ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀԱԿՈԲՅԱՆ ՍՈՆԱ ԱՐՄԵՆԻ

ԽՈԶԵՐԻ ԱՖՐԻԿՅԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ՎԻՐՈՒՍԻ ԵՐԿԱՐԱՏԵՎ ՊԱՀՊԱՆՈՒՄԸ ԱՐՏԱՔԻՆ ՄԻՋԱՎԱՅՐՈՒՄ

Գ.00.03. – «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2022

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY

SONA ARMEN HAKOBYAN

LONG-TERM SURVIVAL OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS IN THE EXTERNAL ENVIRONMENT

Synopsis

of Dissertation Submitted for the Degree
of Candidate of Biological Sciences (Ph.D.) in the Field of
03.00.03. “Molecular and Cellular Biology”

YEREVAN – 2022

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝	կ.գ.դ., պրոֆ. Զավեն Ալեքսանդրի Կարալյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	ան.գ.դ. Սարգսյան Մարիամ Արմենակի կ.գ.թ. Հովակիմ Սարգսի Զաքարյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2022 թ. դեկտեմբերի 21-ին, ժամը 14:00-ին, ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ 0014, ք. Երևան, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և http://molbiol.sci.am/ կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2022 թ. նոյեմբերի 11-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու Զ.Ա. Խաչատրյան

Dissertation topic approved at the Scientific Council of the Institute of Molecular Biology NAS RA.

Scientific supervisor:	D.Sc., Prof. Zaven Alexandr Karalyan
Official opponents:	D.Sc. Mariam Armenak Sargsyan Ph.D. Hovakim Sargis Zakaryan
Leading organization:	Yerevan State University

The defense of the dissertation will be held on 21 December 2022, at 14:00 at the session of the specialized council 042 acting in the Institute of Molecular Biology NAS RA (Hasratyan 7, 0014, Yerevan, RA).

The dissertation is available at the library of the Institute of Molecular Biology NAS RA and at the website http://www.molbiol.sci.am.

Synopsis was sent out on 11 November 2022.

Scientific secretary of the specialized council 042
PhD Z.A. Khachatryan

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Աշխատանքի արդիականությունը: Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտ (ԽԱԺ) կոչվող համավարակի հարուցիչը համանուն՝ խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսն է (ԽԱԺՎ), որը կենդանիների առողջության պահպանության համաշխարհային կազմակերպության կողմից դասվում է որպես աշխարհում ընտանի խոզերի մահացության ամենակարևոր աղբյուրը (Achenbach et al., 2017; Njau et al., 2021): 1980-ական թվականներից սկսած, աֆրիկական տարածաշրջանի համար էնդեմիկ համարվող վիրուսը դուրս է եկել իր անտառային ցիկլից և սկսել տարածվել արդեն ամբողջ Եվրոպայով և Ասիայով (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015; Cwynar et al., 2019; Xue et al., 2022): Հայաստանի Հանրապետություն վիրուսը մուտք է գործել 2007 թվականին (Zaberezhnyĭ et al., 2012; Karalyan et al., 2012; Karalyan et al., 2017; Pikalo et al., 2020): Հիվանդության բարձր մահացությունը՝ գրեթե 100%, մինչ այժմ արդյունավետ գործող պատվաստանյութի և բուժման մեթոդների բացակայությունը, ԽԱԺՎ-ի վիրիոնի, գենոմի բարդ կազմությունը, ինչպես նաև կենսագործունեության ցիկլի բազմաբնույթ լինելը վիրուսին դարձնում են թե՛ գյուղատնտեսական և թե՛ սոցիալ-տնտեսական առումով լուրջ սպառնալիք (Cappai et al., 2018; Gaudreault et al., 2020; Carola Sauter-Louis et al., 2021): Չնայած ԽԱԺՎ-ին ուղղված մեծաքանակ աշխատանքների առկայությանը, դեռևս չկան այնպիսի ուսումնասիրություններ, որոնք թույլ կտան համապարփակ պատկերացում կազմել անտառային ցիկլից դուրս վիրուսի էվոլյուցիայի և էկոլոգիայի մասին: Ավելին, հստակ պարզաբանված չեն վիրուսի տրանսմիսիայի և կայունության մեխանիզմները, իսկ արտաքին միջավայրում վիրուսի պահպանման մասին հետազոտությունները շատ քիչ են: Վիրուսային էկոլոգիայի տեսանկյունից վերջին տարիներին իրականացված սակավաթիվ հետազոտությունները հիմք են տալիս այն համոզման ձևավորմանը, որ անտառային ցիկլից դուրս գոյություն ունեն վարակի լրացուցիչ աղբյուրներ, որոնք կարող են թերագնահատված լինել, օրինակ՝ վայրի խոզերի անմիջական և անուղղակի շփումը, վիրուսի ուղղակի և անուղղակի տրանսմիսիայի գործընթացները տարբեր վեկտորների և շտեմարան հանդիսացող կենդանի օրգանիզմների միջոցով և այլն: Հարկ է նշել, որ այսքան տարի անց, մինչ այժմ թե՛ անողնաշարավորներից և թե՛ ողնաշարավորներից ԽԱԺՎ-ի համար չկան հաստատված կենսաբանական վեկտոր/շտեմարան հանդիսացող կենդանի օրգանիզմներ, բացառությամբ Աֆրիկայի տարածաշրջանին բնորոշ *Ornithodoros* տեսակի փափուկ տզերը, ենթասահարյան Աֆրիկայի խոզերը (*Phacochoerus porcus*) և անտառային հսկա խոզերը (*Hylochoerus meinertzhageni*): Այս համատեքստում է՛լ ավելի են կարևորվում վիրուսի տրանսմիսիայի համար պոտենցիալ կենսաբանական վեկտորներ և շտեմարաններ հանդիսացող կենդանի օրգանիզմների բացահայտմանն ուղղված աշխատանքները, որոնք կօգնեն ոչ միայն վիրուսի էկոլոգիայի պարզաբանմանը, այլ նաև կանխարգելիչ միջոցառումների հստակեցմանն ու արդյունավետության բարձրացմանը:

Նպատակ և խնդիրներ: Աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել և բացահայտել ԽԱԺՎ-ի (*Armenia 07*) էկոլոգիան՝ գոյատևման և պահպանման առանձնահատկությունները և պահպանման ժամկետները, ինչպես նաև

շրջանառությունը եվրասիական տարածաշրջանում՝ աֆրիկական անտառային ցիկլից և վիրուսի համար էնդեմիկ, կայուն շտեմարաններից դուրս:

Այս նպատակի իրականացման համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

1. Ուսումնասիրել ԽԱԺՎ-ի (ինֆեկցիոն մասնիկների և վիրուսային գենոմի) հնարավոր երկարատև պահպանումը բնական պայմաններում (անտառներում, դաշտերում և բաց տարածքներում) լքված և հողի մեջ (արհեստական գերեզմանոցներում) թաղված խոզերի դիերում/կմախքներում, ինչպես նաև արհեստական միկրոկլիմայի (սառեցման) պայմաններում:
2. Ուսումնասիրել *Paramecium caudatum* տեսակի թարթիչավորների դերը ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում, բացահայտել վիրուսի ինֆեկցիոն մասնիկների և գենոմի հնարավոր պահպանումը թարթիչավորների օրգանիզմներում, ինչպես նաև պարզել՝ արդյոք վերջիններս կարող են հանդիսանալ վիրուսի համար վեկտորներ:
3. Ուսումնասիրել *Dendrobaena alpine* տեսակի անձրևորդերի դերը ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում, բացահայտել վիրուսի ինֆեկցիոն մասնիկների և գենոմի հնարավոր պահպանումը անձրևորդերի օրգանիզմներում, ինչպես նաև պարզել՝ արդյոք վերջիններս կարող են հանդիսանալ վիրուսի համար վեկտորներ:
4. Ուսումնասիրել *Xeropicta derbentina* տեսակի փափկամարմինների դերը ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում՝ որպես հնարավոր վեկտորներ, բացահայտել վիրուսի ինֆեկցիոն մասնիկների և գենոմի հնարավոր պահպանումը փափկամարմինների օրգանիզմներում:
5. Ուսումնասիրել *Aedes aegypti* տեսակի մոծակների դերը ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում որպես՝ հնարավոր վեկտորներ, բացահայտել վիրուսի ինֆեկցիոն մասնիկների և գենոմի հնարավոր պահպանումը մոծակների օրգանիզմներում, ինչպես նաև վիրուսի ուղղահայաց փոխանցումը մոր օրգանիզմից սերունդներին:

Գիտական նորույթ: Ուսումնասիրությունների շրջանակներում Հայաստանի Հանրապետությունում առաջին անգամ իրականացվել են բնական պայմաններում դաշտերում ու անտառներում լքված և/կամ թաղված մահացած խոզերի դիերի, կմախքների առանձին հատվածների հետազոտություն՝ դրանցում ԽԱԺՎ-ի հնարավոր երկարատև պահպանման բացահայտման նպատակով: Հայաստանում ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայի ուսումնասիրությունների շրջանակում առաջին անգամ անցում է կատարվել անողնաշարավորների դերի բացահայտմանը: Հետազոտությունների արդյունքում ցույց է տրվել անտառային ցիկլից դուրս վիրուսի տրանսօվարիալ փոխանցումը, ինչպես նաև երկարատև պահպանումը *Aedes aegypti* տեսակի մոծակների օրգանիզմում, որոնք վիրուսի համար հաստատվել են որպես լիարժեք մեխանիկական վեկտորներ: Ցույց է տրվել նաև անտառային ցիկլից դուրս վիրուսի երկարատև պահպանումը *Xeropicta derbentina* տեսակի փափկամարմիններում, որոնք վիրուսի համար հաստատվել են որպես լիարժեք մեխանիկական վեկտորներ: Բացի այդ, *Xeropicta derbentina-ի* օրգանիզմում բացահայտվել է վիրուսային գենոմի տրանսկրիպցիոն ակտիվության պահպանում, ինչը թույլ է տալիս դրանք դիտարկել որպես կենսաբանական վեկտորներ:

Գիտակիրառական նշանակությունը: Իրականացված բոլոր ուսումնասիրությունները հիմք են տալիս եզրակացնելու, որ ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում անողնաշարավոր կենդանի օրգանիզմները կարող են մեծ դեր խաղալ ինչպես վիրուսի պահպանման տեսանկյունից, այնպես էլ որպես հնարավոր վեկտոր: Գիտահետազոտական արդյունքները կնպաստեն անհրաժեշտ կանխարգելիչ միջոցառումների բնույթի հստակեցմանը, օրինակ՝ դիերի թաղման և մեկուսացման գործընթացները՝ նվազեցնելով կամ կանխելով վիրուսի հնարավոր շփումը որոշ անողնաշարավորների հետ: Ուսումնասիրությունների արդյունքում կատարվել են նաև ԽԱԺՎ-ի շրջանառության ցիկլի բնույթին և տրանսմիսիոն մեխանիզմներին առնչվող որոշ բացահայտումներ (ինչպես օրինակ՝ հնարավոր աբորտիվ ինֆեկցիա տզրուկներում և ցամաքային խխունջներում), որոնք կնպաստեն վիրուսի էկոլոգիային ուղղված ուսումնասիրությունների շարունակականությանը:

Ատենախոսության փորձաքննությունը: Աշխատանքի հիմնական դրույթները ներկայացվել և զեկուցվել են ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստերում՝ 2021-2022թթ.-ին:

Հրատարակված գիտական աշխատանքները: Ատենախոսական աշխատանքի թեմայով հրատարակվել է 5 գիտական հոդված:

Ատենախոսության ծավալը և կառուցվածքը: Աշխատանքը շարադրված է 105 էջի վրա, պարունակում է 4 աղյուսակ, 21 նկար: Ատենախոսությունը բաղկացած է հետևյալ բաժիններից՝ «Ներածություն», «Գրական ակնարկ», «Նյութեր և մեթոդներ», «Արդյունքներ և քննարկում», «Վերջաբան», «Եզրակացություններ» և «Գրականության ցանկ»: Գրականության ցանկը ներառում է անգլերեն լեզվով 166 անվանում:

ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Կենդանիներ: Խոզերին էֆթանազիայի ենթարկելու համար օգտագործվել է ածխածնի երկօքսիդի ինհալացիա (75-80% ածխածնի երկօքսիդ, 20 րոպեի ընթացքում): Փորձարարական վարակը կատարվել է 4 ամսական խոզերի (n=15) վրա՝ հավաքված նմուշների՝ վիրուսային լուծամզվածքի միջմկանային ներարկումով: Կենդանիների խնամքը և էֆթանազիան իրականացվել է՝ համաձայն կենդանիների խնամքի ու կիրառման և ամերիկյան անասնաբույժների բժշկական ասոցիացիայի էֆթանազիայի մասին ուղեցույցների:

Վիրուս: Բոլոր հետազոտություններում օգտագործվել է ԽԱԺՎ-ի *Armenia 07* շտամը: Վիրուսի տիտրումը կատարվել է, ինչպես նկարագրված է նախկինում և արտահայտվել որպես log 10 հեմադսորբցիոն չափաբաժին $(HADU)_{50}$/մլ՝ ոչ ադապտացված բջիջների համար (Enjuanes et al., 1976): Վարակման համար օգտագործված վիրուսի չափաբաժինը եղել է 4.5-5.5 lg $HADU_{50}$/մլ:

Ջուր: ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում *Paramecium caudatum*, *Dendrobena alpine*, *Xeropicta derbentina*, *Aedes aegypti* տեսակի անողնաշարավորների դերի բացահայտմանն ուղղված ուսումնասիրություններում 10 մլ ծորակային ջուրը խառնվել է վարակված 1.0

մլ փայծաղի լուծամզվածքի հետ, որտեղ ԽԱԺՎ-ի (*Armenia 07*) տիտրը կազմել է 6.5 lg_{10} $HADUU_{50}$/մլ, պահպանվել ապակե անոթների մեջ և ուսումնասիրվել 23-27°C ջերմաստիճանային պայմաններում (Karalyan et al., 2012): Վիրուսի նախնական չափաբաժինը եղել է 5.5 $HADU_{50}$/մլ:

Հող: ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում *Dendrobena alpine*, *Xeropicta derbentina* տեսակի անողնաշարավորների դերի բացահայտմանն ուղղված ուսումնասիրություններում բակի հողը՝ 1000 գ խառնվել է վարակված 1.0 մլ փայծաղի լուծամզվածքի հետ, որտեղ ԽԱԺՎ-ի (*Armenia 07*) տիտրը կազմել է 6.5 lg_{10} $HADU_{50}$/մլ, պահպանվել պլաստիկ անոթների մեջ և ուսումնասիրվել 22-27°C ջերմաստիճանային պայմաններում: Վիրուսի նախնական չափաբաժինը եղել է 5.5 lg_{10} $HADU_{50}$/մլ: pH-ի արժեքները տատանվել են 7.9-8.1 սահմաններում:

Վիրուսի ինֆեկցիոն մասնիկների որոշում: Հետազոտվող բոլոր նմուշներում ԽԱԺՎ-ի ինֆեկցիոն մասնիկների առկայությունը ստուգվել է հեմադսորբցիոն մեթոդով HADU50/մլ:

Խոզերի ալվեոլյար մակրոֆագերի կուլտուրա: Կուլտուրայի անջատման նպատակով երեք ամսական խոզերն ենթարկվել են էվթանազիայի և նրանցից հեռացվել են թոքերը: Խոզերի ալվեոլյար մակրոֆագերի վարակումը իրականացվել է հետազոտված բոլոր նմուշների առավելագույն նոսրացումներով (1×10^{-1} HADUU $_{50}$/մլ լոգարիթմական նոսրացումներ): Վարակից առաջ, բոլոր նմուշները հետազոտվել են հեմադսորբցիայի և իրական-ժամում քանակական պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի (ԻԺ-ՔՊՇՌ) մեթոդների կիրառմամբ վերջիններումս ԽԱԺՎ-ի հայտնաբերման համար: Տրիպան կապույտ բացառման թեստի օգնությամբ գնահատվել է բջիջների կենսունակությունը բոլոր նմուշների համար խոզերի ալվեոլյար մակրոֆագերի հետ միասին: Բջիջների կենսունակությունը հետազոտություններից առաջ և հետո եղել է առնվազն 95-97%:

ԴՆԹ-ի անջատում, գենային էքսպրեսիայի վերլուծություն. Արտաքին միջավայրում ԽԱԺՎ-ի պահպանմանն ուղղված հետազոտություններում բոլոր ուսումնասիրված նմուշներից (ծավալը 0.2 մլ) նուկլեինաթթվի անջատումն իրականացվել է Viral Genomic DNA/RNA Extraction և HiGene™ Viral RNA/DNA Prep (BIOFACT) հավաքածուներով (MyBioSource, San Diego, California, USA; catalog number MBS846571, այնուհետև ՌՆԹ/ԴՆԹ նմուշները հակադարձ տրանսկրիպցիայի են ենթարկվել REVERTA-L (REVERTA-L kit AmpliSens Biotechnologies) հավաքածուով՝ համաձայն արտադրողի ուղեցույցի: Նմուշներում ԽԱԺՎ-ի առկայությունը ստուգվել է ԻԺ-ՔՊՇՌ-ի (Rotor Gene Q instrument, Qiagen, USA և Eco Illumina) կիրառմամբ:

Գենային էքսպրեսիայի վերլուծություն: ԻԺ-ՔՊՇՌ մեթոդը կիրառվել է վարակումից հետո համապատասխան անողնաշարավոր կենդանի օրգանիզմում, ոսկրային նյութի նմուշներում՝ ԽԱԺ վիրուսի ԴՆԹ-ի չափման, ինչպես նաև վիրուսի բազմացման համար անհրաժեշտ թիրախային որոշ գեների՝ *K196R* (թիմիդին կինազ գեն) *R298L* (սերին/թրեոնին պրոտեին կինազ գեն) *E301R, EP402R* (ԽԱԺՎ C-տիպ լեկտին), *P1192R* (տոպոիզոմերազ I), *P1192R* (տոպոիզոմերազ II), տրանսկրիպցիոն ակտիվության

ստուգման նպատակով: Աշխատանքում բոլոր արդյունքները ներկայացված են *K196R* գենի օրինակով:

Վիճակագրական վերլուծություն: Բոլոր *in vitro* փորձարկումներն անցկացվել են երեք անգամ/եռակի: Վիրուսի ազդեցությամբ առաջացած փոփոխությունների արժանահավատչությունը /հավաստիության որոշումը, պարամետրիկ ցոիցանիշների համար գնահատվել է երկկողմանի Ստյուդենտի թեստի միջոցով, ըստ t չափանիշի. $p<0.05$ համարվել է չափավոր մեծ: Ոչ պարամետրիկ ցուցանիշների համար տարբերության հավաստիության որոշումը կատարվել է ըստ Վիլկոքսոն-Մանն-Ուիթնիի U չափանիշի SPSS 17.0 ծրագրի օգնությամբ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA):

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

ԽԱԺՎ-ի պահպանումն արտաքին միջավայրում

Անտառներից, դաշտերից և արհեստական գերեզմանոցներից ձեռք բերված ավելի քան 70 ոսկրային և ոսկրածուծային, ու 30 հյուսվածքային նմուշների ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ գրեթե բոլոր նմուշներում ԻԺ-ՔՊՇՌ մեթոդի կիրառմամբ հայտնաբերվել է վիրուսային *p72* գենը հատկապես հիվանդության սուր դեպքերի ժամանակ: Սա բացատրվում է ԽԱԺ-ի սուր ձևի ժամանակ դիտվող վիրուսային բարձր տիտրերի առկայությամբ՝ համեմատած քրոնիկ ԽԱԺ-ի հետ (Sargsyan et al., 2018): Հատկանշական է, որ որոշ նմուշներում, որոնք ուսումնասիրվել են ԻԺ-ՔՊՇՌ մեթոդի օգնությամբ, դրական արդյունքները կարող են պայմանավորված լինել այն հանգամանքով, որ նմուշներում ի սկզբանե պահպանված են եղել հյուսվածքների մնացորդներ: Կարևոր է նաև նշել, որ երեք նմուշների ուսումնասիրությունից միայն մեկ դեպքում է դիտարկվել բջիջների (դրական ախտահարում) վարակում, բայց ի հակադրություն դրա՝ հեմադսորբցիայի ռեակցիան նույն նմուշում եղել է բացասական, ինչը կարելի է բացատրել ԻԺ-ՔՊՇՌ մեթոդի (որի օգնությամբ իրականացնում են գենոմների գնահատում) բարձր զգայունությամբ՝ ի համեմատ հեմադսորբցիայի ռեակցիայի (որի օգնությամբ իրականացնում են վարակիչ մասնիկների հայտնաբերում):

Գրեթե բոլոր այն նմուշներում, որոնցում ԻԺ-ՔՊՇՌ-ի արդյունքները եղել են դրական, ԽԱԺՎ-ի վարակիչ մասնիկներ չեն հայտնաբերվել: Բացառություն է կազմում 0.8 տարեկան թաղված կմախքի նմուշը՝ Os femoralis-ից ստացված ոսկրածուծը, որի լուծամզվածքով մշակված թոքային ալվեոլյար մակրոֆագերում հայտնաբերվել է վարակը:

Առողջ խոզերի վարակումը բոլոր հետազոտված նմուշներով չի հաջողվել: ԽԱԺ-ի վիրուսի գենոմի որոշ հատվածներ ավելի լավ գոյատևել են ստորգետնյա պայմաններում, քան հողի մակերեսին: Օրինակ՝ հողի ավելի մակերեսային շերտերից հավաքված կղանքները և femur-ն ու fibula-ն, որոնք գտնվել են և թաղված են եղել հողի ավելի խորը շերտերում: Բնական պայմաններում ԽԱԺՎ-ի գոյատևման համար

լավագույն միջավայրը թաղված դիերի՝ չվնասված խոշոր խողովակաձև ոսկորներից՝ ինչպիսիք են femur, humerus կամ tibia, նմուշառված ոսկրածուծն է եղել (նկար 1):

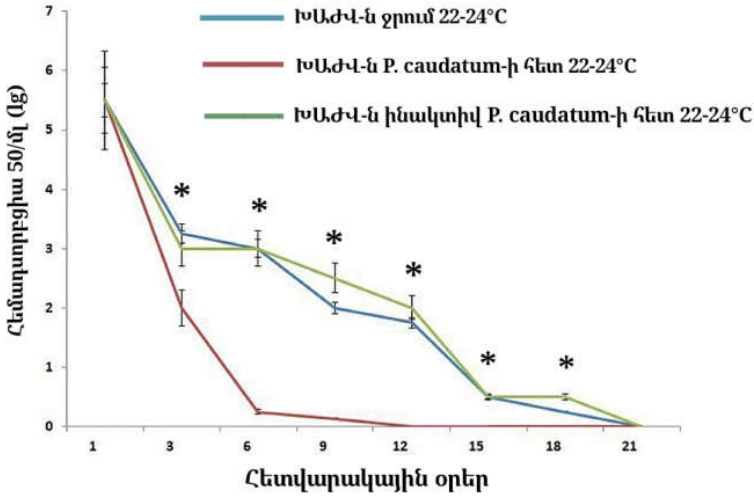
Նկար 1. ԽԱԺՎ-ով (*Armenia 07)* վարակված խոզերի կմախքների/կմախքի առանձին հատվածների նմուշահանում: **Ա, Բ** և **Գ.** Գերեզմանների փորում և փորված գերեզմաններից նմուշների հավաքագրում, **Դ.** Անտառում լքված դիակի կմախքի մնացորդներ:

Խոզերի դիերից զերծ միջավայրում վիրուսի գոյատևումն ավելի երկար ժամանակահատվածներում քիչ հավանական է: Բացի այդ, մեր կարծիքով (Karalyan et al., 2019)՝ խոզերի հյուսվածքներից զերծ միջավայրում վիրուսային վարակիչ մասնիկների հնարավոր պահպանումն ամռան ընթացքում չի գերազանցում մեկ ամիսը նույնիսկ արևի ուղիղ ճառագայթների ազդեցության բացակայության պարագայում: Արհեստական գերեզմաններում անվնաս ոսկրածուծով ամբողջական ոսկորներում *p72* վիրուսային գենը պահպանվել է շատ երկար ժամանակ՝ ավելի քան երկու տարի: Սակայն մեր արդյունքների համաձայն՝ վիրուսի վարակիչ մասնիկները ստորգետնյա պայմաններում պահպանվել են ոչ այդքան երկար ժամանակահատված՝ նույնիսկ անվնաս ոսկրածուծով ամբողջական ոսկորներում վիրուսը պահպանվել է մի քանի ամիս: Մեր ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ Աֆրիկայից դուրս ԽԱԺ վիրուսի էվոլյուցիան չի հանգեցրել տեր օրգանիզմից դուրս վիրուսի պահպանման ժամանակահատվածի երկարաձգման, և նոր վիրուսային իզոլյատները սովորաբար ավելի վատ են գոյատևում շրջակա միջավայրում, քան վիրուսի նախորդ իզոլյատները, մասնավորապես՝ *Armenia 07* և *Georgia 07* շտամները:

Հարկ է նշել, որ արտաթորանքների բոլոր նմուշներից և ոչ մեկի դեպքում չի հայտնաբերվել վիրուսային գենոմը, իսկ հեմադսորբցիայի և ԹԱՄ-երում վարակման հետազոտությունները տվել են բացասական արդյունք: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ սառեցված նմուշներում վիրուսը գոյատևել է 5-7 տարի: Այդ ժամանակահատվածում վիրուսը պահպանում է իր վարակելիությունը ինչպես *in vitro*, այնպես էլ *in vivo* պայմաններում:

***Paramecium caudatum* թարթիչավորների դերը ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում**

ԽԱԺՎ-ի և *Paramecium caudatum*-ի *in vitro* պայմաններում համատեղ կուլտիվացիայի ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ թարթիչավորների աճեցումը վիրուսի հետ միասին հանգեցրել է դրանց չափերի մեծացմանը, սակայն այդ փոփոխությունները արժանահավատ չեն (P>0.05 ըստ Մանն-Ուիթնիի U չափանիշի): Վարակիչ փայծաղի լուծամզվածքների հետ խառնված (5.5 Հյուսվածքային բջջաթունավոր չափաբաժին / 50 մլ) և 22-24°C ջերմաստիճանում պահպանված ջրում վիրուսի տիտրերը նվազել են վարակումից առաջին 3 օրերից հետո (նկար 2), իսկ այնուհետև հավասարվել:

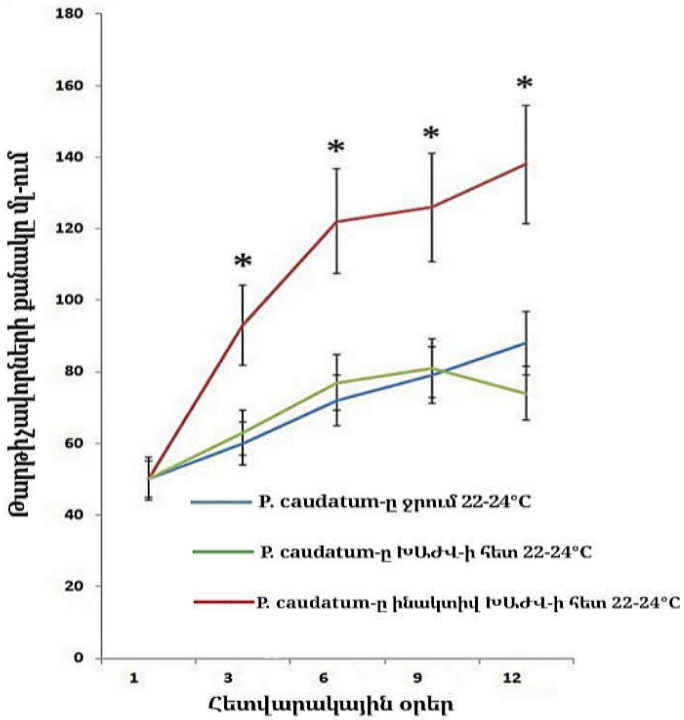


Նկար 2. ԽԱԺ վիրուսի (*Armenia 07)* մակարդակի նվազումը հեմադորբցիոն միավորներով (lg) *P. caudatum*-ից զերծ ջրում, ԽԱԺՎ-ով վարակված և *P. caudatum* պարունակող շրջակա միջավայրի ջրերում, և ինակտիվացված ԽԱԺՎ-ով վարակված և *P. caudatum* պարունակող շրջակա միջավայրի ջրերում: p<0.05

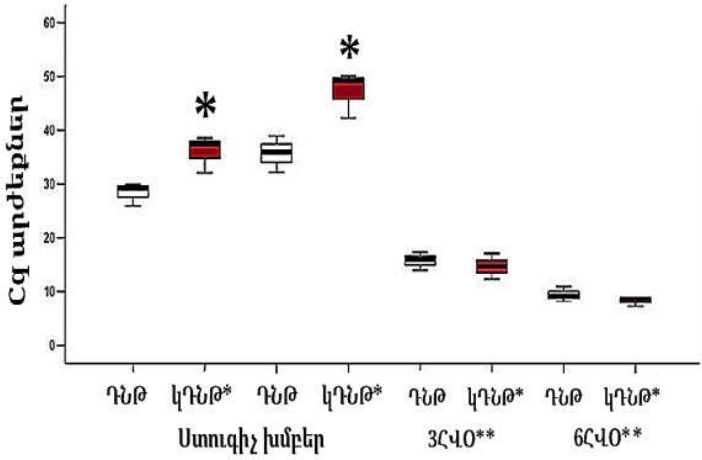
Հարկ է նշել, որ վարակումից 3 և 6 օրերից հետո դիտվող փոփոխությունները վիճակագրորեն արժանահավատ չեն: Թարթիչավորներից զերծ ջրում վիրուսի տիտրերի հաստատուն ձևով նվազումը շարունակվել է մինչև վերջինիս լիակատար անհետացումը՝ 2-3 շաբաթների ընթացքում: Երբ վիրուսը համատեղ կուլտիվացվել է *P. caudatum*-ի հետ, վիրուսի տիտրերի նվազումը տեղի է ունեցել ավելի արագ: Վարակումից արդեն իսկ 3 օր հետո վիրուսի տիտրերի տարբերությունը դառնում է վիճակագրորեն արժանահավատ, իսկ համատեղ աճեցման պարագայում վարակումից 6-9 օրերի ընթացքում ուսումնասիրված նմուշների մի մասը զերծ է եղել վիրուսից: Վարակումից 12 օր անց վիրուսը չի հայտնաբերվել ուսումնասիրված և ոչ մի նմուշում: ԽԱԺ վիրուսի համատեղ կուլտիվացիան քայքայված (սառեցում-ապասառեցում) *P.*

caudatum-ի հետ ցույց է տվել աննշան տարբերություն ԽԱԺՎ-ի հսկիչ և քայքայված բջիջների խմբերի միջև (նկար 2):

Թարթիչավորների և վիրուսի համատեղ կուլտիվացիան հանգեցրել է *P. caudatum*-ի բազմացման արագացմանը՝ ի համեմատ կերակրման նորմալ պայմաններում կուլտիվացիայի (փոփոխությունները վիճակագրորեն արժանահավատ են, տես՝ նկար 3): P. caudatum-ի համատեղ կուլտիվացիան ինակտիվացված վիրուսի հետ ցույց է տվել P. caudatum-ի բազմացման աննշան տարբերություն՝ համեմատած վարակիչ վիրուսի հետ (փոփոխությունները վիճակագրորեն արժանահավատ չեն, տես՝ նկար 3): Նմանատիպ արդյունքներ ստացվել են նաև ԻԺ-ՔՊՇՌ-ի կիրառման դեպքում (նկար 4): Նմուշներից որոշներում վիրուսը չի հայտնաբերվել՝ սկսած վարակումից 6 օր անց: Անկախ կուլտիվացիայի ժամանակահատվածից՝ նմուշներից և ոչ մեկում չի արձանագրվել տրանկսրիպցիոն ակտիվություն՝ կոմպլեմենտար ԴՆԹ-ի մակարդակի բարձրացում:



Նկար 3. P. caudatum-ի քանակն ակտիվ ԽԱԺՎ (Armenia 07) պարունակող ջրում (5.5 lg10 HADU50/մլ) $p<0.05$, և վիրուսից զերծ ջրում $p>0.05$:

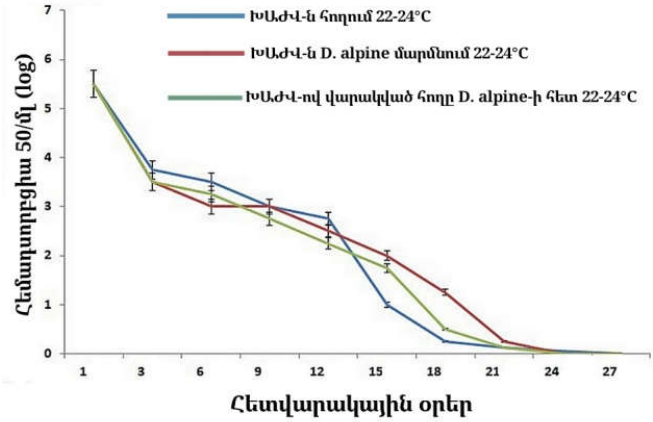


Նկար 4. ԽԱԺ վիրուսի (*Armenia 07*) *K196R* գենի ԴՆԹ-ի մակարդակները և տրանսկրիպտները՝ արտահայտված Cq-ներով, *P. caudatum*-ի ջրային միջավայրում: Ստուգիչ խմբերում՝ ԴՆԹ-ն համապատասխանում է թոքերի ալվեոլյար մակրոֆագերում (ԹԱՄ) 1000 և 10000 հեմադսորբցիոն միավորի (ՀՄ) 50 մլ-ում: կԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում:
* Արժանահավատ է ԴՆԹ-ի մակարդակների համեմատ (P<0.05 ըստ Մանն-Ուիթնի Ս թեստի): կԴՆԹ* կոմպլեմենտար ԴՆԹ: ՀՎՕ** հետվարակային օրեր

Այսպիսով, կարելի է եզրակացնել, որ վիրուսի գոյատևումը *P. caudatum*-ի հետ հանգեցնում է վիրուսի արագ ինակտիվացմանը և ինֆուզորիայի պրոլիֆերացիայի ակտիվացմանը: Դրա հնարավոր բացատրությունն այն է, որ վիրուսը ծառայում է ինֆուզորիայի համար որպես սննդանյութերի առատ աղբյուր (Akunyili et al., 2008): Քաղցրահամ ջրերում *P. caudatum*-ը հանդիսանում է որպես ֆիլտրատոր-քաղհանիչ, և դրա պատճառով ֆիլտրացիոն եղանակով հեշտությամբ անջատում են վիրուսը արտաքին միջավայրից: Որոշ վիրուսներ, որոնք կայուն են թթվային միջավայրում նաև կայուն են *P. caudatum*-ի ֆերմենտային համակարգի հանդեպ (Karalyan et al., 2012): Սակայն ԽԱԺ վիրուսը կայուն չէ թթվային միջավայրում (Carlson et al., 2020) և այդ պատճառով անհետանում է միջավայրից, որը պարունակում է ինֆուզորիաներ:

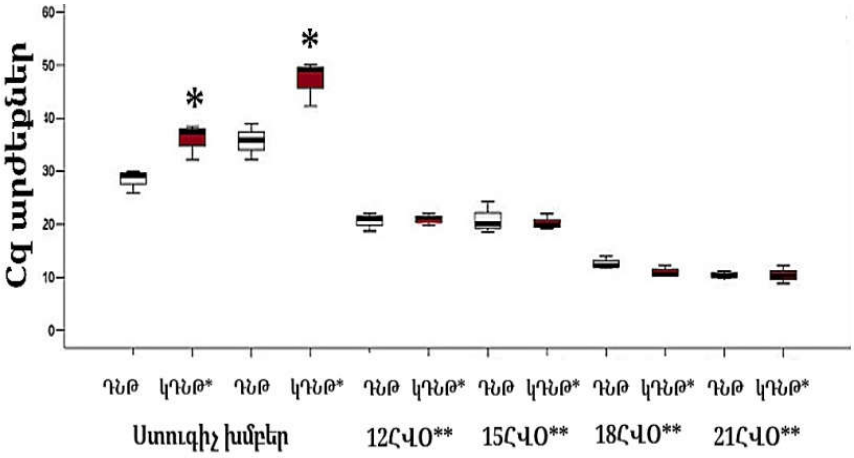
***Dendrobena alpine* անձրևորդների դերը ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում**

Ըստ ստացված տվյալների՝ վիրուսի ինֆեկցիոն մասնիկների մակարդակն անձրևորդերի և հողի մեջ փոփոխվում են միանման ձևով: Նկար 5-ից երևում է, որ վարակումից հետո որդերի մեջ վիրուսի հեմադսորբցիոն միավորների թիվը նույնն է, ինչ վիրուսի քանակությունը հողում՝ սկսած վարակման երրորդ օրից: Արդյունքները ցույց են տվել, որ ներարկման միջոցով վարակված անձրևորդերի առկայության դեպքում ԽԱԺ վիրուսի գոյատևումը չի տարբերվում անձրևորդեր չպարունակող հողում վիրուսի գոյատևման ժամանակից:



Նկար 5. ԽԱԺ-ի (*Armenia 07)* մակարդակները (lg) անձրևորդերի օրգանիզմում, անձրևորդերից զերծ վարակված հողում և անձրևորդերով հողում: p>0.05:

Վիրուսի գենոմի պահպանումը և հնարավոր ակտիվացումը հողում և անձրևորդերում կատարվել է ԻԺ-քՊՇՌ մեթոդով, իսկ արդյունքները ներկայացված են նկար 6-ում:



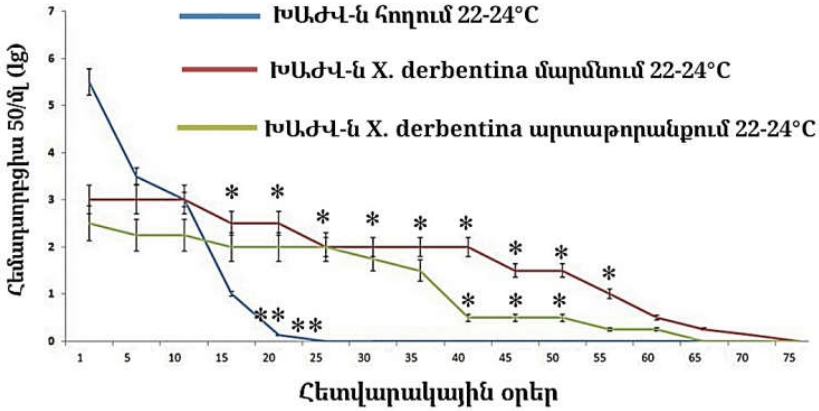
Նկար 6. ԽԱԺՎ-ի (*Armenia 07) K196R* գենի ԴՆԹ-ի և տրանսկրիպտների մակարդակները *Dendrobaena alpine* անձրևորդերի օրգանիզմում՝ արտահայտված Cq-ներով:
Ստուգիչ խմբերում՝ ԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում: կԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում:
* Արժանահավատ է ԴՆԹ-ի մակարդակների համեմատ (p<0.05 ըստ Մանն-Ուիթնի *U* թեստի): կԴՆԹ* կոմպլեմենտար ԴՆԹ: ՀՎՕ** հետվարակային օրեր

Վիրուսային գեների (թիմիդին-կինազ *K196R*) տրանսկրիպցիոն հետազոտությունները ԻԺ-ՔՊՇՌ մեթոդի կիրառմամբ ցույց են տվել, որ ոչ ԽԱԺՎ-ով վարակված հողում և ոչ էլ անձրևորդերում տրանսկրիպցիոն ակտիվություն չի դրսևորվել (նկար 6):

Անձրևորդերի նոր սերնդում վիրուսի հայտնաբերման համար կիրառվել են հեմադսորբցիոն և ԻԺ-ՔՊՇՌ մեթոդները: Այս ուսումնասիրություններում (նոր սերունդը ծնվել է փորձի մեկնարկից 30-50 օր հետո) վիրուսի առկայություն չի դիտարկվել: ԽԱԺ գեների տրանսկրիպցիոն ակտիվություն նույնպես չի դիտարկվել:

***Xeropicta derbentina* փափկամարմինների դերը ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում**

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ *Xeropicta derbentina* ցամաքային փափկամարմինների օրգանիզմում և արտաթորանքում ԽԱԺՎ-ի ինֆեկցիոն տիտրերը արժանահավատորեն նվազել են՝ ի համեմատ հողում և ջրում վիրուսի մակարդակի, հետազոտության առաջին իսկ օրվանից սկսած: Այնուամենայնիվ, ԽԱԺ վիրուսի մակարդակի նվազման արագությունը հողում շատ ավելի բարձր է, քան փափկամարմիններում (նկար 7):

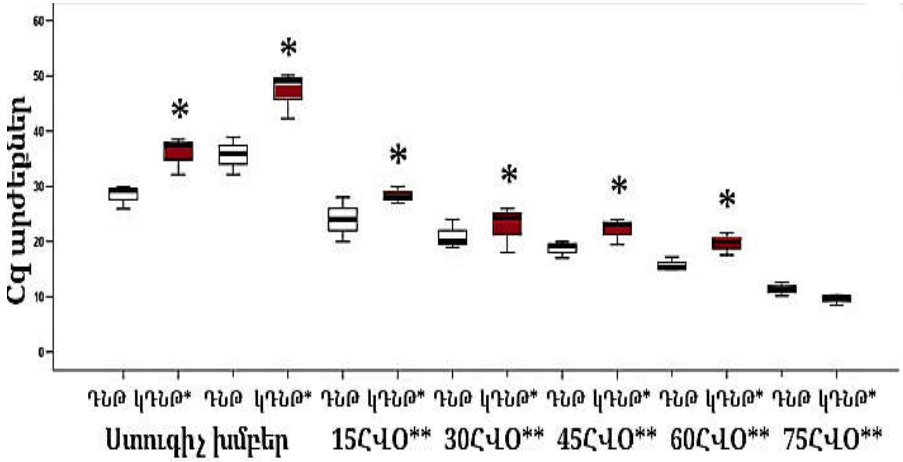


Նկար 7. ԽԱԺՎ-ի (*Armenia 07)* (lg_{10} $HADUU_{50}$/մլ) մակարդակները փափկամարմինների օրգանիզմում, արտաթորանքում և վարակված հողում՝ արտահայտված հեմադսորբցիայի միավորներով (lg): Մանն-Ուիթնի *U*: p> 0.05):
* Արժանահավատ է ստուգիչի մակարդակների համեմատ (p<0.05 ըստ Մանն-Ուիթնի *U* թեստի): ** Ներկայացված են ԽԱԺՎ-բացասական նմուշներ:

Վարակումից 15 օր անց նկատվել է վիրուսի մակարդակների արժանահավատ փոփոխություն հողում և ջրում (նկար 7): Վարակումից հետո 20-րդ օրը հողի նմուշների զգալի մասում հեմադսորբցիայի տվյալները եղել են բացասական, վիրուսի

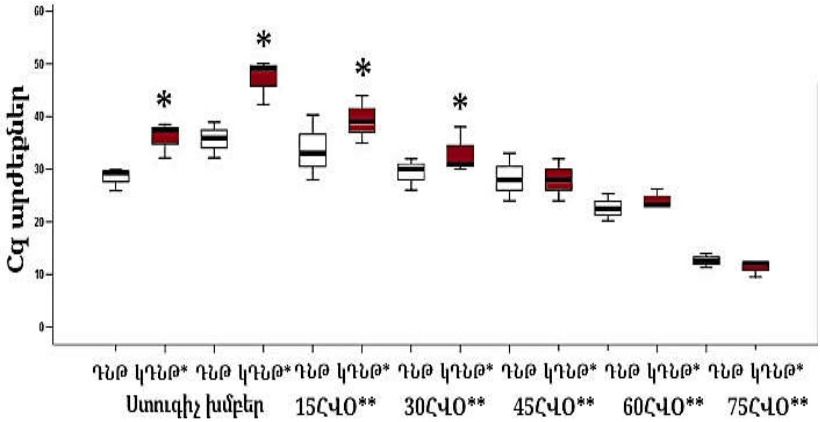
հայտնաբերում չի դիտարկվել: ԽԱԺՎ-ի ինֆեկցիոն մասնիկները փափկամարմինների օրգանիզմում և վերջիններիս արտաթորանքում պահպանվել են ավելի երկար ժամանակահատված, քան հողի նմուշներում, որտեղ կենսագործել են փափկամարմինները (նկար 7):

Վիրուսի մակարդակը *Xeropicta derbentina*-ի արտաթորանքում ավելի ցածր էր, քան օրգանիզմում՝ մոտավորապես 1-1.5 log հեմադսորբցիոն միավոր 50/մլ չափով: Այսպիսի տարբերություն դիտարկվել է հետազոտվող բոլոր նմուշներում: Փափկամարմինների արտաթորանքներից երկարատև պահպանված վիրուսի անջատումը, ամենայն հավանականությամբ, ենթադրում է, որ ԽԱԺՎ-ը կարող է պահպանվել կենդանու աղեստամոքսային տրակտում: Հարկ է նշել, որ վիրուսի ավելի երկարատև պահպանում դիտարկվել է ԻԺ-ՔՊՇՌ մեթոդի կիրառման ժամանակ (նկար 8, 9):

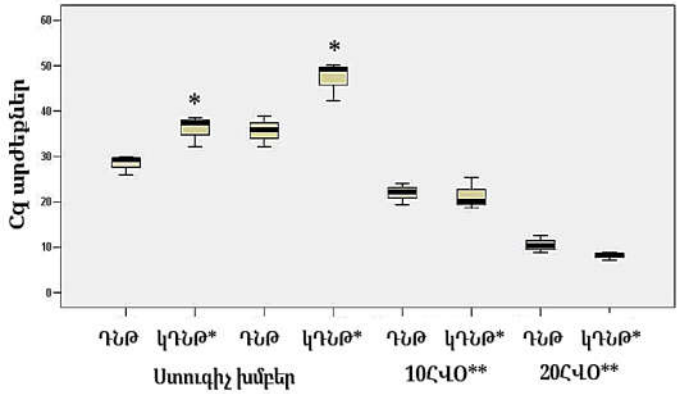


Նկար 8. ԽԱԺ վիրուսի (*Armenia 07) K196R* գենի ԴՆԹ-ի մակարդակները և տրանսկրիպտները *Xeropicta derbentina* փափկամարմինների արտաթորանքում:
Ստուգիչ խմբերում՝ ԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում: կԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում:
* Արժանահավատ է ԴՆԹ-ի մակարդակների համեմատ ($p<0.05$ ըստ Մանն-Ուիթնի *U* թեստի): կԴՆԹ* կոմպլեմենտար դեզօքսիռիբոնուկլեինաթթու: ՀՎՕ** հետվարակային օրեր:

Կարևոր է նշել նաև, որ փափկամարմինների մարմնից և արտաթորանքից անջատված բոլոր նմուշներում ցույց է տրվել վիրուսային գեների տրանսկրիպցիոն ակտիվությունը *K196R* գենի օրինակով (նկար 8, 9):



Նկար 9. ԽԱԺ վիրուսի (*Armenia 07) K196R* գենի ԴՆԹ-ի մակարդակները և տրանսկրիպտները՝ *Xeropicta derbentina* փափկամարմինների օրգանիզմում:
Ստուգիչ խմբերում՝ ԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում: կԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում:
* Արժանահավատ է ԴՆԹ-ի մակարդակների համեմատ ($p<0.05$ ըստ Մանն-Ուիթնի *U* թեստի): կԴՆԹ* կոմպլեմենտար դեզօքսիռիբոնուկլեինաթթու: ՀՎՕ** հետվարակային օրեր:



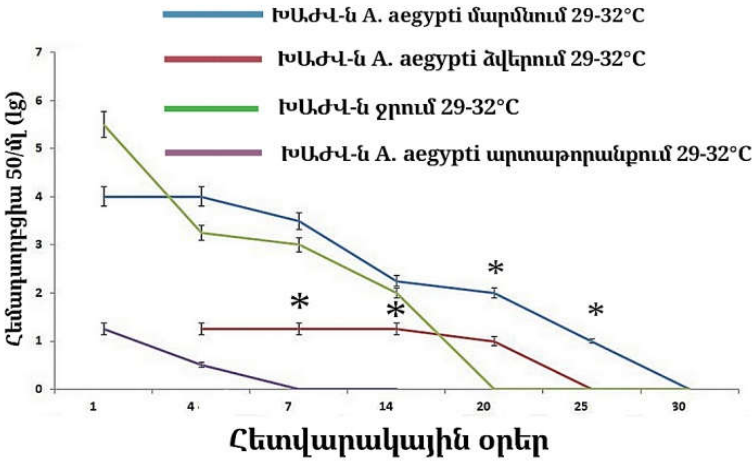
Նկար 10. ԽԱԺ վիրուսի (*Armenia 07) K196R* գենի ԴՆԹ-ի մակարդակները և տրանսկրիպտները՝ *Xeropicta derbentina* փափկամարմիններից զերծ հողում:
Ստուգիչ խմբերում՝ ԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում: կԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում:
* Արժանահավատ է ԴՆԹ-ի մակարդակների համեմատ ($p<0.05$ ըստ Մանն-Ուիթնի *U* թեստի): կԴՆԹ* կոմպլեմենտար դեզօքսիռիբոնուկլեինաթթու: ՀՎՕ** հետվարակային օրեր

Մինչդեռ փափկամարմիններից զերծ հողում ԽԱԺՎ-ի տրանսկրիպցիոն գեների ակտիվություն չի դիտարկվել (նկար 10):

Այնուամենայնիվ, ուսումնասիրվող նմուշներում մենք չենք հայտնաբերել վիրուսի ինֆեկցիոն տիտրերի աճ, չնայած որ վիրուսային գեների տրանսկրիպցիոն ակտիվությունը մշտապես դիտարկվել է մինչև վիրուսի իսպառ անհետացումը (նկար 8, 9):

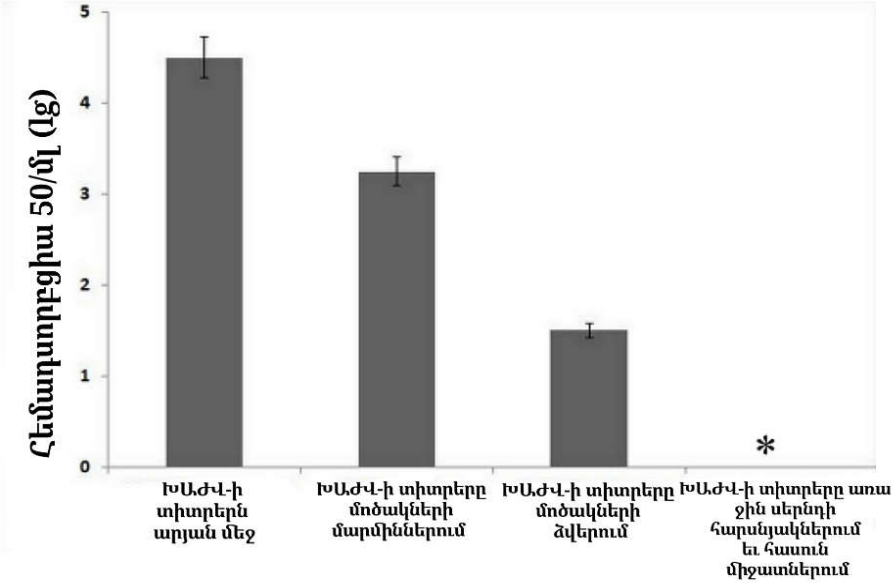
***Aedes aegypti* մոծակների դերը ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայում**

Նկար 11-ում ցույց է տրված, որ էգ մոծակներում կերակրումից հետո վիրուսի հեմադսորբցիոն միավորները ավելի ցածր են (0.5 lg), քան վիրուսի քանակությունը արհեստական սնուցման մեխանիզմից վերցված արյան նմուշում: Սակայն նշված տարբերությունները աննշան են և ոչ արժանահավատ: Այսպիսով, ցույց է տրվել վիրուսի ներթափանցումը մոծակի օրգանիզմ: Հետազոտությունում ուսումնասիրվել է էգ մոծակների խումբ նախքան վերջիններիս ձվադրումը 1-ին և 4-րդ օրերի ընթացքում, ինչպես նաև մեկ այլ խումբ, որոնք ձվադրել են կերակրումից հետո 7-րդ և 10-րդ օրերի ընթացքում:



Նկար 11. ԽԱԺՎ-ի (*Armenia 07)* մակարդակների (lg_{10} $HADUU_{50}$/մլ) նվազումը էգ մոծակների օրգանիզմում, ԽԱԺՎ-ով վարակված շրջակա միջավայրի ջրում՝ առանց մոծակների, և վիրուսով վարակված արյունով կերակրումից հետո արտազատվող հեղուկում՝ ներկայացված հեմադսորբցիոն միավորներով (lg): Մանն-Ուիթնի *U*: P>0.05): Համեմատության համար, որպես ստուգիչ օգտագործվել է վիրուսով վարակված ոչ մանրէազերծ ջուրը, որտեղ վիրուսի չափաբաժինը 5.5 lg_{10} $HADUU_{50}$/մլ է:

ԽԱԺՎ-ը հայտնաբերվել է արյունով սնված բոլոր մոծակներում և ձվերի մեծ մասում (փորձարկվել են 30 ձվերից 27-ը): Մոծակների կերակրման համար նախատեսված արյան մեջ և կերակրումից հետո մոծակների օրգանիզմում վիրուսի քանակության էական տարբերություն չի նկատվել՝ Մանն-Ուիթնի *U*: P>0.05): Ջրային միջավայրում (մոծակներից զերծ) և էգ մոծակների օրգանիզմում վիրուսի մակարդակների համեմատությունը թույլ է տվել բացահայտել, որ էգ մոծակների օրգանիզմում վիրուսը ավելի դանդաղ է ենթարկվում ինակտիվացման: Այնուամենայնիվ, այս տարբերությունները արժանահավատ չեն (նկար 11): Հայտնի է, որ արյունով սնուցումից հետո մոծակները խտացնում են ընդունված արյունը, և ավելորդ հեղուկը արտազատվում է սրբանի (անալ անցքի) միջոցով: Ուսումնասիրվել է նաև այդ արտազատվող հեղուկը և համեմատվել ջրում ԽԱԺՎ-ի գոյատևման ժամանակի հետ: Այսպիսով, ԽԱԺՎ-ի գոյատևման ամբողջ ժամանակը մոծակների օրգանիզմում (հասուն միջատներում և ձվերում) կազմել է 50-60 օր՝ հասուն միջատի դեպքում 35-40 օր, իսկ ձվերում՝ 20-25 օր:

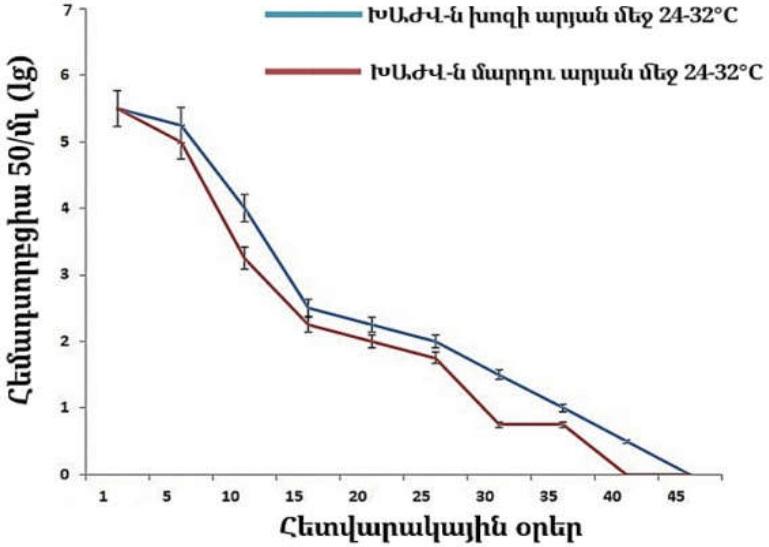


Նկար 12. ԽԱԺՎ-ի (*Armenia 07*) մակարդակները (lg_{10} $HADUU_{50}$/մլ) արյան մեջ, որն օգտագործվել է մոծակների կերակրման համար, մոծակների օրգանիզմում վարակի 10-րդ օրը, և ձվերում՝ *A. aegypti*-ի ձվադրումից հետո 1-ին օրը՝ արտահայտված հեմադսորբցիոն միավորներով (lg): Մանն-Ուիթնի *U*: P>0.05:

Վարակված արյան մեջ, էգ մոծակների օրգանիզմում (վարակումից 10 օր հետո), ձվադրումից անմիջապես հետո ձվերի և 1-ին սերնդի թրթուրներում վիրուսի

մակարդակների համեմատությունը ներկայացված է նկար 12-ում: Հեմադսորբցիոն մեթոդով ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ նոր սերնդի մոծակների օրգանիզմում վարակիչ վիրուսային մասնիկներ չեն հայտնաբերվել:

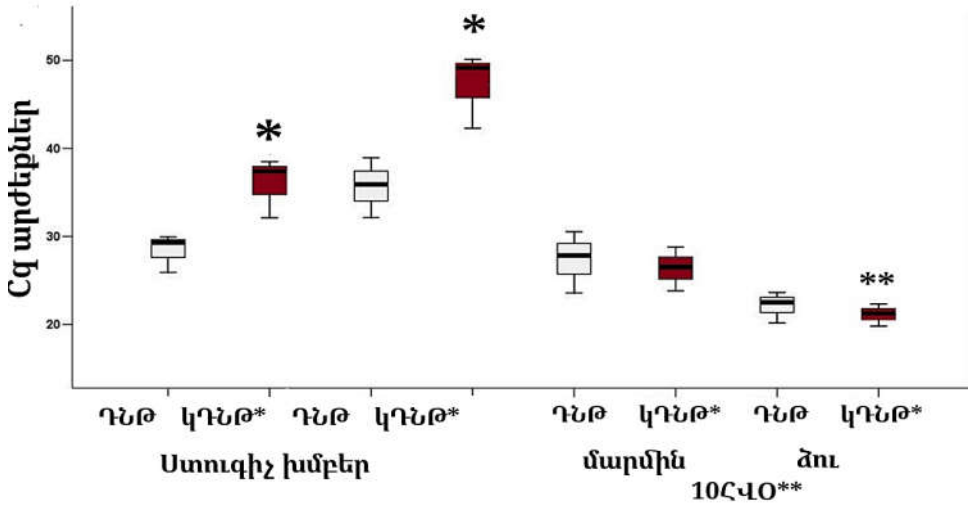
Վիրուսը կարող է պահպանվել նաև մոծակների կողմից կլանած արյան մեջ: Ուստի մենք ներկայացնում ենք տվյալներ մարդկանց և խոզերի արյան մեջ ԽԱԺ վիրուսի գոյատևման վերաբերյալ (նկար 13):



Նկար 13. ԽԱԺՎ-ի (*Armenia 07*) մակարդակների (lg_{10} $HADUU_{50}$/մլ) պահպանումը խոզի և մարդու արյան մեջ:

Ինչպես հետևում է նկար 13-ից, վիրուսը մարդու արյան մեջ կարող է գոյատևել 24-32°C ջերմաստիճանում մոտ 1 ամիս (առավելագույնը՝ 35-40 օր): Այնուամենայնիվ, մարդու և խոզի արյան գոյատևման միջև էական տարբերություն չի դիտարկվել:

Ուսումնասիրվել է նաև ԽԱԺ-ի մի քանի գեների տրանսկրիպցիոն ակտիվությունը (տվյալները ներկայացված են միայն *K196R* գենի համար), սակայն մոծակների մարմիններում և ձվերում տրանսկրիպցիայի որևէ ապացույց չի դիտարկվել (նկար 14):



Նկար 14. ԻԺ-ՔՊՇՌ մեթոդով ԽԱԺՎ-ի (*Armenia 07) K196R* գենի տրանսկրիպցիայի մակարդակները արյունով կերակրված էգ մոծակների օրգանիզմում վարակվելուց հետո 10-րդ օրը և ձվերում՝ *A. aegypti*-ի ձվադրումից հետո՝ 1-ին օրը՝ արտահայտված Cq-ների արժեքներով:
* Արժանահավատ է ԴՆԹ-ի մակարդակների համեմատ (P<0.05 ըստ Մանն-Ուիթնի *U* թեստի):
** Ներկայացված են ԽԱԺՎ-բացասական նմուշներ:
Ստուգիչ խմբերում՝ ԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում: ԿԴՆԹ-ն համապատասխանում է ԹԱՄ-ում 1000 և 10000 ՀՄ 50 մլ-ում:
ԿԴՆԹ* կոմպլեմենտար դեզօքսիռիբոնուկլեինաթթու: ՀՎՕ** հետվարակային օրեր

Այնուհետև ուսումնասիրել ենք խոզերի հնարավոր վարակումը ԽԱԺՎ-ով վարակված մոծակներից բերանային խոռոչով սնման դեպքում: Չնայած 15 օր տևած խոզերի ուսումնասիրություններին (յուրաքանչյուր խոզ սննդի հետ ստացել է 3 մոծակ, որոնք 15 օր առաջ սնվել են վիրուսով վարակված արյունով), խոզերի վիրուսով վարակման դեպքեր չեն գրանցվել: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ԽԱԺ վիրուսի բնական ճանապարհով փոխանցումը խոզերին մոծակների՝ որպես սնունդ ընդունման միջոցով, քիչ հավանական է և կարող է հնարավոր լինել միայն մեծ քանակությամբ կուլ տված միջատների դեպքում:

Հաջորդ սերնդի թրթուրների հետազոտություններում ԻԺ-ՔՊՇՌ մեթոդի կիրառմամբ դիտարկվել են վիրուսային գենոմների հետքային քանակություններ, իսկ հեմադսորբցիոն չափումների ժամանակ վարակիչ մասնիկներ չեն հայտնաբերվել:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսի գենոմի պատճեններն արտաքին միջավայրում մնալուց հետո, առանց կենսաբանական շտեմարանների առկայության, ոսկորներում, ոսկրածուծի և փափուկ հյուսվածքների մնացորդներում պահպանվում են ավելի քան 2 տարի: Նույն պայմաններում չվնասված ոսկորների ոսկրածուծում մոտ 9-10 ամիս անց հայտնաբերվում է վիրուսի ինֆեկցիոն մասնիկների այնպիսի քանակություն, որը բավարար է *in vitro* պայմաններում ալվեոլյար մակրոֆագերը վարակելու համար, սակայն բավարար չէ կենդանի խոզին վարակելու համար:
2. Ոսկրային նյութում և փափուկ հյուսվածքներում, շրջակա միջավայրում և արհեստական գերեզմանոցներում մնալուց հետո ԽԱԺՎ-ը պահպանում է իր վարակելիությունը ոչ ավելի, քան 5-6 ամիս:
3. Վիրուսային գենոմը ավելի լավ պահպանվում է հողի խորը շերտերում՝ ամբողջական դիու թաղման ժամանակ, քան մակերեսային շերտերում: Արհեստական միկրոկլիմայում ԽԱԺՎ-ը պահպանում է իր վարակելիությունը 5-7 տարի՝ -20-30°C սառեցման, *in vitro* և *in vivo* պայմաններում:
4. *Paramecium caudatum* տեսակի թարթիչավորները ԽԱԺ վիրուսի էկոլոգիայում չեն կարող դիտարկվել որպես մեխանիկական կամ կենսաբանական վեկտորներ: Վիրուսի համատեղ կուլտիվացումը *P. caudatum*-ի հետ հանգեցրել է ջրային միջավայրում վիրուսի արագ ինակտիվացմանը և թարթիչավորների պրոլիֆերացիայի ակտիվացմանը:
5. *Dendrobaena alpine* տեսակի անձրևորդերը չեզոք են և չեն թողնում որևէ ազդեցություն ԽԱԺՎ-ի էկոլոգիայի վրա:
6. Ցույց է տրվել ԽԱԺ վիրուսի գենոմային պատճենների և ինֆեկցիոն մասնիկների տրանսօվարիալ փոխանցումը *Aedes aegypti* տեսակի մոծակների մոտ: Վերջիններս կարող են հանդիսանալ մեխանիկական վեկտորներ վիրուսի էկոլոգիայում:
7. Ցույց է տրվել ԽԱԺ վիրուսի երկարատև պահպանումը (և՛ ինֆեկցիոն մասնիկների, և՛ գենոմի պատճենների*) Xeropicta derbentina* տեսակի փափկամարմինների օրգանիզմում և արտաթորանքում: Փափկամարմինները ԽԱԺ վիրուսի էկոլոգիայում կարող են դիտարկվել որպես մեխանիկական վեկտորներ, նաև հնարավոր կենսաբանական վեկտորներ:

ՀՐԱՊԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

1. Arzumanyan H, Hakobyan S, Avagyan H, Izmailyan R, Nersisyan N, Karalyan Z. Possibility of long-term survival of African swine fever virus in natural conditions. // **Vet World**. 2021; 14(4):854-859. doi: 10.14202/vetworld.2021.854-859.

2. Hakobyan SA, Ross PA, Bayramyan NV, Poghosyan AA, Avetisyan AS, Avagyan HR, Hakobyan LH, Abroyan LO, Harutyunova LJ, Karalyan ZA. Experimental models of ecological niches for African swine fever virus. // **Vet Microbiol**. 2022; 266:109365. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.
3. Avagyan H, Mirzoyan A, Mirzoyan F, Izmailyan R, Hakobyan S, Voskanyan H, Semerjyan Z, Avetisyan A, Arzumanyan H, Karalova E, Abroyan L, Hakobyan L, Bayramyan N, Gevorgyan N, Karalyan A, Karalyan Z. New composition of tungsten has a broad range of antiviral activity. // **Antivir Chem Chemother**. 2022; 30:20402066221090061. doi: 10.1177/20402066221090061.
4. Avagyan HR, Hakobyan SA, Poghosyan AA, Bayramyan NV, Arzumanyan HH, Abroyan LO, Avetisyan AS, Hakobyan LA, Karalova EM, Karalyan ZA. African Swine Fever Virus Manipulates the Cell Cycle of G0-Infected Cells to Access Cellular Nucleotides. // **Viruses**. 2022; 14(8):1593. doi: 10.3390/v14081593.
5. Hakobyan S. Alveolar macrophages in main farm animals: a comparative analysis. // Electronic Journal of Natural Sciences. 2022; 38(1):26-29. doi: 10.55841/1728-791X-2022.1.38-26.

АКОПЯН СОНА АРМЕНОВНА

ДЛИТЕЛЬНОЕ ВЫЖИВАНИЕ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: Вирус африканской чумы свиней, инфекционность вируса, выживаемость вируса, трансмиссия вируса, экологические ниши, *Paramecium caudatum, Dendrobaena alpine, Xeropicta derbentina, Aedes aegypti*.

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) является возбудителем высококонтагиозной инфекции свиней, который Всемирная организация здравоохранения животных считает наиболее важным источником смертности домашних свиней во всем мире. Вирус АЧС представляет постоянную угрозу для здоровья животных, безопасности пищевых продуктов, национальной экономики и окружающей среды. Несмотря на большое количество исследований, посвященных вирусу АЧС, до сих пор нет работ, дающих полное представление об эволюции и экологии вируса за пределами сильватического цикла, присутствующего в Африке. Более того, механизмы передачи и персистенции/стабильности вируса четко не прояснены, и существует очень мало исследований по выживанию вируса в окружающей среде.

В данном исследовании мы изучили возможность выживания вируса АЧС (изолят *Armenia 07*) в естественных условиях: в телах мертвых животных, костях, остатках костного мозга, остаточном матриксе органов, а также возможность выживания вируса в биологических системах, таких как беспозвоночные организмы. Также исследовалось влияние беспозвоночных хозяев на экологию вируса вне африканского сильватического цикла и вне известных эндемичных, постоянных резервуаров для вируса.

Наши исследования показали, что после пребывания во внешней среде копии геномов вируса АЧС могут сохраняться более 2 лет в костях, костном мозге и остатках мягких тканей без наличия биологических резервуаров. При тех же условиях через 9-10 месяцев в целых костях с неповрежденным костным мозгом было обнаружено количество инфекционных вирусных частиц, достаточное для

заражения альвеолярных макрофагов *in vitro*, но не достаточно для заражения живой свиньи *in vivo*.

Согласно нашим результатам, в захоронениях, после пребывания во внешней среде и скотомогильниках в костном материале и мягких тканях вирус АЧС сохраняет свою инфекционность не более 5-6 месяцев.

Наблюдения также показали, что вирусный геном лучше сохраняется в глубоких слоях почвы при захоронении тел свиней, чем в поверхностных. В искусственном микроклимате ASFV сохраняет свою инфекционность в течение 5-7 лет при температуре минус -20-30°C как *in vitro*, так и *in vivo*.

Исследования, посвященные возможному влиянию беспозвоночных организмов на экологию вируса АЧС, показали, что цилиаты вида *Paramecium caudatum* не могут рассматриваться как механические или биологические переносчики в экологии вируса. Совместное культивирование вируса с *P. Caudatum* привело к быстрой инактивации вируса в водной среде и активизации пролиферации инфузорий.

Дождевые черви вида *Dendrobaena alpine* нейтральны и не оказывают никакого влияния на экологию вируса АЧС.

Была продемонстрирована трансовариальная передача копий генома вируса АЧС и инфекционных частиц в комарах *Aedes aegypti*. Последние могут рассматриваться как механические переносчики в экологии вируса.

Обнаружена длительная персистенция вируса АЧС (как инфекционных частиц, так и копий генома) в организме и экскрементах моллюсков вида *Xeropicta derbentina*. Данные моллюски могут рассматриваться как механические переносчики, а также как возможные биологические переносчики в экологии вируса.

SONA ARMEN HAKOBYAN

LONG-TERM SURVIVAL OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS IN THE EXTERNAL ENVIRONMENT

SUMMARY

Key words: African swine fever virus, virus infectivity, virus survival, virus transmission, ecological niches, *Paramecium caudatum, Dendrobaena alpine, Xeropicta derbentina, Aedes aegypti*.

The causative agent of the recent epidemic called African swine fever (ASF) is a highly contagious African swine fever virus (ASFV) (*Armenia 07*), which the World Organization for Animal Health ranks as the most important source of mortality in domestic pigs around the world. ASFV constitutes a continuing threat to animal health, food safety, the national economy, and the environment until today. Although there is a large amount of investigation on ASFV, there are still no studies that provide a comprehensive understanding of the evolution and ecology of the virus outside the sylvatic cycle. Moreover, the mechanisms of transmission and persistence/stability of the virus are not clearly clarified, and there are very few studies on the maintenance of the virus in the environment.

In this study, we investigated the possibility of ASFV survival in bodies of dead animals, bones, remnants of bone marrow, residual organ matrix in natural conditions, and the possibility of the virus surviving in biological systems, such as invertebrate hosts and how can the latter's influence the ecology of the virus outside the African sylvatic cycle and already known endemic, persistent reservoirs for the virus.

Our research has shown that after remaining in the external environment genome copies of ASFV can persist for more than 2 years in bones, bone marrow, and soft tissue remnants without the presence of biological reservoirs. At the same conditions, after 9-10 months in complete bones with undamaged bone marrow had been detected such an amount of infectious viral particles, which is sufficient to infect alveolar macrophages *in vitro*, but not sufficient to infect a living pig.

According to our results, in underground conditions after remaining in the external environment and artificial cemeteries in bone material and soft tissues ASFV maintains its infectivity for no more than 5-6 months.

Observations have also made it clear, that the viral genome is better preserved in deep soil layers during complete burial than in surface. In an artificial microclimate, ASFV maintains its infectivity for 5-7 years under -20-30°C freezing conditions, *in vitro* and *in vivo*.

Examinations that were dedicated to possible invertebrate organisms influence on ASFV ecology have shown that ciliates of the species *Paramecium caudatum* cannot be considered as mechanical or biological vectors in the ecology of the virus. Co-cultivation of the virus with *P. caudatum* resulted in rapid inactivation of the virus in the aquatic environment and activation of ciliate proliferation.

Earthworms of the *Dendrobaena alpine* species are neutral and do not have any impact on the ecology of the ASFV.

Transovarial transmission of genomic copies of the ASF virus and infectious particles in *Aedes aegypti* mosquitoes has been demonstrated. The latter can be considered as mechanical vectors in the ecology of the virus.

The long-term persistence of the ASF virus (both infectious particles and genome copies) in the organism and excreta of the mollusc *Xeropicta derbentina* species was detected. Molluscs can be considered as mechanical vectors, as well as possible biological vectors, in the ecology of the virus.