

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-204

**СЛЕПНИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВЕКТОРЫ АРБОВИРУСОВ:
МЕТАГЕНОМИКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСОВ****HORSEFLIES AS POTENTIAL ARBOVIRUS VECTORS: METAGENOMIC SCREENING
AND EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF VIRAL REPLICATION**

А. С. Калянова, М. Н. Гаджикурбанов, А. Г. Литов, Г. Г. Карганова

*Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М. П. Чумакова РАН, Москва*

A. S. Kalyanova, M. N. Gadzhikurbanov, A. G. Litov, G. G. Karganova

*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development
of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow*

✉ annakalyanova@bk.ru

Аннотация

Несмотря на значительный прогресс в изучении виромов кровососущих членистоногих, слепни остаются в целом недостаточно изученными как потенциальные переносчики арбовирусов. Мы собрали несколько видов слепней на территории России и использовали современные метагеномные технологии и традиционные вирусологические методы для обнаружения и изучения новых вирусов. Мы представляем комплексный анализ виромов слепней с использованием интегрированных методов.

Abstract

While virome research of blood-feeding arthropods has progressed significantly, tabanids remain mostly undercharacterized as potential arbovirus vectors. We collected several species of horseflies on Russia's territory and used next-generation metagenomics and traditional virological methods to detect and study novel viruses. We report comprehensive analysis of horsefly viromes using integrated methods.

До настоящего времени виром слепней, обитающих на территории России, не подвергался тщательному анализу, в отличие от виромов комаров и клещей. Высокая численность слепней в отдельных регионах, их характер питания и способность механически переносить патогены, делают слепней интересными объектами для поиска новых вирусов двукрылых, а также вирусов, потенциально опасных для животных и человека.

Целью работы является выявление и попытка изоляции вирусов слепней, собранных в Приморском Крае и Рязанской области.

В работе использовали слепней, принадлежащих родам *Hybomitra*, *Haematopota*, *Chrysops* и *Tabanus*, собранных в Приморском крае и Рязанской области в 2021 г. Особей индивидуально гомогенизировали и гомогенат собирали в пулы, в результате чего из 61 слепня было сформировано 10 пулов. Затем была выделена тотальная РНК и удалена рРНК. Полученный материал был использован для секвенирования на приборе Illumina. Полученные прочтения были отфильтрованы по длине и качеству программой Trimmomatic v0.39. Фильтрованные чтения использовали для сборки конгигтов *de novo* программой SPAdes 3.13.0 (модуль — *rnaviral*). В контигах проводили поиск вирусов с использованием алгоритма *blastn* пакета BLAST v2.9.0+ и базы данных nt. Для вирусов с полной кодирующей последовательностью проводили филогенетический анализ при помощи программы *phyML*.

Чтобы оценить потенциальную способность вирусов к репродукции, использовали клеточные культуры млекопитающих (СПЭВ — клетки почки эмбриона свиньи) и членистоногих (C6/36 — клетки комара *Aedes albopictus*; HAE/CTVM8 — культура клеток клещей *Hyalomma anatolicum*; S2 — клетки плодовой мухи *Drosophila melanogaster*). Отфильтрованной суспензией слепней заражали линии клеток и провели 3 пассажа на СПЭВ и C6/36, затем проверив наличие вирусной РНК с помощью ПЦР. Для культур HAE/CTVM8 и S2 была проведена хроническая инфекция. Замена ростовой среды проводилась еженедельно. Культуральную жидкость, полученную от клеток клещей, проверяли с помощью ПЦР с вирусспецифическими праймерами после 3 недель персистенции, а от клеток мухи — после 6 недель. Результаты ПЦР детектировали с помощью электрофореза в агарозном геле и подтверждали секвенированием полученного ДНК-фрагмента методом Сэнгера.

Анализ проведенного высокопроизводительного секвенирования выявил новый вариант BSRV (Big Sox River virus) и 30 новых вирусных последовательностей. Все они близки к различным РНК-вирусам, обнаружен-

ных другими исследователями в метагеномах насекомых, и родственны семействам *Iflaviridae*, *Soliniviridae*, *Permutotetraviridae*, *Dicistoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Narnaviridae*, *Solemoviridae*, родам *Orthophasmavirus*, *Anphevirus*, группе *Negevirus* и порядку *Ghabrivirales*.

Из 31 вируса нами было детектировано 17 в одной или нескольких клеточных линиях. Из них 15 вирусов детектировались после 3 недель персистенции в культуре клеток клещей НАЕ/СТVM8, 5 — после 6 недель персистенции в культуре клеток плодовой мухи S2, 11 — после 3 пассажей в культуре клеток комаров C6/36 и 9 в культуре клеток млекопитающих СПЭВ. Факт детекции этих вирусов в клетках почки эмбриона свиньи представляет интерес, однако мы считаем, что 3 пассажа недостаточно, чтобы говорить об их потенциальной патогенности для позвоночных.

Проделанная работа описывает биоразнообразие вирусов в слепнях из различных регионов России, а также расширяет современные представления о вирусном разнообразии у кровососущих двукрылых. В ходе исследования мы подошли к вопросу изоляции и характеристики вирусов комплексно, используя широкий спектр клеточных культур как членистоногих, так и млекопитающих. Применение различных клеточных линий создало основу для последующего изучения механизмов межвидовой передачи выявленных вирусов.