomis, pastebėta, kad I genotipas, kuris yra labiausiai nutolęs nuo II (I genotipas – vakarinėje bei centrinėje, II genotipas – rytinėje žemyno dalyse), skiriasi tik 4 – 5 nukleotidais. XIV ir II genotipai geografinė prasme išsidėstę vienas šalia kito (XIV – Mozambike, II – Tanzanijoje), skiriasi 8 – 9 nukleotidais sekose. Genotipai X ir II aptinkami toje pačioje valstybėje – Tanzanijoje, skiriasi net 14 – 15 mutacijomis. Minėti nukleotidų skirtumai sekose gali būti sukeliama skirtingų viruso plitimo būdų. Arias ir kolegų aprašytame straipsnyje (Arias *et al.*, 2017) teigiama, kad vakarinėje bei centrinėje Afrikos dalyse I genotipo izoliatai nėra perduodami per mechaninius vektorius (erkes) šernams, todėl yra mažai genetiškai variabilūs. Šiose dalyse virusas platinamas dviem būdais: nuo mechaninių vektorių kiaulėms bei tarp naminių gyvulių. Rytinėje Afrikoje, kurioje yra fiksuojamas erkių – šernų tiesioginis kontaktas, yra matomas didelis Afrikinio kiaulių maro viruso skirtumas genotipuose bei genotipų variabilumas. Pastebėjimai dėl didelio nukleotidų pokyčio sekose, kur vyrauja nevaržomas šernų judėjimas, manoma, gali būti sukeliama kontakto tarp mechaninių vektorių ir laukinių gyvūnų.

Sukūrus filogenetinį kaimyninės jungties medį, buvo nustatyta, kad mūsų mokslinio darbo metu nusekvenuotos sekos priklauso II genotipui. Palyginus skirtingų metų II genotipo sekas, patvirtinta, kad pastarasis genotipas yra konservatyvus. Haplotipų tinklas parodė, kad II genotipas labiausiai panašus į III, VII, XX, XVIII genotipus ir yra labiausiai nutolęs nuo X genotipo, kadangi nustatytas didžiausias skirtumas (14 – 15 nukleotidų) lyginant su visomis grupėmis.

### 3.2.2. Tiriamų sekų palyginimas su Rytų, Centrine Europa ir Kaukazo regionu

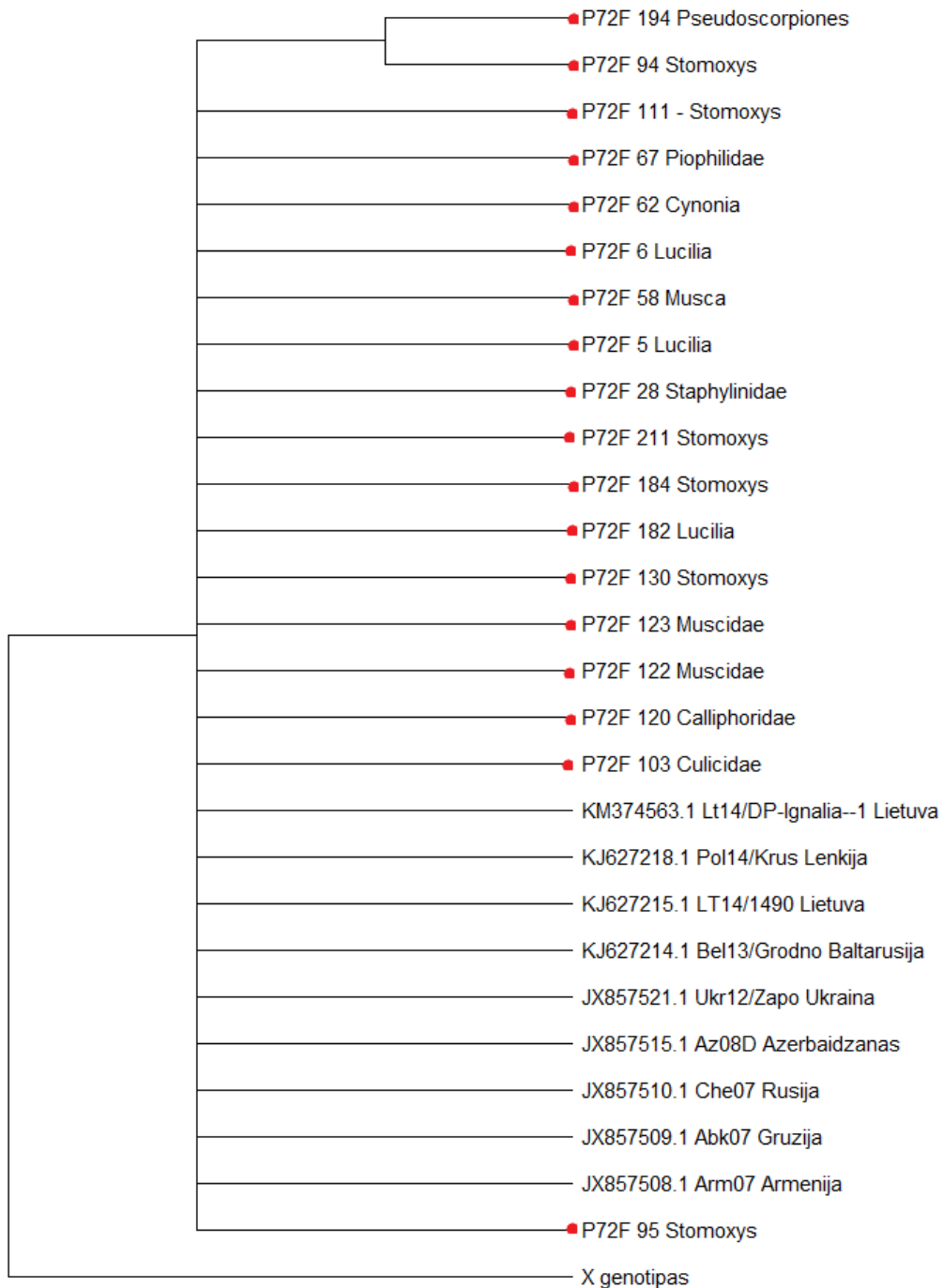
Siekiant palyginti Rytų, Centrinės Europos ir Kaukazo regiono sekas su mūsų gautomis mokslinio darbo metu, sudarytas filogenetinis minimalios evoliucijos medis naudojant MEGA programą (versija: MEGA-X). Sulygintų sekų ilgis – 220 nukleotidų (nt). Pasirinkta 1000 savirankos metodo pakartojimų. MEGA programa atlikus tinkamiausio modelio analizę,

pasirinktas Jukes-Cantor. Mūsų tiriamos sekos buvo lyginamos su moksliniuose straipsniuose pateiktomis sekomis iš įvairių Rytų, Europos ir Kaukazo valstybių. Detalesnė informacija sekas iš genų banko duomenų bazės yra pateikta 7 lentelėje.

**7 lentelė.** Duomenys apie sekas, kurios buvo pasirinktos palyginti Rytų, Centrinėje Europoje ir Kaukazo regione esantį II genotipą.

Viruso pavadinimas	Kilmės šalis	Mėginių rinkimo metai	Šaltinis (nuoroda)	Genbank prieigos nr.
Lt14/DP-Ignalia	Lietuva	2014	Gallardo <i>et al.</i> (nepublikuota)	KM374563.1
Pol14/Krus	Lenkija	2014	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	KJ627218.1
LT14/1490	Lietuva	2014	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	KJ627215.1
Bel13/Grodno	Baltarusija	2013	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	KJ627214.1
Ukr12/Zapo	Ukraina	2012	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	JX857521.1
Az08D	Azerbaidžanas	2008	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	JX857515.1
Che07	Rusija	2007	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	JX857510.1
Abk07	Gruzija	2007	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	JX857509.1
Arm07	Armėnija	2007	Gallardo <i>et al.</i> , 2014	JX857508.1

Šiam tyrimui naudotos sekos buvo palygintos su valstybėmis, kurios priskiriamos Rytų Europai: Baltarusija, Ukraina, Rusija, Centrinei Europai: Lietuva, Lenkija ir Kaukazui: Azerbaidžanas, Gruzija, Armėnija. Filogenetiniame medyje (10 pav.) virusų izoliatai pasiskirstė į dvi grupes. Visos II genotipui priklausančios sekos pasiskirstė vienoje grupėje, kaip ir buvo tikėtasi. 2 izoliatai (P72F 194 *Pseudoscorpiones*; P72F 94 *Stomoxys*) grupės viduje sudarė atskirą šaką. Toks atsiskyrimas įvyko dėl vieno nukleotido skirtumo lyginant su kitomis sekomis. Mokslinio darbo metu iš vabzdžių išskirto viruso sekos visiškai sutapo su kaimynėmis šalimis (Lenkija ir Baltarusija). Rytų Europos ir Kaukazo valstybėmis. Sekų sutapimą tarp Lietuvos, Lenkijos ir Baltarusijos valstybių 2014 metais patvirtino Gallardo su kolegomis (Gallardo *et al.*, 2014). Palyginus minėto straipsnio duomenis su mūsų gautais, pastebėtas nesutapimas, kadangi publikacijoje teigiama, jog Lietuvoje išskirtų virusų sekos skiriasi nuo Rusijos ir Gruzijos valstybių, tuo tarpu mūsų gauti duomenys rodo 100 % sutapimą. Rezultatų skirtumas įvyko todėl, kad Gallardo su kolegomis panaudojo kitus pradmenis (ECO1A ir ECO1B), kurių taikiniai sekose skyrėsi nuo mūsų darbo metu naudojamų pradmenų taikinių. Šiuo atveju mūsų gauti duomenys nėra visiškai tikslūs, kadangi jie nurodo, kad II genotipui priklausančios sekos iš



**10 pav.** Minimalios evoliucijos medis, vaizduojantis 27 Rytų, Centrinės Europos ir Kaukazo regiono Afrikinio kiaulių maro viruso sekų pasiskirstymą. Visos šiam moksliniam tyrimui nusekvenuotos sekos įvardijamos tokia tvarka: Raudonas apskritimo simbolis, P72F, mėginio identifikacinis kodas, vabzdžio rūšis. Kiekvienas izoliatas, kuri buvo panaudotas iš kitų šaltinių įvardijamas tokia tvarka: GenBank prieigos numeris, viruso pavadinimas, kilmės šalis. X genotipu įvardijama seka (Genbank prieigos nr: AF449463.1) kuri buvo panaudota atskirti skirtingus genotipus. Detalesnė informacija apie X genotipu pažymėtą seką yra pateikiama 6 lentelėje.

Lietuvos, Rusijos bei Gruzijos dėl 100 % sutapimo turėtų būti kilusios iš bendro šaltinio, tačiau remiantis Gallardo ir kolegų publikacijos duomenimis (Gallardo *et al.*, 2014),

Afrikinis kiaulių maro virusas Lietuvos valstybėje yra kilęs iš Baltarusijos. Sudarytas minimalios evoliucijos medis parodė visišką panašumą tarp 25 II genotipo sekų. Sekų identiškumas tarp Lietuvos ir Gruzijos valstybių sukelia netikslumų dėl skirtingų rezultatų lyginant su Gallardo ir kolegų straipsnyje pateiktais duomenimis (Gallardo *et al.*, 2014). Norint geriau suprasti II genotipo kilmę Lietuvoje, reikia atlikti sekų analizę su kitais pradmenimis arba ilgesniais sekų fragmentais.

### 3.2.3. Numatyti eksperimentai

Tolimesniuose tyrimuose buvo numatyta iširti E183L geną, kuris koduoja p54 baltymą remiantis Gallardo ir kolegų pateiktais duomenimis (Gallardo *et al.*, 2009). Buvo tikimasi nustatyti E183L geno vaidmenį Afrikinio kiaulių maro viruso plitime. Panaudojus PPA89 ir PPA722 pradmenis atlikti polimerazinę grandininę reakciją. Gautų sekų ilgis – apie 683 bp. Atlikus genų sekoskaitą, turėjo būti įvertintos gautos sekos ir palygintos su viso pasaulio šalių duomenimis. Taip pat, buvo norima palyginti p54 ir p72 baltymus, gautus iš tų pačių izoliatų, tarpusavyje. Duomenys turėjo būti pateikti atliekant filogenetinę analizę, braižant kaimyninės jungties ir minimalios evoliucijos medžiuose. Buvo tikimasi paneigti arba pagrįsti mintį, kad gautų izoliatų p54 ir p72 genų sekos yra identiškos ir jos sutampa su sekomis virusų, kurie sukėlė Afrikinį kiaulių marą 2003 metais Ugandoje.

## IŠVADOS

1. Sugavus 370 vabzdžių AKM protrūkių metu ir Afrikiniu kiaulių maro virusu užkrėstose teritorijose, buvo efektyviai pritaikytas metodas, kuris pirmą kartą panaudotas išskirti ir identifikuoti virusinę DNR vabzdžiuose.
2. Identifikavus AKM virusą PGR metodu ir įvertinus viruso paplitimą skirtingose vabzdžių rūšyse buvo nustatyta, kad *S. calcitrans* gali veikti kaip mechaninis vektorius Afrikio kiaulių maro viruso perdavime.
3. Nusekvenavus Afrikinio kiaulių maro viruso vp72 geno dalines DNR sekas ir palyginus su kitose šalyse paplitusiais AKMV genotipais nustatyta, kad:
  - Tiriamos sekos priklauso II genotipui, kuris yra paplitęs Europoje, be to genotipas nukleotidų sekų išsidėstymu sekoje artimiausias III, VII, XX, XVIII, XXII grupei ir labiausiai skiriasi nuo X genotipo.

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju magistrinio darbo vadovei Doc., Dr. Jurgai Turčinavičienei už pagalbą rašant baigiamąjį darbą ir galimybę įgyti naujų žinių genetikos ir mikrobiologijos srityse.

## LITERATŪROS SARAŠAS

1. Achenbach JE, Gallardo C, Nieto-Pelegrín E, Rivera-Arroyo B, Degefa-Negi T, Arias M, Jenberie S, Mulisa DD, Gizaw D, Gelaye E, Chibssa TR, Belaye A, Loitsch A, Forsa M, Yami M, Diallo A, Soler A, Lamien CE, Sánchez-Vizcaíno JM, 2017. Identification of a New Genotype of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 64(5):1393-1404. doi: 10.1111/tbed.12511.
2. Alonso C, Borca M, Dixon L, Revilla Y, Rodriguez F, Escribano JM, ICTV Report Consortium, 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Asfarviridae*. *J. Gen. Virol.* 99:613-614. doi:10.1099/jgv.0.001049.
3. Arias ML, de la Torre A, Gallardo C, Dixon L, Jori F, Laddomada A, Martins C, Parkhouse M, Revilla Y, Rogríguez F, Sánchez-Vizcaíno JM, 2017. Blueprint and Roadmap on the possible development of a vaccine for African Swine Fever prepared by the African Swine Fever EU reference laboratory on Commission request. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety. [žiūrėta 2020-04-25]. Adresas: [https://ec.europa.eu/info/index\\_en](https://ec.europa.eu/info/index_en).
4. Arias M, de la Torre A, Dixon L, Gallardo C, Jori F, Laddomada A, Martins C, Parkhouse RM, Revilla Y, Rogríguez F, Sánchez-Vizcaíno JM, 2017. Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines. *Vaccines (Basel)* 5(4): 35. doi: 10.3390/vaccines5040035.
5. Arias M, Jurado C, Gallardo C, Fernández-Pinero C, Sánchez-Vizcaíno JM, 2018. Gaps in African swine fever: Analysis and priorities. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 235-247. doi: 10.1111/tbed.12695.
6. Baldacchino F, Muenworn V, Desquesnes M, Desoli M, Charoenviriyaphap T, Duvallet G, 2013. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, *Muscidae*): a review. *Parasite* 20: 26. doi: 10.1051/parasite/2013026.



7. Bastos ADS, Penrith M-L, Cruicière C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann E, Thomson GR, 2003. Genotyping Field Strains of African Swine Fever Virus by Partial p72 Gene Characterisation. Arch. Virol. 148(4):693-706. doi: 10.1007/s00705-002-0946-8.
8. Beltrán-Alcrudo D, Arias M, Gallardo C, Kramer SA, Penrith ML, 2018. Afrikinis kiaulių maras: aptikimas ir diagnostika. Vadovas veterinarijos gydytojams. Gyvulininkystės ir gyvūnų sveikatos apsaugos vadovas, Nr. 19, Roma. Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacija (FAO). 88 p.
9. Boinas FS, Wilson AJ, Hutchings GH, Martins C, Dixon LJ, 2011. The Persistence of African Swine Fever Virus in Field-Infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF Endemic Period in Portugal. PLoS One 6(5): e20383. doi: 10.1371/journal.pone.0020383.
10. Boshoff CI, Bastos ADS, Gerber LJ, Vosloo W, 2007. Genetic Characterization of African Swine Fever Viruses From Outbreaks in Southern Africa (1973-1999). Vet. Microbiol. 121(1-2):45-55. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.11.007.
11. Brown VR, Bevins SN, 2018. A Review of African Swine Fever and the Potential for Introduction into the United States and the Possibility of Subsequent Establishment in Feral Swine and Native Ticks. Front. Vet. Sci. 5:11. doi: 10.3389/fvets.2018.00011.
12. Chenais E, Depner K, Guberti V, Dietze K, Viltrop A, Ståhl K, 2019. Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014-2018. Porc. Health Manag. 5:6. doi: 10.1186/s40813-018-0109-2.
13. Costard S, Wieland B, Glanville W, Jori F, Rowlands R, Vosloo W, Roger F, Pfeiffer DU, Dixon LK, 2009. African swine fever: how can global spread be prevented? Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 364(1530), 2683-2696. doi: 10.1098/rstb.2009.0098.
14. Cwynar P, Stojkov J, Wlazlak K, 2019. African Swine Fever Status in Europe. Viruses 11(4):310. doi: 10.3390/v11040310.
15. de Carvalho Ferreira HC, Weesendorp E, Elbers AR, Bouma A, Quak S, Stegeman JA, Loeffen WL, 2012. African swine fever virus excretion patterns in persistently infected

- animals: a quantitative approach. *Vet. Microbiol.* 160(3-4):327-40. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.06.025.
16. de Carvalho Ferreira HC, Backer JA, Weesendorp E, Klinkenberg D, Stegeman JA, Loeffen WL, 2013. Transmission rate of African swine fever virus under experimental conditions. *Vet. Microbiol.* 165(3-4):296-304. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.026.
17. Desquesnes M, Dargantes A, Lai D, Lun ZR, Holzmuller P, Jittapalapong S, 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. *BioMed. Res. Int.* 6, 321237. doi: 10.1155/2013/321237.
18. Dixon LK, Sun H, Roberts H, 2019. African swine fever. *Antiviral Res.* 165: 34-41. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.02.018.
19. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. *Ornithodoros* spp. – current known distribution, May, 2018. Stockholm: ECDC; 2018. [žiūrėta 2020-05-17]. Adresas: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps>.
20. Fila M, Woźniakowski G, 2020. African swine fever virus – the possible role of flies and other insects in virus transmission. *J. Vet. Res.* 64(1):1-7. doi: 10.2478/jvetres-2020-0001.
21. Forth JH, Amendt J, Blome S, Depner K, Kampen H, 2017. Evaluation of blowfly larvae (Diptera: *Calliphoridae*) as possible reservoirs and mechanical vectors of African swine fever virus. *Transbound. Emerg. Dis.* 65(1):e210-e213. doi: 10.1111/tbed.12688.
22. Frant M, Woźniakowski G, Pejsak Z, 2017. African Swine Fever (ASF) and Ticks. No Risk of Tick-mediated ASFV Spread in Poland and Baltic States. *J. Vet. Res.* 61(4):375-380. doi: 10.1515/jvetres-2017-0055.
23. Galindo I, Alonso C, 2017. African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses* 9(5):103. doi: 10.3390/v9050103.

24. Gallardo C, Mwaengo DM, Macharia JM, Arias M, Taracha EA, Soler A, Okoth E, Martín E, Kasiti J, Bishop RP, 2009. Enhanced Discrimination of African Swine Fever Isolates Through Nucleotide Sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) Genes. *Virus Genes* 38(1):85-95. doi: 10.1007/s11262-008-0293-2.
25. Gallardo C, Fernández-Pinero J, Pelayo V, Gazaev I, Markowska-Daniel I, Pridotkas G, Nieto R, Fernández-Pacheco P, Bokhan S, Nevolko O, Drozhzhe Z, Pérez Covadonga, Soler A, Kolvasov D, Arias M, 2014. Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 20(9): 1544–1547. doi: 10.3201/eid2009.140554.
26. Gallardo C, Nieto R, Soler A, Pelayo V, Fernández-Pinero J, Markowska-Daniel I, Pridotkas G, Nurmoja J, Granta R, Simón A, Pérez C, Martín E, Fernández-Pacheco P, Arias M, 2015. 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(8):2555-65. doi: 10.1128/JCM.00857-15.
27. Gallardo MC, Reoyo AT, Fernández-Pinero J, Iglesias I, Muñoz MJ, Arias ML, 2015. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porc. Health Manag.* 1, 21. doi: 10.1186/s40813-015-0013-y.
28. Gallardo C, Nurmoja I, Soler A, Delicado V, Simón A, Martín E, Pérez C, Nieto R, Arias M, 2018. Evolution in Europe of African Swine fever genotype II viruses from highly to moderately virulent. *Vet. Microbiol.* 219:70-79. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.04.001.
29. Gallardo C, Fernández-Pinero J, Arias M, 2019. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Res.* 271:197676. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197676.
30. Ge L, Li J, Fan X, Liu F, Li L, Wang Q, Ren W, Bao J, Liu C, Wang H, Liu Y, Zhang Y, Xu T, Wu X, Wang Z, 2018. Molecular Characterization of African Swine Fever Virus, China, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 24(11):2131-2133. doi: 10.3201/eid2411.181274.

31. Guinat C, Gogin A, Blome S, Keil G, Pollin R, Pfeiffer DU, Dixon L, 2016. Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. *Vet. Rec.* 178(11): 262–267. doi: 10.1136/vr.103593.
32. Herm R, Tummeleht L, Jürison M, Vilem A, Viltrop A, 2020. Trace amounts of African swine fever virus DNA detected in insects collected from an infected pig farm in Estonia. *Vet. Med. Sci.* 6(1):100-104. doi: 10.1002/vms3.200.
33. Jia N, Ou Y, Pejsak Z, Zhang Y, Zhang J, 2017. Roles of African Swine Fever Virus Structural Proteins in Viral Infection. *J. Vet. Res.* 61(2), 135 – 143. doi: 10.1515/jvetres-2017-0017.
34. Keßler C, Forth JH, Keil GM, Mettenleiter TC, Blome S, Karger A, 2018. The intracellular proteome of African swine fever virus. *Sci. Rep.* 8, 14714. doi: 10.1038/s41598-018-32985-z.
35. Kim H-J, Lee M-J, Lee S-K, Kim D-y, Seo S-J, Kang H-E, Nam H-M, 2019. African Swine Fever Virus in Pork Brought into South Korea by Travelers from China, August 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 25(6): 1231–1233. doi: 10.3201/eid2506.181684.
36. Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K, 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinform.* 9(4):299-306. doi: 10.1093/bib/bbn017.
37. Lifescience.roche.com [internetinė svetainė]. Roche Molecular Systems, Inc.; sukurta 1999 [atnaujinta 2019-08-22; žiūrėta 2020-05-26]. Adresas: [https://lifescience.roche.com/global\\_en/brands/universal-probe-library.html](https://lifescience.roche.com/global_en/brands/universal-probe-library.html)
38. Lubisi BA, Bastos ADS, Dwarka RM, Vosloo W, 2005. Molecular Epidemiology of African Swine Fever in East Africa. *Arch. Virol.* 150(12):2439-52. doi: 10.1007/s00705-005-0602-1.
39. Luo Y, Atim SA, Shao L, Ayebazibwe C, Sun Y, Liu Y, Ji S, Meng XY, Li S, Li Y, Masembe C, Ståhl K, Widén F, Liu L, Qiu HJ, 2017. Development of an updated PCR

- assay for detection of African swine fever virus. *Arch. Virol.* 162(1):191-199. doi: 10.1007/s00705-016-3069-3.
40. Mazur – Panasiuk N, Żmudzki J, Woźniakowski G, 2019. African Swine Fever Virus – Persistence in Different Environmental Conditions and the Possibility of its Indirect Transmission. *J. Vet. Res.* 63(3): 303–310. doi: 10.2478/jvetres-2019-0058.
41. Mihok S, 2002. The development of a multipurpose trap (the *Nzi*) for tsetse and other biting flies. *Bull. Entomol. Res.* 92, 385 – 403. doi: 10.1079/BER2002186.
42. Misinzo G, Kasanga CJ, Mpelumbe-Ngeleja C, Masambu J, Kitambi A, Doorselaere JV, 2012. African Swine Fever Virus, Tanzania, 2010-2012. *Emerg. Infect. Dis.* 18(12): 2081–2083. doi: 10.3201/eid1812.121083.
43. Misinzo G, Kwavi DE, Sikombe CD, Makange M, Peter E, Muhairwa AP, Madege MJ, 2014. Molecular Characterization of African Swine Fever Virus From Domestic Pigs in Northern Tanzania During an Outbreak in 2013. *Trop. Anim. Health Prod.* 46(7):1199-207. doi: 10.1007/s11250-014-0628-z.
44. Mologolovkin A, Yelsukova A, Gallardo C, Tsybanov S, Kolbasov D, 2012. Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet. Microbiol.* 2012. 158(3-4):415-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.002.
45. Mologolovkin A, Burmakina G, Titov I, Sereda A, Gogin A, Baryshnikova E Kolbasov D, 2015. Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups. *Emerg. Infect. Dis.* 21(2):312-5. doi: 10.3201/eid2102.140649.
46. Mulumba-Mfumu LK, Achenbach JE, Mauldin MR, Dixon LK, Tshilenge CG, Thiry E, Moreno N, Blanco E, Saegerman C, Lamien CE, Diallo A, 2017. Genetic Assessment of African Swine Fever Isolates Involved in Outbreaks in the Democratic Republic of Congo between 2005 and 2012 Reveals Co-Circulation of p72 Genotypes I, IX, and XIV, Including 19 Variants. *Viruses* 9(2): 31. doi: 10.3390/v9020031.

47. Mur L, Boadella M, Martínez-López B, Gallardo C, Gortazar C, Sánchez-Vizcaíno JM, 2012. Monitoring of African swine fever in the wild boar population of the most recent endemic area of Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 59(6):526-31. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01308.x.
48. Mur L, Atzeni M, Martínez-López B, Feliziani F, Rolesu S, Sanchez-Vizcaino M, 2016. Thirty-Five-Year Presence of African Swine Fever in Sardinia: History, Evolution, and Risk Factors for Disease Maintenance. *Transbound. Emerg. Dis.* 63(2):e165-77. doi: 10.1111/tbed.12264.
49. Mwiine FN, Nkamwesiga J, Ndekezi C, Ochwo S, 2019. Molecular Characterization of African Swine Fever Viruses from Outbreaks in Peri-Urban Kampala, Uganda. *Adv. Virol.* 2019: 1463245. doi: 10.1155/2019/1463245.
50. Nei M, Kumar S, 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 89 p.
51. Olesen AS, Lohse L, Belsham GJ, Rasmussen TB, Bøtner A, Hansen MF, Boklund A, Halasa T, Bødker R, 2018. Infection of pigs with African swine fever virus via ingestion of stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Transbound. Emerg. Dis.* 65(5):1152-1157. doi: 10.1111/tbed.12918.
52. Olesen AS, Hansen MF, Rasmussen TB, Belsham GJ, Bøtner A, 2018. Survival and localization of African swine fever virus in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) after feeding on viremic blood using a membrane feeder. *Vet. Microbiol.* 222:25-29. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.06.010.
53. Pautienius A, Grigas J, Pilevičienė S, Zagrabskaitė R, Buitkuvienė J, Pridotkas G, Stankevičius R, Streimikytė Ž, Salomskas A, Zienius D, Stankevičius A, 2018. Prevalence and Spatiotemporal Distribution of African Swine Fever in Lithuania 2014-2017. *Viol. J.* 15(1):177. doi: 10.1186/s12985-018-1090-8.
54. Petrov A, Forth JH, Zani L, Beer M, Blome S, 2018. No evidence for long – term carrier status of pigs after African swine fever virus infection. *Transbound. Emerg. Dis.* 65(5):1318-1328. doi: 10.1111/tbed.1288.

55. Quembo CJ, Jori F, Vosloo W, Heath L, 2018. Genetic Characterization of African Swine Fever Virus Isolates From Soft Ticks at the Wildlife/Domestic Interface in Mozambique and Identification of a Novel Genotype. *Transbound. Emerg. Dis.* 65(2):420-431. doi: 10.1111/tbed.12700.
56. Rivers D, Geiman T, 2017. Insect Artifacts Are More than Just Altered Bloodstains. *Insects* 8(2): 37. doi: 10.3390/insects8020037.
57. Rovid Spickler A. African Swine Fever. 2019 [žiūrēta 2020-04-21]. Adresas: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>.
58. Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, Hutchings G, Oura C, Vosloo W, Dwarka R, Onashvili T, Albina E, Dixon LK, 2008. African Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14(12): 1870–1874. doi: 10.3201/eid1412.080591.
59. Salem A, Franc M, Jacquet P, Bouhsira E, Liénard E, 2012. Feeding and breeding aspects of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: *Muscidae*) under laboratory conditions. *Parasite* 19(4): 309–317. doi: 10.1051/parasite/2012194309.
60. Sánchez-Cordón PJ, Montoya M, Reis AL, Dixon LK, 2018. African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry. *Vet. J.* 233:41-48. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.12.025.
61. Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Bastos ADS, Penrith ML, 2015. New insights into the role of ticks in African swine fever epidemiology. *Rev. Sci. Tech.* 34(2):503-11. doi: 10.20506/rst.34.2.2375.
62. Sargsyan MA, Voskanyan HE, Karalova ME, Hakobyan LH, Karalyan ZA, 2018. Third wave of African swine fever infection in Armenia: Virus demonstrates the reduction of pathogenicity. *Vet. World* 11(1): 5–9. doi: 10.14202/vetworld.2018.5-9.
63. Schulz K, Staubach C, Blome S, 2017. African and classical swine fever: similarities, differences and epidemiological consequences. *Vet. Res.* 48(1):84. doi: 10.1186/s13567-017-0490-x.

64. Schulz K, Conraths FJ, Blome S, Staubach C, Sauter-Louis C, 2019. African Swine Fever: Fast and Furious or Slow and Steady? *Viruses* 11(9): 866. doi: 10.3390/v11090866.
65. Showler AT, Osbrink WLA, 2015. Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* (L.), Dispersal and Governing Factors. *Int. J. Insect Sci.* 7: 19–25. doi: 10.4137/IJIS.S21647.
66. Vmvt.lt [internetinė svetainė]. Vilnius: Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba; sukurta 2016 [atnaujinta 2002-05-15; žiūrėta 2005-05-14]. Adresas: <https://vmvt.lt/>.
67. World Organisation for Animal Health, 2019. African Swine Fever (Infection with African Swine Fever Virus). OIE Terrestrial manual 2019. Chapter 3.8.1.
68. Yoo D, Kim H, Young Lee J, Yoo HS, 2020. African swine fever: Etiology, epidemiological status in Korea, and perspective on control. *J. Vet. Sci.* 21(2): e38. doi: 10.4142/jvs.2020.21.e38.
69. Zhao D, Liu R, Zhang X, Li F, Wang J, Zhang J, Liu X, Wang L, Zhang J, Wu X, Guan Y, Chen W, Wang X, He X, Bu Z, 2019. Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China. *Emerg. Microbes Infect.* 8(1): 438–447. doi: 10.1080/22221751.2019.1590128.
70. Zhu Z, Meng G, 2020. ASFVdb: an integrative resource for genomic and proteomic analyses of African swine fever virus. *Database (Oxford)* 2020: baaa023. doi: 10.1093/database/baaa023.
71. Zsak L, Borca MV, Risatti GR, Zsak A, French RA, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Callahan JD, Nelson WM, Rock DL, 2005. Preclinical Diagnosis of African Swine Fever in Contact-Exposed Swine by a Real-Time PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 43(1): 112–119. doi: 10.1128/JCM.43.1.112-119.2005.
72. Zur.lt [internetinė svetainė]. Kaunas: Lietuvos Respublikos žemės ūkio rūmai; sukurta 2018 [žiūrėta 2020-05-17]. Adresas: <https://zur.lt/zum-imasi-priemoniu-kovai-su-akm/>.



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Greta Narodovskaja  
Magistro baigiamasis darbas

**Galimas vabzdžių vaidmuo Afrikinio kiaulių maro viruso pernešime**

SANTRAUKA

Afrikinis kiaulių maras – infekcinė naminių kiaulių ir laukinių šernų virusinė liga. Šiuo metu nėra vakcinų nuo AKM gydymo, o būdai ligai kontroliuoti priklauso nuo ankstyvo viruso aptikimo, laiku laboratorijoje nustatytos diagnozės ir griežtų sanitarinių priemonių įgyvendinimo. Naujų galimų mechaninių vektorių atradimas ir nustatymas ypatingai svarbus, kadangi tai padės geriau suprasti viruso perdavimo būdus, kontroliuoti ligos plitimą ir, tikėtina, paskatins sukurti vakcinas nuo Afrikinio kiaulių maro viruso. Mokslinio tyrimo metu mes įvertinome vabzdžių vaidmenį AKMV pernešime. Mes pritaikėme veiksmingą metodą išskirti ir identifikuoti virusinę DNR vabzdžiuose. Palyginome viruso paplitimą skirtingose vabzdžių rūšyse, ir nustatėme, kad *Stomoxys calcitrans* gali būti vienas iš mechaninių vektorių perduodant AKMV. Lyginant nukleotidų išsidėstymą sekose, mes nustatėme, kad mūsų virusinės sekos priskiriamos II genotipui ir mažiausiai skiriasi nuo III, VII, XX, XVIII, XXII genotipų, tačiau turi daugiausiai skirtumų lyginant su X genotipu.

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER  
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Greta Narodovskaja  
Master thesis

**The Possible Role of the Insects in African Swine Fever Virus Transmission**

SUMMARY

African swine fever is an infectious viral disease of domestic pigs and wild boars. Currently, there is no ASFV vaccine, and methods to control the disease depend on early detection of the virus, rapid laboratory diagnosis and strict sanitary measures. The discovery and identification of new potential mechanical vectors is particularly important as it will allow to understand virus transmission pathways better, to control spread of the disease and it is likely to lead to the development of vaccines against African swine fever virus. In this study we evaluated the role of insects in ASFV transmission. We applied an efficient method to isolate and to identify viral DNA in insects. Comparison of the virus prevalence in different insect species demonstrated, that *Stomoxys calcitrans* may be one of the mechanical vectors which transmit ASFV. We ascertained that our viral sequences belong to II genotype and differ the least from the III, VII, XX, XVIII, XXII genotypes, but have the most differences compared to the X genotype, comparing the arrangement of nucleotides in sequences.

## Priedai

### 1 priedas

**1 lentelė.** Duomenys apie haplotipo tinklui sudaryti panaudotus virusus. -, - ženklų pažymėtas pasikartojantis haplotipo pavadinimas.

Pavadinimas tinkle	Sekos pavadinimas	Genotipas	Kilmės šalis
II (1)	P72F_120_ <i>Calliphoridae</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_6_ <i>Lucilia</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_5_ <i>Lucilia</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_28_ <i>Staphylinidae</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_67_ <i>Piophilidae</i>	II	Lietuva
-, -	MH722357.1_CN201801	II	Kinija
-, -	JX857513.1_NO08/Av	II	Rusija
-, -	JX857512.1_Oren08	II	Rusija
-, -	AF270706.1_MAD/1/98	II	Madagaskaras
-, -	P72F_58_ <i>Musca</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_62_ <i>Cynonia</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_95_ <i>Stomoxys</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_211_ <i>Stomoxys</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_123_ <i>Muscidae</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_130_ <i>Stomoxys</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_103_ <i>Culicidae</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_184_ <i>Stomoxys</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_182_ <i>Lucilia</i>	II	Lietuva
-, -	P72F_122_ <i>Muscidae</i>	II	Lietuva
-, -	KJ627218.1_Pol14/Krus	II	Lenkija
-, -	KJ627216.1_LT14/1482	II	Lietuva
-, -	KJ627215.1_LT14/1490	II	Lietuva
-, -	KJ627214.1_Bell13/Grodno	II	Baltarusija

-,-	JX857521.1_Ukr12/Zapo	II	Ukraina
-,-	JX857515.1_Az08D	II	Azerbaidžanas
-,-	JX857510.1_Che07	II	Rusija
-,-	JX857509.1_Abk07	II	Gruzija
-,-	JX857508.1_Arm07	II	Armėnija
II (2)	P72F_111_-_Stomoxys	II	Lietuva
-,-	P72F_94_Stomoxys	II	Lietuva
-,-	P72F_194_Pseudoscorpiones	II	Lietuva
III, XX	JX403655.1_RSA_2003.3	III	Pietų Afrika
-,-	DQ250109.1_Lillie	XX	Pietų Afrika
XXII, VII	DQ250117.1_SPEC/245	XXII	Pietų Afrika
-,-	AF302818.1_RSA/1/98	VII	Pietų Afrika
XVIII	DQ250122.1_NAM/1/95	XVIII	Namibija
IV	AF449477.1_RSA/1/99/W	IV	Pietų Afrika
XIX	DQ250112.1_SPEC/125	XIX	Pietų Afrika
I	KX121587.1_DRC/86/10/1	I	Kongo Demokratinė Respublika
-,-	KX121581.1_DRC/74/09/6	I	Kongo Demokratinė Respublika
-,-	AF449466.1_BEL/85	I	Belgija
-,-	AF302816.1_BEN/1/97	I	Beninas
-,-	AF302815.1_IC/2/96	I	Drambio Kaulo Krantas
-,-	AF302813.1_NUR/90/1	I	Sardinija
-,-	AF302809.1_Brazil/79	I	Brazilija
-,-	AF301543.1_Malta/78	I	Malta
V	AF270708.1_Mozambique/19 60	V	Mozambikas
-,-	AF301541.1_Tengani/60	V	Malavis
VI	AF270712.1_MOZ/94/8	VI	Mozambikas
-,-	AF270710.1_SPEC265	VI	Mozambikas

XXIV	KY353995.1_MOZ_16/2006	XXIV	Mozambikas
XVI, XVII	AY494551.1_TAN/2003/2	XVI	Tanzanija
-,-	AY494550.1_TAN/2003/1	XVII	Tanzanija
XXI	DQ250125.1_RSA/1/96	XXI	Pietų Afrika
XXIV	KY353989.1_MOZ_10/2006	XXIV	Mozambikas
XIII, XI	AY351542.1_SUM/1411	XIII	Zambija
-,-	AY351522.1_KAB/62	XI	Zambija
VIII	AF449473.1_NDA/1/90	VIII	Malavis
-,-	AF449460.1_RHO/61/1	VIII	Zimbabvė
XII	AY351561.1_MFUE6/1	XII	Zambija
XIV	AY351555.1_NYA/12	XIV	Zambija
XV	AY494552.1_TAN/1/01	XV	Tanzanija
IX	AY351564.1_UGA2003/1	IX	Uganda
-,-	AF449475.1_UGA/1/95	IX	Uganda
XXIII	KT795360.1_ETH/3	XXIII	Etiopija
XX	AF449463.1_BUR/1/84	X	Burundžio Respublika
-,-	AF301546.1_TAN/Kwh12	X	Tanzanija