

## Опыт применения полимеразной цепной реакции при диагностике вируса лейкоза крупного рогатого скота и ее эффективность на разных этапах проведения оздоровительных мероприятий

М. В. Петропавловский<sup>1</sup>, Н. А. Безбородова<sup>1✉</sup>, А. С. Романова<sup>1</sup>, А. В. Лысов<sup>1</sup>, В. В. Кожуховская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

✉ E-mail: n-bezborodova@mail.ru

**Аннотация.** Научная новизна. В статье собраны и изложены материалы многолетнего труда по применению ПЦР-диагностики совместно с серологическими методами (РИД, ИФА) в изучении типов вируса лейкоза крупного рогатого скота разных физиологических групп, а также на опытных животных (кролики, мелкий рогатый скот). Целью исследований стала оценка метода ПЦР с определением эффективности данной диагностической реакции в выявлении вируса лейкоза крупного рогатого скота. Методы. Биоматериалы (кровь, молозиво) от крупного рогатого скота для проведения ПЦР-исследований были получены из 20 сельскохозяйственных организаций Тюменской, Челябинской, Курганской областей и Республики Башкортостан. Всего было исследовано методом ПЦР 1269 биопроб крови и 36 проб молозива. Лабораторные методы (РИД, ИФА, ПЦР) применялись в ранней диагностике вируса лейкоза на молодняке крупного рогатого скота, а также в диагностике взрослого поголовья. Результаты. ПЦР позволила выявлять телят-вирусоносителей BLV в возрасте от 15 дней до 1 месяца среди молодняка в оздоравливаемых от лейкоза стадах, что значительно уменьшило сроки проведения оздоровительных мероприятий (в среднем на 20 %). Было выяснено, что при серологическом обследовании новорожденных телят на наличие антител к BLV могут быть получены ложные результаты вследствие влияния высокой концентрации материнских антител и развития иммунологической толерантности. ПЦР-исследования биоматериала (1023 проб), взятого от взрослого поголовья крупного рогатого скота (коровы 3–4, 6 лет) показали, что в 52 % образцов присутствовал вирус лейкоза, что подтверждалось серологическими исследованиями. В комплексе с РИД-, ИФА-методами ПЦР позволяет контролировать результаты серологических исследований и выявлять латентные формы BLV. Доказано, что при проведении ИФА и ПЦР выявляется дополнительно до 20 % вирусоносителей из числа РИД-негативных животных. Установлено существование отдельных генетических вариантов BLV, которые невозможно выявить при проведении серологических исследований, но с этим без труда справляется ПЦР. В работе рассматриваются разные виды ПЦР, применяемые при диагностике лейкоза, описываются полученные данные по проводимым экспериментам искусственно зараженных вирусом лейкоза животных.

**Ключевые слова:** вирус лейкоза, крупный рогатый скот, BLV, ПЦР-диагностика, иммунологическая толерантность, вирусоносительство, типы вируса.

**Для цитирования:** Безбородова Н. А., Петропавловский М. В., Романова А. С., Лысов А. В., Кожуховская В. В. Опыт применения полимеразной цепной реакции при диагностике вируса лейкоза крупного рогатого скота и ее эффективность на разных этапах проведения оздоровительных мероприятий // Аграрный вестник Урала. 2019. № 12 (191). С. 52–59. DOI: ...

**Дата поступления статьи:** 01.10.2019.

### Постановка проблемы (Introduction)

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV) – инфекционное заболевание, вызванное РНК-содержащим вирусом семейства *Retroviridae*, рода *Deltaretrovirus*. В Российской Федерации BLV длительное время занимает лидирующие позиции [2, с. 22; 3, с. 362, 5 с. 50].

Экономический ущерб для отрасли животноводства, вызванный заболеванием, достаточно существенен и тяжело поддается подсчету. В большинстве своем, он обусловлен потерями молочной продуктивности животных,

а также ограничениями, связанными с реализацией молока, мяса и племенного молодняка. Потери обусловлены также преждевременной выбраковкой, затратами на утилизацию туш и органов животных и проведением ветеринарно-санитарных и зоотехнических мероприятий. Кроме того, заболевание вызывает у животных иммунодепрессию, что обуславливает возникновение рисков развития других патологий как инфекционного, так и неинфекционного характера, включая патологии репродуктивной системы [3, с. 362; 4, с. 86; 7, с. 55].

Кроме того, в некоторой степени снижено качество молочной и мясной продукции, полученной от инфицированных животных. Данное обстоятельство обусловлено изменениями физико-химических показателей, в том числе снижением более чем на 40 % уровня аминокислотного состава, содержания белка, лактозы, казеина. Молоко является несъедобным по составу и технологическим свойствам. Установлено, что такая продукция является потенциально опасной для человека ввиду накопления обладающих канцерогенными свойствами метаболитов возбудителя при прогрессировании лейкозного процесса у инфицированных коров [6, с. 36; 9, с. 14].

Особенностью данного возбудителя является способность синтезировать вирусспецифическую ДНК на матрице геномной РНК ретровируса с помощью фермента РНК-зависимой ДНК – полимеразы (ревертазы). Результатом этого является встраивание генетически чужеродного материала в таргетные клетки хозяина. В связи с этим возбудитель лейкоза имеет тенденцию к длительной персистенции в организме животного без видимых клинических проявлений [2, с. 22; 8, с. 204; 12, с. 315].

Основной путь передачи BLV парентеральный. Вирус развивается прежде всего в иммунокомпетентных клетках, приводя к развитию иммунодефицитных состояний у животных. Согласно проведенным исследованиям, передача вируса происходит от восприимчивого животного горизонтальным и вертикальным путями. Вертикальная передача возбудителя обусловлена активным развитием инфекции в организме матери, трансплацентарное инфицирование телят при этом достигает 5–8 %. Установлено, что при дальнейшем содержании таких животных при первом серологическом диагностическом скрининге количество инфицированных животных в группе увеличивается до 30 % и более [2, с. 23; 5, с. 51; 13, с. 8948].

Тривиальная лабораторная диагностика лейкоза включает в себя различные методы, такие как серологические (РИД, ИФА), гематологические и гистологические. В настоящее время наиболее информативным методом диагностики лейкоза крупного рогатого скота является молекулярно-биологический метод – полимеразная цепная реакция (ПЦР) [1, с. 29; 7, с. 56]. Высокая специфичность метода обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент провируса лейкоза. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов. Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью, дающей возможность обнаружить единичные фрагменты вирусных нуклеиновых кислот [1, 3, 15]. Методы тривиальной диагностики, такие как РИД, ИФА, не обеспечивают полного обнаружения всех инфицированных животных, это касается в том числе и молодняка крупного рогатого скота до 4–6-месячного возраста. Определено влияние колострального иммунитета на результаты серологических исследований молодняка крупного рогатого скота, которое обусловлено появлением ложноположительных результатов. С учетом данного обстоятельства в настоящее время ПЦР применима для идентификации инфицированных животных с 15-днев-

ного возраста. Метод ПЦР также особенно эффективен при выявлении заболевания животных с низким титром иммуноглобулинов (антител) в сыворотке крови [2, с. 23; 3, с. 364; 6, с. 36; 9, с. 15].

Кроме того, ПЦР дает возможность проводить типизацию инфекционных агентов, что, в свою очередь, открывает возможности изучения генетической структуры вируса лейкоза, а так же его распространенности в зависимости от географических областей [8, с. 205].

Иностранные ученые не исключают взаимосвязь между инфицированием отдельными генетическими вариантами ВЛКРС и тяжестью патологического процесса, развитием клинических симптомов болезни или гуморального иммунного ответа [12, с. 315].

Постоянный мониторинг генотипов с высокой антигенной изменчивостью позволяет совершенствовать диагностические тест-системы путем подбора специфичных праймеров для консервативных фрагментов генома возбудителя, что особенно актуально при диагностике лейкоза [8].

**Цель исследований** – дать оценку метода ПЦР и определить эффективность данной диагностической реакции в выявлении вируса лейкоза крупного рогатого скота на различных этапах осуществления оздоровительных противолейкозных программ, а также при постановке экспериментальных опытов для научно исследовательских целей.

#### Методология и методы исследования (Methods)

Работа проведена в лаборатории лейкоза отдела мониторинга и прогнозирования инфекционных болезней ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН. Исследования проведены в рамках направления 160 Программы ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 гг. по теме «Разработка теоретических основ для создания и внедрения программы мониторинга, диагностики, лечебно-профилактических и оздоровительных мероприятий по защите животных от эпизоотически значимых инфекционных болезней» № 0773-2019-0001.

Объект исследования – телята (возраст от 15 дней до 1 месяца), коровы (3–4, 6 лет), мелкий рогатый скот, кролики.

Биоматериалы (кровь, молозиво) от крупного рогатого скота для проведения ПЦР-исследований были получены из 20 сельскохозяйственных организаций Тюменской, Челябинской, Курганской областей и Республики Башкортостан. Всего было исследовано методом ПЦР 1269 биопроб крови и 36 проб молозива.

Дополнительно были проведены эксперименты с искусственным заражением вирусом лейкоза мелкого рогатого скота и кроликов в условиях вивария.

Выделение провируса лейкоза из крови крупного рогатого скота и постановку ПЦР проводили в соответствии с инструкциями производителя по применению тест-систем. В работе использовали набор реагентов для выделения ДНК Diatom DNA Prep 200 ООО «ИзоГен» (Россия).

Выделение в пробах специфического участка вируса лейкоза крупного рогатого скота проводили с использованием различных коммерческих тест-систем рос-

сийского производства, а также с подбором специфических праймеров (набор для амплификации ДНК Bovine leukemia virus GenPak DNA PCR Test BLV ООО «ИзоГен» (Россия), тест-система «Лейкоз» для выявления вируса лейкоза КРС методом ПЦР с ЭФ детекцией результатов (ИнтерЛабСервис, Россия), тест-система «Лейкоз» для выявления вируса лейкоза КРС методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации в реальном времени (ИнтерЛабСервис, Россия)).

Амплификацию проводили с использованием термоциклера Applied Biosystems 2720 (Сингапур). Исследования в режиме реального времени проводили с применением амплификатора Rotor-Gene 3000 (Австралия). Учет полученных данных осуществляли методом горизонтального электрофореза с применением 1,5-процентного агарозного геля с добавлением бромистого этидия в качестве интеркалирующего красителя для ДНК. В работе применяли оборудование: мини-камера Mini-Sub Cell GT производства компании Bio-Rad (США) с визуализацией под ультрафиолетовым излучением, камера Bio-Rad Chemidoc XRS+ (США).

### Результаты (Results)

Проведенные ПЦР-исследования в течение 5 лет позволили выявлять телят-вирусоносителей BLV в возрасте от 15 дней до 1 месяца. Инфицирование вирусом лейкоза данных животных предположительно происходило в период внутриутробного развития плода. Данный метод позволил проводить раннее выявление латентных вирусоносителей среди молодняка в оздоравливаемых от лейкоза стадах, что значительно уменьшило сроки проведения оздоровительных мероприятий (в среднем на 20 %).

Установлено, что при серологическом обследовании новорожденных телят на наличие антител к BLV может быть получен ложноположительный или ложноотрицательный результат не только вследствие влияния высокой концентрации материнских антител класса IgG (маскируют наличие IgM у телят), но и развития иммунологической толерантности – неспособности организма к иммунному ответу на определенный антиген. Сроки ее формирования варьируют от нескольких часов до нескольких суток, а ее длительность зависит от персистенции антигена в организме и скорости образования иммунокомпетентных клеток из их предшественников. Индукции толерантности способствует неспецифическая иммунодепрессия (в том числе под влиянием лекарственных препаратов).

Нами проводилось также исследование методом ПЦР и взрослого поголовья крупного рогатого скота (коровы 3–4, 6 лет). За весь период исследований из числа поступившего в лабораторию ПЦР биоматериала (1023 пробы) фрагмент генома возбудителя лейкоза был идентифицирован в 52 % образцов крови. Полученные данные подтверждались серологическими исследованиями (РИД, ИФА).

Проведенными комплексными лабораторными исследованиями было установлено, что при диагностике коров 4–5 лет в оздоравливаемых фермах с низким процентом инфицированных животных (менее 10 %) оправдано применение ПЦР-исследования в комплексе с

РИД и ИФА. ПЦР как более чувствительный метод диагностики позволяет контролировать результаты серологических исследований и выявлять латентные формы BLV. Многочисленными исследованиями доказано, что при проведении ИФА и ПЦР выявляется дополнительно до 20 % вирусоносителей из числа РИД-негативных животных. Это обстоятельство обусловлено более высоким пределом чувствительности реакций. При помощи ПЦР доступно выявление вирусоносителей независимо от титра антител у животных в начальной стадии заболевания, а также возможно подтверждение сомнительных результатов серологических исследований.

Дополнительное выявление инфицированных животных методом ПЦР обусловлено также и антигенным пейзажем возбудителя. Установлено существование отдельных генетических вариантов BLV, которые имеют определенные аминокислотные замены в эпитопах белка gp51 и показывают серонегативный результат по РИД и ИФА-исследованиям. Данные измененные генетические варианты лейкоза, которые невозможно выявить при проведении серологических исследований, были найдены у 7,5 % инфицированных животных.

ПЦР-исследования проводились двумя методами с помощью Real-Time PCR и электрофоретической детекции полученных продуктов ПЦР-амплификации (рис. 1, 2).

Представленные методы детекции различны, но при этом в ходе исследований хорошо дополняют друг друга. Электрофоретическая детекция позволяет осуществлять только качественный анализ, в диагностике BLV, дает возможность провести генотипирование изолятов с применением методов рестрикции ДНК. Real-Time PCR создает возможность совмещения детекции и количественного определения специфической последовательности ДНК в образце в реальном времени после каждого цикла амплификации. Для этого используют флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

ПЦР-диагностика использовалась и при исследовании лабораторных животных и клеточных культур. Так, в биопробах крови мелкого рогатого скота при помощи ПЦР был обнаружен специфичный участок возбудителя лейкоза, но у кроликов, экспериментально зараженных кровью инфицированных коров, результаты, полученные методом ПЦР, не подтвердили наличие вируса лейкоза КРС.

Дополнительно были проведены исследования проб молозива от РИД (+) и гематологически больных животных в количестве 10 проб методом ПЦР. Предполагается, что молозиво от инфицированных животных играет определенную роль в распространении заболевания среди восприимчивого поголовья крупного рогатого скота, так как данный биологический материал может содержать большое количество соматических клеток, что увеличивает вероятность передачи возбудителя лейкоза от инфицированного восприимчивому животному. Имеются различные мнения о действии низкой температуры и глубокой заморозки на жизнеспособность вируса. Согласно нашим результатам исследований, в об-

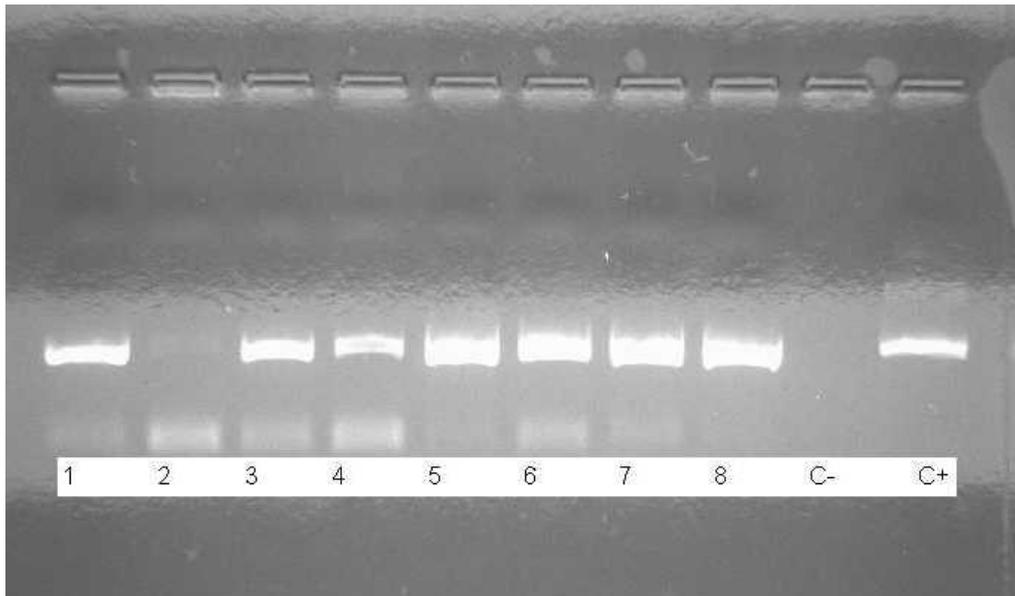


Рис. 1. Электрофореграмма определения размеров амплифицируемых фрагментов: пробы 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (специфические полосы на уровне контроля плюс) являются BLV-положительными; проба 2 (отсутствие специфической полосы на уровне контроля плюс) не содержит ДНК BLV, отрицательная; C<sup>+</sup> – положительный контрольный образец ДНК BLV; C<sup>-</sup> – отрицательный контрольный образец  
 Fig. 1. Electrophoretogram: sample 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (a specific band on the level of control plus) are BLV positive; sample 2 (no specific band on the level of control plus) does not contain BLV DNA negative; C<sup>+</sup> is a positive control sample DNA of BLV; C<sup>-</sup> is a negative control sample

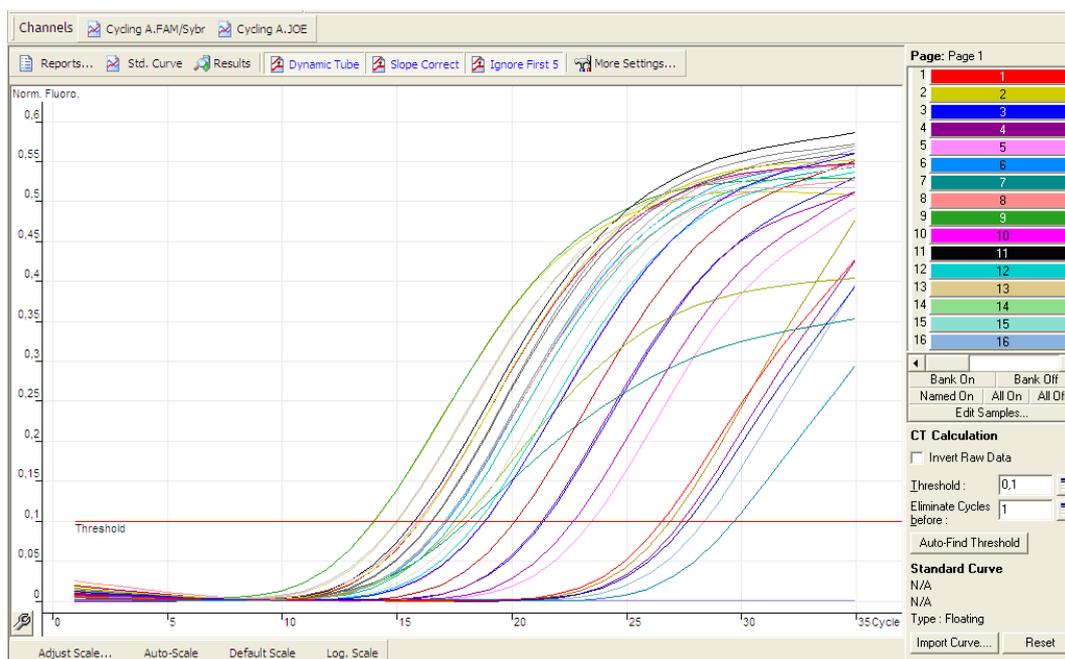


Рис. 2. Детекция продуктов амплификации на приборе Rotor-Gene 3000 и анализ специфического участка ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота по каналу Joe/Yellow  
 Fig. 2. Detection of amplification products on the Rotor-Gene 3000 device and analysis of a specific phase of bovine leukemia virus DNA via the Joe/Yellow channel

разцах лейкоцитарной взвеси, полученной из молозива, был определен фрагмент генома возбудителя лейкоза крупного рогатого скота. Данные образцы были заморожены при  $-20^{\circ}\text{C}$  и использовались для инфицирования (внутрибрюшинное заражение) исследуемых животных (мелкий рогатый скот). При дальнейших ежемесячных серологических (РИД, ИФА) и молекулярно-генетических (ПЦР) исследованиях животных были получены отрицательные результаты, это могло быть связано с

низким содержанием вируса в организме или с тем, что образцы были изначально заморожены при  $-20^{\circ}\text{C}$  и это обстоятельство могло повлиять на ход эксперимента. Для определения всех факторов требуются дополнительные исследования. Однако можно предположить, что способность возбудителя вызывать активное инфицирование данным биологическим материалом восприимчивого организма снижается в результате снижения вирулентности микроорганизма при заморозке.

Что же касается коров, у которых выявили зараженное молозиво, то они по всем тестам (РИД, ИФА, ПЦР) были вирусоносителями. Изолированные от этих коров телята с первых дней жизни получали молозиво от здоровых коров. При ПЦР-исследовании через месяц только у одного теленка был обнаружен в крови возбудитель лейкоза, что, в свою очередь, было подтверждено и серологическими исследованиями. Вероятно, теленок был заражен вирусом лейкоза крупного рогатого скота внутриутробно и оставался до определенного периода скрытым носителем BLV-инфекции.

#### Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Представленные данные говорят о возможности широкого применения лабораторного метода ПЦР в идентификации возбудителя вируса лейкоза крупного рогатого скота разных физиологических групп, в исследовании различных биологических материалов от животных и как дополнительный метод при выполнении научных исследований. В настоящее время практическое применение реакции ПЦР осуществляется на различных этапах выполнения оздоровительных противолейкозных программ.

Возможности ПЦР-реакции позволяют довыявлять инфицированных, но серонегативных животных, телят в 15-дневном возрасте, проводить научные исследования по генотипированию изолятов, осуществлять оценку клеточных культур. Также генетически обусловленная серонегативность вируса лейкоза крупного рогатого скота не дает возможности проводить анализ стандартными серологическими методами, а при исследовании методом ПЦР обеспечивается положительный результат.

Однако, несмотря на положительный опыт применения ПЦР, зачастую на этапе анализа и интерпретации результатов ПЦР возникают проблемы, которые можно обозначить как несовпадение результатов при использовании различных методов исследования (например, ПЦР и ИФА, ПЦР). Одним из факторов несовпадения данных ПЦР и ИФА является зависимость результатов анализа методом ПЦР от концентрации матричной ДНК в объеме биоматериала, при этом возможности интерпретации результатов тест-системы задаются копийностью ДНК. Также получение ложноотрицательных результатов при ПЦР-исследовании может быть связано с точечными нуклеотидными заменами в участках генома возбудителя лейкоза в местах посадки праймеров.

На сегодняшний день метод ПЦР имеет огромное научное и прикладное значение, с его помощью были реализованы масштабные исследования в области изучения антигенного пейзажа возбудителя лейкоза крупного рогатого скота. Накопленная за этот период информация позволила сформировать принципиально новый подход к комплексному обследованию поголовья при проведении оздоровительных мероприятий и определить альтернативные усовершенствованные варианты проведения противоэпизоотических мероприятий с учетом их особенностей генотипа и популяционной принадлежности. Итак, с момента возникновения идеи многократного увеличения числа копий искомой молекулы ДНК прошло сравнительно немного времени, тем не менее технология ПЦР совершила гигантский рывок и стала неотъемлемой частью рутинной лабораторной практики, продолжая при этом совершенствоваться и развиваться.

#### Библиографический список

1. Ахмедов Р. Б., Смазнова И. А., Заякин В. В., Нам И. Я. Разработка метода полимеразной цепной реакции в реальном времени для диагностики вируса лейкоза КРС // Инновационные агробiotехнологии в животноводстве и ветеринарной медицине: материалы I Евразийской научно-практической конференции. Санкт-Петербург, 2015. С. 29–31.
2. Безбородова Н. А., Кожуховская В. В. Значение молекулярно-биологических методов исследования для диагностики инфекционных болезней крупного рогатого скота // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2018. №4 (40). С. 22–25.
3. Донник И. М., Шкуратова И. А. Молекулярно-генетические и иммунно-биохимические маркеры оценки здоровья сельскохозяйственных животных // Вестник Российской академии наук. 2017. Т. 87. № 4. С. 362–366. DOI: 10.7868/S0869587317040132.
4. Верещак Н. А., Порываева А. П., Красноперов А. С., Опарина О. Ю. Прогностическое значение оценки структурного состава клеточного звена иммунитета у телят в постнатальном периоде // Современные проблемы ветеринарной патологии и биотехнологии в агропромышленном комплексе: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 95-летию РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелесского». Минск, 2017. С. 85–89.
5. Захарова Ю. Н., Ланец О. В. Оценка лабораторных методов диагностики лейкоза КРС и анализ экономического ущерба // Научный диалог: Молодой ученый: сборник научных трудов по материалам III международной научной конференции. Санкт-Петербург, 2017. С. 50–52.
6. Кузнецова Т. В., Кузнецов А. А., Кириллова С. В. Технический регламент ТС «О безопасности молока и молочной продукции» и экономические аспекты его реализации молочными товаропроизводителями России // Агропродовольственная политика России. 2015. № 12 (48). С. 35–38.
7. Порываева А. П., Печура Е. В., Вялых И. В., Томских О. Г., Бусыгина Н. С. Методы клинико-лабораторной диагностики острых респираторных вирусных инфекций у крупного рогатого скота // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2017. № 3. С. 55–58.
8. Сатдарова Д. Г. Оздоровление хозяйств от лейкоза КРС // В мире научных открытий: материалы IV Всероссийской студенческой научной конференции (с международным участием). Ульяновск, 2015. С. 204–207.

9. Свириденко Г. М. Проблема безопасности молочных продуктов в связи с лейкозом крупного рогатого скота // Молочная промышленность. 2017. № 8. С. 13–16.

10. Шкуратова И. А., Донник И. М., Исаева А. Г., Кривоногова А. С. Экологический мониторинг аграрных предприятий среднего Урала // Зоотехническая наука в условиях современных вызовов: сборник статей научно-практической конференции с международным участием, посвященной 85-летию со дня рождения академия Л. К. Эрнста и 80-летию подготовки зоотехников в Вятской государственной сельскохозяйственной академии. Киров, 2015. С. 444–448.

11. Donnik I. M., Krivonogova A. S., Petropavlovskiy M. V., Shkuratova I. A., Rola-Luszczak M., Kuzmak J. Revisiting the issue of the molecular-genetic structure of the causative agent of the bovine leukemia virus in the Russian Federation. *Indian Journal of Science and Technology*. 2016. V. 9. No. 42. Article number 104253.

12. Donnik I., Vafin R., Galstyan A., Krivonogova A., Shaeva A., Gilmanov Kh., Karimova R., Tyulkin S., Kuźmak Ja. Genetic identification of bovine leukaemia virus // *Foods and Raw Materials*. 2018. V. 6. No. 2. Pp. 314–324. DOI: 10.21603/2308-4057-2018-2-314-324.

13. De Brogniez A., Bouzar A. B., Jacques J. R. [et al.] Mutation of a Single Envelope N-Linked Glycosylation Site Enhances the Pathogenicity of Bovine Leukemia Virus // *J. Virology*. 2015. V. 89 (17). Pp. 8945–8956.

14. Petropavlovskiy M. V., Vereshchak N. A., Bezborodova N. A., Oparina O. Yu. Immuno-biological evaluation of individual genetic variants of bovine leukemia virus in the conditions of the Ural region // *Digital agriculture – development strategy: proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019)*. Advances in Intelligent Systems Research. Ekaterinburg, 2019. Pp. 372–377.

#### Об авторах:

Максим Валерьевич Петропавловский<sup>1</sup>, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории лейкоза, ORCID 0000-0002-9892-6092, AuthorID 676746; *petropavlovsky\_m@mail.ru*

Наталья Александровна Безбородова<sup>1</sup>, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологических и молекулярно-генетических методов диагностики, ORCID 0000-0003-2793-5001, AuthorID 665979; *n-bezborodova@mail.ru*

Алиса Сергеевна Романова<sup>1</sup>, кандидат технических наук, старший научный сотрудник лаборатории лейкоза, ORCID 0000-0003-0189-2963, AuthorID 762742; *alistic\_kolotova@mail.ru*

Алексей Викторович Лысов<sup>1</sup>, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, заведующий отделом ветеринарно-лабораторной диагностики с испытательной лабораторией, ORCID 0000-0002-3619-6899, AuthorID 665874; *info@urnivi.ru*

Вероника Владимировна Кожуховская<sup>1</sup>, аспирант, лаборант лаборатории микробиологических и молекулярно-генетических методов диагностики, ORCID 0000-0001-7924-6844, AuthorID 1002627; *tetramegon@yandex.ru*

<sup>1</sup> Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

## Experience in the use of polymerase chain reaction in the diagnosis of bovine leukemia virus and its effectiveness at different stages of health activities

M. V. Petropavlovskiy<sup>1</sup>, N. A. Bezborodova<sup>1</sup>✉, A. S. Romanova<sup>1</sup>, A. V. Lysov<sup>1</sup>, V. V. Kozhukhovskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre of Ural Branch of the Russian Academy of Science, Ekaterinburg, Russia

✉ E-mail: *n-bezborodova@mail.ru*

**Abstract. Scientific novelty.** The article presents the materials of long-term work on the use of PCR diagnostics together with serological methods (rid, ELISA) in the study of bovine leukemia virus of various physiological groups, as well as experimental animals (rabbits, small cattle). **The aim of the study** was to evaluate the PCR method in the diagnosis of bovine leukemia virus. **Methods.** Biomaterials (blood, colostrum) from cattle for PCR studies were obtained from 20 agricultural organizations of Tyumen, Chelyabinsk, Kurgan regions and the Republic of Bashkortostan. A total of 1,269 blood samples and 36 colostrum samples were examined by PCR. Laboratory methods (rid, ELISA, PCR) were used in the early diagnosis of leukemia virus in young cattle, as well as in the diagnosis of adult livestock. **Results.** The results obtained by PCR revealed carriers of the Lekota virus in calves aged 15 days to 1 month among young animals, which significantly reduced the duration of recreational activities (an average of 20 %). It was established that serological examination of newborn calves for the presence of antibodies to leukemia virus can give false results due to the influence of high concentrations of maternal antibodies and the development of immunological tolerance. PCR studies of biomaterial (samples 1023), taken from adult cattle (cows 3–4, 6 years), showed that 52 % of the samples were present leukemia virus, which was confirmed by serological studies. It is proved that up to 20 %

of virus carriers from the number of rid-negative animals are detected during ELISA and PCR. Some types of BLV leukemia can not be detected by serological studies, but easily cope with PCR. The article deals with various types of PCR used in the diagnosis of leukemia, describes the data obtained from experiments on artificially infected animals with leukemia virus.

**Keywords:** leukemia virus, cattle, cows, PCR diagnostics, immunological tolerance, virus transmission, virus types.

**For citation:** Petropavlovskiy M. V., Bezborodova N. A., Romanova A. S., Lysov A. V., Kozhukhovskaya V. V. Opyt primeneniya polimeraznoy tsepnoy reaktsii pri diagnostike virusa leykoza krupnogo rogatogo skota i eye effektivnost' na raznykh etapakh provedeniya ozdorovitel'nykh meropriyatii [Experience in the use of polymerase chain reaction in the diagnosis of bovine leukemia virus and its effectiveness at different stages of health activities] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2019. No. 12 (191). Pp. 52–59. DOI: ... (In Russian.)

**Paper submitted:** 01.10.2019.

### References

1. Akhmedov R. B., Smaznova I. A., Zayakin V. V., Nam I. Ya. Razrabotka metoda polimeraznoy tsepnoy reaktsii v real'nom vremeni dlya diagnostiki virusa leykoza KRS [Development of real-time polymerase chain reaction method for diagnosis of cattle leukemia virus] // Innovatsionnyye agrobiotekhnologii v zhivotnovodstve i veterinarnoy meditsine: materialy I Evraziyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Saint Petersburg, 2015. Pp. 29–31.
2. Bezborodova N. A., Kozhukhovskaya V. V. Znachenie molekulyarno-biologicheskikh metodov issledovaniya dlya diagnostiki infektsionnykh bolezney krupnogo rogatogo skota [The Importance of molecular biological research methods for the diagnosis of infectious diseases of cattle] // Aktual'nyye voprosy veterinarnoy biologii. 2018. No. 4 (40). Pp. 22–25.
3. Donnik I. M., Shkuratova I. A. Molekulyarno-geneticheskiye i immuno-biokhimicheskiye markery otsenki zdorov'ya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh [Molecular-genetic and immune-biochemical markers of evaluation of health of farm animals] // Vestnik Rossiyskoy akademii nauk. 2017. T. 87. No. 4. Pp. 362–366. DOI: 10.7868/S0869587317040132.
4. Vereshchak N. A., Poryvayeva A. P., Krasnoperov A. S., Oparina O. Yu. Prognosticheskoye znachenie otsenki strukturnogo sostava kletochnogo zvena immuniteta u telyat v postnatal'nom periode [Prognostic value of estimation of structural structure of cellular immunity in calves in the postnatal period] // Sovremennyye problemy veterinarnoy patologii i biotekhnologii v agropromyshlennom komplekse: materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 95-letiyu RUP "Institut eksperimental'noy veterinarii imeni S. N. Vyshel'skogo". Minsk, 2017. Pp. 85–89.
5. Zakharova Yu. N., Lanets O. V. Otsenka laboratornykh metodov diagnostiki leykoza KRS i analiz ekonomicheskogo ushcherba [Evaluation of laboratory methods of diagnosis of bovine leukemia and analysis of economic damage] // Nauchnyy dialog: Molodoy uchenyy: sbornik nauchnykh trudov po materialam III mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii. Saint Petersburg, 2017. Pp. 50–52.
6. Kuznetsova T. V., Kuznetsov A. A., Kirillova S. V. Tekhnicheskyy reglament TS "O bezopasnosti moloka i molochnoy produktsii" i ekonomicheskkiye aspekty ego realizatsii molochnymi tovaroproizvoditelyami Rossii [Technical regulations of the CU "About safety of milk and dairy products" and economic aspects of its implementation by dairy producers of Russia] // Agroprodovol'stvennaya politika Rossii. 2015. No. 12 (48). Pp. 35–38.
7. Poryvayeva A. P., Pechura E. V., Vyalykh I. V., Tomskikh O. G., Busygina N. S. Metody kliniko-laboratornoy diagnostiki ostrykh respiratornykh virusnykh infektsiy u krupnogo rogatogo skota [Methods of clinical and laboratory diagnostics of acute respiratory viral infections in cattle] // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii. 2017. No. 3. Pp. 55–58.
8. Satdarova D. G. Ozdorovleniye khozyaystv ot leykoza KRS KRS [Improvement of farms from leukemia of cattle] // V mire nauchnykh otkrytiy: materialy IV Vserossiyskoy studencheskoy nauchnoy konferentsii (s mezhdunarodnym uchastiyem). Ul'yanovsk. 2015. Pp. 204–207.
9. Sviridenko G. M. Problema bezopasnosti molochnykh produktov v svyazi s leykozom krupnogo rogatogo skota [The problem of safety of dairy products in connection with leukemia of cattle] // Molochnaya promyshlennost'. 2017. No. 8. Pp. 13–16.
10. Shkuratova I. A., Donnik I. M., Isayeva A. G., Krivonogova A. S. Ekologicheskyy monitoring agrarnykh predpriyatii srednego Urala [Ecological monitoring of agricultural enterprises of the Middle Urals] // Zootekhnicheskaya nauka v usloviyakh sovremennykh vyzovov: sbornik statey nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem, posvyashchennoy 85-letiyu so dnya rozhdeniya akademiya L. K. Ernsta i 80-letiyu podgotovki zootekhnikov v Vyatskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii. Kirov, 2015. Pp. 444–448.
11. Donnik I. M., Krivonogova A. S., Petropavlovskiy M. V., Shkuratova I. A., Rola-Łuszczak M., Kuzmak J. Revisiting the issue of the molecular-genetic structure of the causative agent of the bovine leukemia virus in the Russian Federation. Indian Journal of Science and Technology. 2016. V. 9. No. 42. Article number 104253. DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i42/104253.
12. Donnik I., Vafin R., Galstyan A., Krivonogova A., Shaeva A., Gilmanov Kh., Karimova R., Tyulkin S., Kuźmak Ja. Genetic identification of bovine leukaemia virus // Foods and Raw Materials. 2018. V. 6. No. 2. Pp. 314–324. DOI: 10.21603/2308-4057-2018-2-314-324.
13. De Brogniez A., Bouzar A. B., Jacques J. R. [et al.] Mutation of a Single Envelope N-Linked Glycosylation Site Enhances the Pathogenicity of Bovine Leukemia Virus // J. Virology. 2015. V. 89 (17). Pp. 8945–8956.
14. Petropavlovskiy M. V., Vereshchak N. A., Bezborodova N. A., Oparina O. Yu. Immuno-biological evaluation of individual genetic variants of bovine leukemia virus in the conditions of the Ural region // Digital agriculture – development strategy:

proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Advances in Intelligent Systems Research. Ekaterinburg, 2019. Pp. 372–377.

**Authors' information:**

Maksim V. Petropavlovskiy<sup>1</sup>, candidate of veterinary sciences, senior researcher of leukemia laboratory, ORCID 0000-0002-9892-6092, AuthorID 676746; *petropavlovsky\_m@mail.ru*

Natalia A. Bezborodova<sup>1</sup>, senior researcher, candidate of veterinary sciences, senior researcher of laboratory of microbiological and molecular genetic diagnostics, ORCID 0000-0003-2793-5001, AuthorID 665979; *n-bezborodova@mail.ru*

Alisa S. Romanova<sup>1</sup>, candidate of technical sciences, senior researcher of leukemia laboratory, ORCID 0000-0003-0189-2963, AuthorID 762742; *alistic\_kolotova@mail.ru*

Aleksey V. Lysov<sup>1</sup>, candidate of veterinary sciences, senior researcher, head of the department of veterinary laboratory diagnostics with a testing laboratory, ORCID 0000-0002-3619-6899, AuthorID 665874; *info@urnivi.ru*

Veronica V. Kozhukhovskaya<sup>1</sup>, postgraduate, laboratory assistant of the laboratory of microbiological and molecular genetic methods of diagnosis, ORCID 0000-0001-7924-6844, AuthorID 1002627; *tetramegon@yandex.ru*

<sup>1</sup> Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre of Ural Branch of the Russian Academy of Science, Ekaterinburg, Russia