

Изучение генетической variability выделенных изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота в Белгородской области

М. В. Петропавловский^{1✉}, И. М. Донник¹, Н. А. Безбородова¹, А. М. Коваленко²,
С. Н. Беляева²

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

² Белгородский государственный аграрный университет имени В. Я. Горина, Майский,
Россия

✉ E-mail: Petropavlovsky_m@mail.ru

Аннотация. Цель исследования – изучение генетической variability выделенных в Белгородской области изолятов вируса лейкоза с применением метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP). **Методы.** Объектом исследований служили инфицированные вирусом лейкоза коровы 3–4-летнего возраста ($n = 10$), выявленные серологическими методами в неблагополучных молочно-товарных сельскохозяйственных предприятиях. Проводили РИД-диагностику, гематологические исследования, ПЦР, генотипирование, статистическую обработку полученных данных. **Научная новизна.** Лейкоз является одним из наиболее распространенных хронических инфекционных заболеваний крупного рогатого скота во многих странах мира и служит причиной существенных экономических потерь в отрасли животноводства. Типизация вируса лейкоза (BLV), изучение его генетической структуры, оценка мутаций и более подробное раскрытие биологических свойств патогена имеет большое фундаментальное и прикладное значение. **Результаты.** В результате проведенных гематологических исследований определена стадия лейкозного процесса у каждого животного. Методом двухэтапной гнездовой (nested) ПЦР был амплифицирован целевой участок env (gp51) гена BLV (444 п. н.) и осуществлено его генотипирование для всех изучаемых изолятов вируса лейкоза с применением метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP). Нами дана первичная оценка генетической variability BLV с установлением генетической группы (бельгийский генотип по RFLP). Мониторинговые исследования генотипов BLV и изучение антигенных изменений патогена позволят своевременно разрабатывать новейшие средства контроля и борьбы с распространением лейкоза, совершенствовать диагностические серологические и ПЦР тест-системы. Полученные специфические участки гена env (gp51) BLV будут использованы для дальнейшего проведения ДНК-секвенирования с последующим филогенетическим анализом и установлением аминокислотных изменений в структуре поверхностного гликопротеина (gp51) вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: вирус лейкоза, молекулярно-генетическая характеристика, филогенетика, гематология, крупный рогатый скот, генотипирование, днк-секвенирование, реакция энзимного полиморфизма.

Для цитирования: Петропавловский М. В., Донник И. М., Безбородова Н. А., Коваленко А. М., Беляева С. Н. Изучение генетической variability выделенных изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота в Белгородской области // Аграрный вестник Урала. 2022. Спецвыпуск «Биология и биотехнологии». С. 33–43. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-229-14-33-43.

Дата поступления статьи: 28.11.2022, **дата рецензирования:** 08.12.2022, **дата принятия:** 12.12.2022.

Постановка проблемы (Introduction)

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) – РНК-содержащий онкогенный вирус, который, согласно таксономической классификации (ICTV), относится к семейству *Retroviridae*, роду *Deltaretrovirus* [1; 11]. Возбудитель поражает им-

мунокомпетентные клетки восприимчивого организма и вызывает необратимые неопластические изменения лимфоидной системы, приводящие у 30–70 % инфицированного скота к стойкому персистентному лимфоцитозу и у 2–5 % – к развитию лимфосаркомы [1; 2; 16; 22]. Персистенция ви-

руса лейкоза у инфицированных животных происходит пожизненно. При данном заболевании до сих пор не разработано эффективных методов лечения и вакцинопрофилактики [1; 2; 4; 9; 19].

В настоящее время лейкоз является одним из наиболее распространенных хронических инфекционных заболеваний среди крупного рогатого скота во многих странах мира [11] и причиной экономических потерь, связанных с вынужденной выбраковкой высокопродуктивных племенных животных на ранних этапах производственного использования, а также с потерями продуктивности, связанными в том числе и с влиянием заболевания на иммунный статус [1; 2; 4; 6; 8; 9; 10; 19; 22].

Единственный эффективный метод искоренения патогена – четкое выполнение программ контроля над распространением заболевания, основой которых является своевременное и эффективное выявление и изолирование инфицированных животных [1; 4; 9; 19; 22].

Современные методы диагностики вируса лейкоза имеют достаточно высокую эффективность, однако вероятность получения некорректных данных лабораторного контроля коррелирует с генетической вариабельностью отдельных изолятов патогена [7; 13; 14; 18]. Кроме того, установлена взаимосвязь между распространением в популяции крупного рогатого скота инфекции, вызванной отдельными географическими генетическими вариантами вируса лейкоза, тяжестью вызываемого патологического процесса и скоростью развития клинических симптомов заболевания [14; 18].

Таким образом, типизация BLV, изучение его генетической структуры с оценкой мутаций и более подробное раскрытие биологических свойств патогена имеет большое значение для вирусологии, эпизоотологии и других наук. Отраслевое значение мониторинговых исследований генотипов BLV и изучение антигенных изменений патогена позволит своевременно разрабатывать новейшие средства контроля и борьбы с распространением лейкоза, совершенствовать диагностические серологические и ПЦР тест-системы, в том числе путем подбора специфичных праймеров для консервативных фрагментов генома возбудителя.

Цель исследования – изучить генетическую вариабельность выделенных в неблагополучных молочно-товарных хозяйствах Белгородской области изолятов вируса лейкоза с применением метода энзимного генотипирования (RFLP).

Задачи:

1. Провести генотипирование выделенных в неблагополучных молочно-товарных хозяйствах Белгородской области изолятов вируса лейкоза с применением метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP).

2. Изучить гематологические показатели исследуемых групп животных.

3. Выделить целевой фрагмент env гена BLV и подготовить полученные образцы к дальнейшему ДНК-секвенированию.

Методология и методы исследования (Methods)

Работа выполнена в лаборатории лейкоза отдела мониторинга и прогнозирования инфекционных болезней животных и в лаборатории геномных исследований и селекции животных Уральского научно-исследовательского ветеринарного института – структурного подразделения УрФАНИЦ УрО РАН, а также на базе Белгородского государственного аграрного университета имени В. Я. Горина (испытательная лаборатория, лаборатория по изучению инфекционных и инвазионных болезней и апробации ветеринарных препаратов).

Объект исследований: – крупный рогатый скот черно-пестрой молочной породы, принадлежащий сельскохозяйственным предприятиям Белгородской области.

Предмет исследования – цельная кровь, лейкоцитарная взвесь.

Подготовка лейкоцитарной фракции

Методика выделения (изоляция) лейкоцитов проведена в условиях лаборатории Белгородского государственного аграрного университета. Отбор цельной крови от животных производили вакуумным способом с использованием пробирок с ЭДТА в качестве стабилизатора. Методика выделения лейкоцитов проведена в асептических условиях с применением раствора фикола ($\rho = 1,077 \text{ г/мл}$)¹.

В результате центрифугирования разбавленной крови с раствором фикола образовывался белесый мениск на границе раздела фракций – лейкоциты (моноклеарная фракция клеток крови) (по методике А. Воуп, 1974). Далее изолировали лейкоцитарное кольцо, а приготовленные пробы замораживали.

Сбор образцов и хранение ДНК

Образцы крови были взяты от 10 серологически положительных коров 3–4-летнего возраста, естественно инфицированных BLV. Серологические исследования на лейкоз проведены в ветеринарных лабораториях Белгородской области методом реакции иммунной диффузии (РИД). Отбор проб крови производили одноразовыми вакуумными системами в стерильные пробирки типа ЭДТА КЗ для молекулярно-генетических и гематологических исследований.

Для проведения РИД-диагностики использован диагностический набор производства Курской биофабрики – фирмы «БИОК». Исследование проводилось согласно инструкции № 13-7-2/2130, утвержденной Департаментом ветеринарии Минсельхоза России от 23.08.2000 г.

¹ Раствор фиолла. URL: https://paneco-ltd.ru/products/fikolla-rastvor_1 (дата обращения: 25.11.2022).

Гематологические исследования крови животных проводили на автоматическом гематологическом анализаторе URIT-3020 (Китай) согласно инструкции по работе с данным прибором.

Амплификация вирусной ДНК с помощью ПЦР

Выделение ДНК 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 компания ООО «ИзоГен» (Москва). Измерение концентрации ДНК проводили флуориметрическим методом при помощи прибора MaxLife H100 Mod.2 ООО «МВМ Диагностика» (Барнаул).

Для выявления в пробах ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота использовали коммерческий тест-набор «Лейкоз» для выявления вируса лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР Ampli Sens (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Амплификацию в режиме реального времени проводили с применением оборудования Real-time CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

Фрагмент гена env 444 п. н. амплифицировали с помощью гнездовой (nested) ПЦР с использованием следующих праймеров: env 5032 tct-gtg-cca-agt-ctc-cca-gat-a, env 5608 aac-aac-aac-ctc-tgg-gaa-ggg-t, env 5099 ccc-aca-agg-gcg-gcg-ccg-gtt-t, env 5521 gcg-agg-ccg-ggt-cca-gag-ctg-g [5], синтезированных компанией ООО «Синтол» (Москва). С проведением двух последовательных реакций со следующими параметрами циклов: 2 минуты при 94 °C (1 цикл), 30 секунд при 95 °C, 30 секунд при 62 °C (внешние праймеры) или 30 секунд при 70 °C (внутренние праймеры), 60 секунд при 72 °C (40 циклов), 4 минуты при 72 °C.

На первом этапе постановки гнездовой ПЦР электрофоретическая подвижность ампликонов соответствовала длине фрагмента 600 п. н., на втором этапе – 444 п. н.

ПДРФ-анализ (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) проводили путем разрезания участка ДНК (444 п. н. env гена) с помощью эндонуклеаз рестрикции BamHI, PvuII, BclI (Thermo Fisher Scientific, США) со следующими параметрами циклов: BamHI, PvuII – 37 °C 2 часа; BclI – 55 °C 2 часа. Анализ размеров образующихся фрагментов (рестриктов) проводили путем гель-электрофореза.

Результаты проведенной рестрикции учитывали в соответствии с табличными данными [3] (таблица 1).

Для проведения гнездовой (nested) ПЦР применяли мастер-микс-наборы – «БиоМастер» HS-Tag ПЦР (2^x) ООО «Биолабмикс» (Новосибирск).

Амплификацию/инкубацию ДНК проводили с использованием термоциклера SWIFT Maxi PRO (ESCO TECHNOLOGIS, INC., USA).

В качестве контроля амплификации, на всех этапах исследований использовали ДНК, выделенную из референтной линии клеток FLK-BLV.

Культивирование клеточной линии FLK BLV (M. Van Der Maaten, J. Miller, A. Boothe, 1974) производили монослойным способом на среде 199 с добавлением 10 % бычьей эмбриональной сыворотки.

Учет реакции осуществляли методом горизонтального электрофореза с применением 1,5 % агарозного геля с добавлением бромистого этидия в качестве интеркалирующего красителя для ДНК. В работе применяли оборудование, систему для геледокументирования с УФ-источником света E-Gel Imagen Sistem (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Для определения размера ампликонов после проведения ПЦР-исследований использовали маркер Step100 ООО «Биолабмикс» (Новосибирск) и ДНК-маркеры 1 Kb НПО «СибЭнзим» (Новосибирск).

Статистическую обработку данных проводили методами вариационной статистики в виде расчетов среднего арифметического, стандартного отклонения и коэффициентов вариации с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2019.

Таблица 1
Генотипы вируса лейкоза в зависимости от размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путем гель-электрофореза

Тип BLV	BamHI	PvuII	BclI
Японский	316, 128	444	219, 121, 104
Австралийский	316, 128	444	225, 219
Бельгийский	444	280, 164	225, 219

Table 1
Genotypes of the leukemia virus depending on the size of the formed fragments (restrictions) of the subsequent gel electrophoresis

BLV Type	BamHI	PvuII	BclI
Japanese	316, 128	444	219, 121, 104
Australian	316, 128	444	225, 219
Belgian	444	280, 164	225, 219

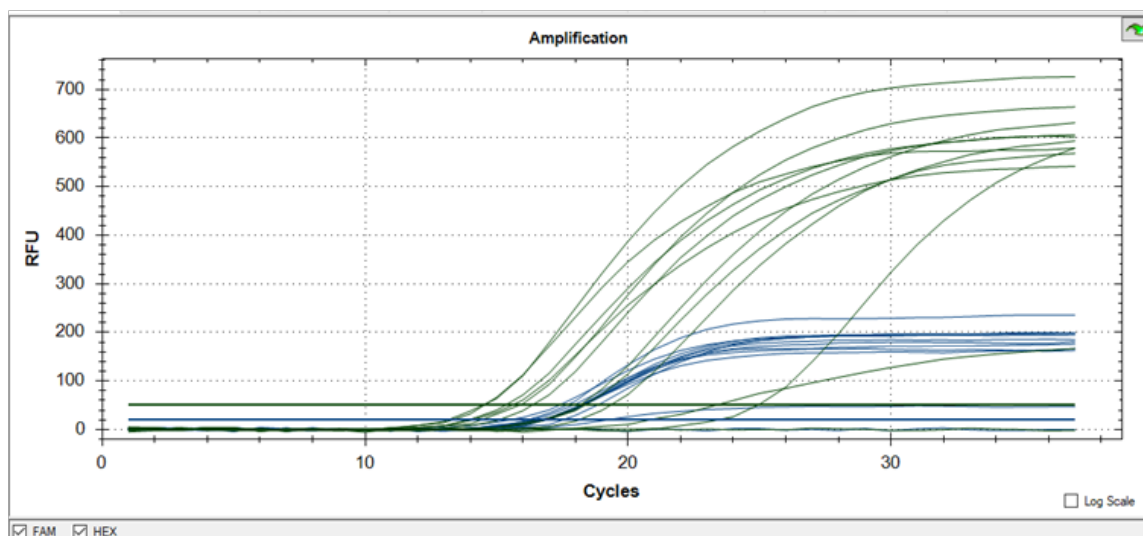


Рис. 1. Детекция продуктов амплификации на приборе CFX96 и анализ специфического участка ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота по каналам HEX-образцы ДНК ($n = 10$), контроль + / FAM – внутренний контроль
 Fig. 1. Detection of amplification products on the CFX96 device and analysis of a specific DNA site of the bovine leukemia virus through channels HEX- sample DNA ($n=10$), control + / FAM – internal control

Результаты (Results)

Нами произведен подбор общепринятых в научном сообществе методик по изучению генетических характеристик штаммов, полученных из районов Белгородской области. В качестве целевого гена для проведения генотипирования и последующей филогенетической оценки выбран env-ген BLV, кодирующий gp 51 (SU) [17] гликопротеин и его участок длиной 444 п. н. На первом этапе сформированы протоколы исследований и произведен отбор проб цельной крови и подготовлена лейкоцитарная взвесь от предварительно серологически исследованных на лейкоз (в РИД) коров (возраст 3–4 года) черно-пестрой породы ($n = 10$) из неблагополучных по заболеванию районов Белгородской области. По результатам исследований животные имели статус – серопозитивные (BLV+).

В результате проведенных в Белгородском государственном аграрном университете гематологических исследований данных животных ($n = 10$) установлено, что распределение эритроцитов по объему было приближено к верхней границе нормы и составляло 16,6 и 20,7 % (нормативный показатель 14,0–19,0 %).

У всех исследованных коров было установлено снижение гемоглобина более чем на 50 %, до 46–72 г/л. Количество тромбоцитов находилось выше нижней границы нормы в 1,96–4,25 раза. Средний объем тромбоцитов может быть повышен вследствие вовлечения в патологический процесс многих органов и систем организма.

Пониженный гематокрит сигнализирует о нарушении процесса образования эритроцитов, нарушении синтеза гемоглобина при анемии. Преждевременная гибель эритроцитов возникает часто при злокачественных опухолях и приводит к пониженной выработке красных клеток. У исследованных

коров гематокрит составлял 28,0–28,9 %, что меньше нормы в 1,59 раза (28,0–46,0 %).

Наиболее значительные изменения отмечены в показателях белой крови. У коровы № 9 установлена начальная стадия (сублейкемическая) заболевания лейкозом, количество лейкоцитов составляло $19,4 \cdot 10^9/\text{л}$, абсолютное количество лимфоцитов составляло $10,5 \cdot 10^9/\text{л}$. У всех остальных исследованных коров выявлен высокий лейкоцитоз (показатели количества лейкоцитов от 23,7 до $30,4 \cdot 10^9/\text{л}$), а по абсолютному количеству лимфоцитов (от 4,4 до $9,9 \cdot 10^9$) определена алейкемическая стадия лейкозного процесса.

Результаты ПЦР-исследований коммерческими тест-системами показали, что все изучаемые образцы были положительными по вирусу лейкоза крупного рогатого скота и содержали специфические участки provirus BLV (рис. 1).

При постановке первого этапа гнездовой (nested) ПЦР с использованием полученной геномной ДНК в концентрации 500 нг и первой парой внешних праймеров (env 5032, env 5608), во всех исследуемых пробах были получены ампликоны, которые при постановке в горизонтальном электрофорезе соответствовали длине фрагмента 600 п. н. и хорошо просматривались при визуальной оценке (рис. 2).

Далее полученные ампликоны (600 п. н.) использовались для постановки второго этапа гнездовой (nested) ПЦР с внутренней парой праймеров (env 5099, env 5521).

Результатом гнездовой (nested) ПЦР с использованием данных праймеров стало получение всех 10 образцов специфичных ампликонов env гена BLV длиной 444 п. н., соответствие длине фрагмента визуализировано при постановке в горизонтальном электрофорезе (рис. 3).

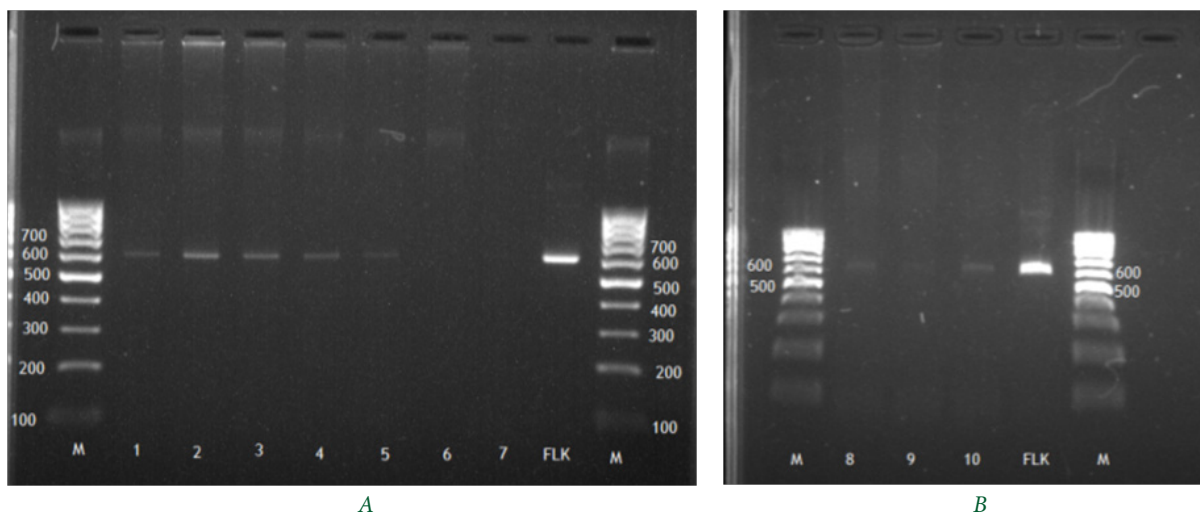


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации: М – маркер м100 шагом; А – ампликоны длиной 600 п. н. после первого этапа гнездовой (nested) ПЦР (env 5032, env 5608), образцы № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7; В – образцы № 8, 9, 10; FLK – ДНК, выделенная из референтной клеточной линии FLK BLV (положительный контрольный образец)
 Fig. 2. Electrophoregram of amplification products: М – marker m100 in increments; А – amplicons 600 bp long after the first stage of nested PCR (env 5032, env 5608), samples No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7; В – samples No. 8, 9, 10; FLK – DNA isolated from the reference cell line FLK BLV (positive control sample)

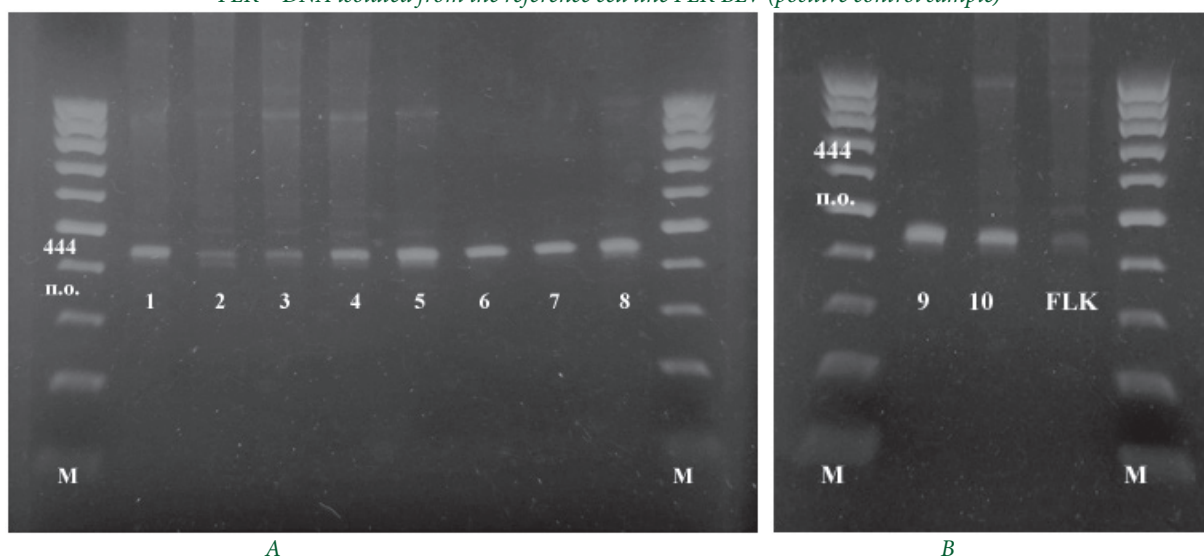


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации: М – маркер м100 шагом; А, В – ампликоны длиной 444 п. н. после второго этапа гнездовой (nested) ПЦР (env 5032, env 5608); А – образцы № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; В – образцы № 9, 10; FLK – ДНК, выделенная из референтной клеточной линии FLK BLV (положительный контрольный образец)
 Fig. 3. Electrophoregram of amplification products: М – marker m100 in increments; А, В – amplicons 444 b. p. long after the second stage of nested PCR (env 5032, env 5608); А – samples No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; В – samples No. 9, 10; FLK – DNA isolated from the reference cell line FLK BLV (positive control sample)

Таким образом, был получен целевой для проведения генотипирования вируса лейкоза участок гена env длиной 444 п. н. для каждого исследуемого образца.

Затем проведено генотипирование, выделенного фрагмента (444 п. н.) env гена вируса лейкоза крупного рогатого скота, для этого произведен энзимный анализ, принцип которого – разрезание нуклеотидных последовательностей в генотип-детерминированных участках ферментами-рестриктазами (VamHI, PvuII и BclI) (рис. 4).

При проведении ПДРФ-анализа было выяснено, что все 10 исследуемых образцов соответствовали бельгийскому генотипу вируса лейкоза при показа-

телях длин рестрикетов: VamHI – 444 п. н.; PvuII – 280, 164 п. н.; BclI – 219 п. н.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Известно, что геном вируса лейкоза крупного рогатого скота содержит структурные гены (gag, pol и env) кодирующие важнейшие для жизнедеятельности патогена структурно-функциональные белки [5; 16; 17; 24].

Аминокислотные замены в таких белках, имеющие даже единичный характер, обуславливают формирование отдельных генетических кластеров вируса лейкоза и оказывают влияние на инфекционные свойства патогена, на его выявляемость при диагностическом скрининге [7; 13; 18; 24].

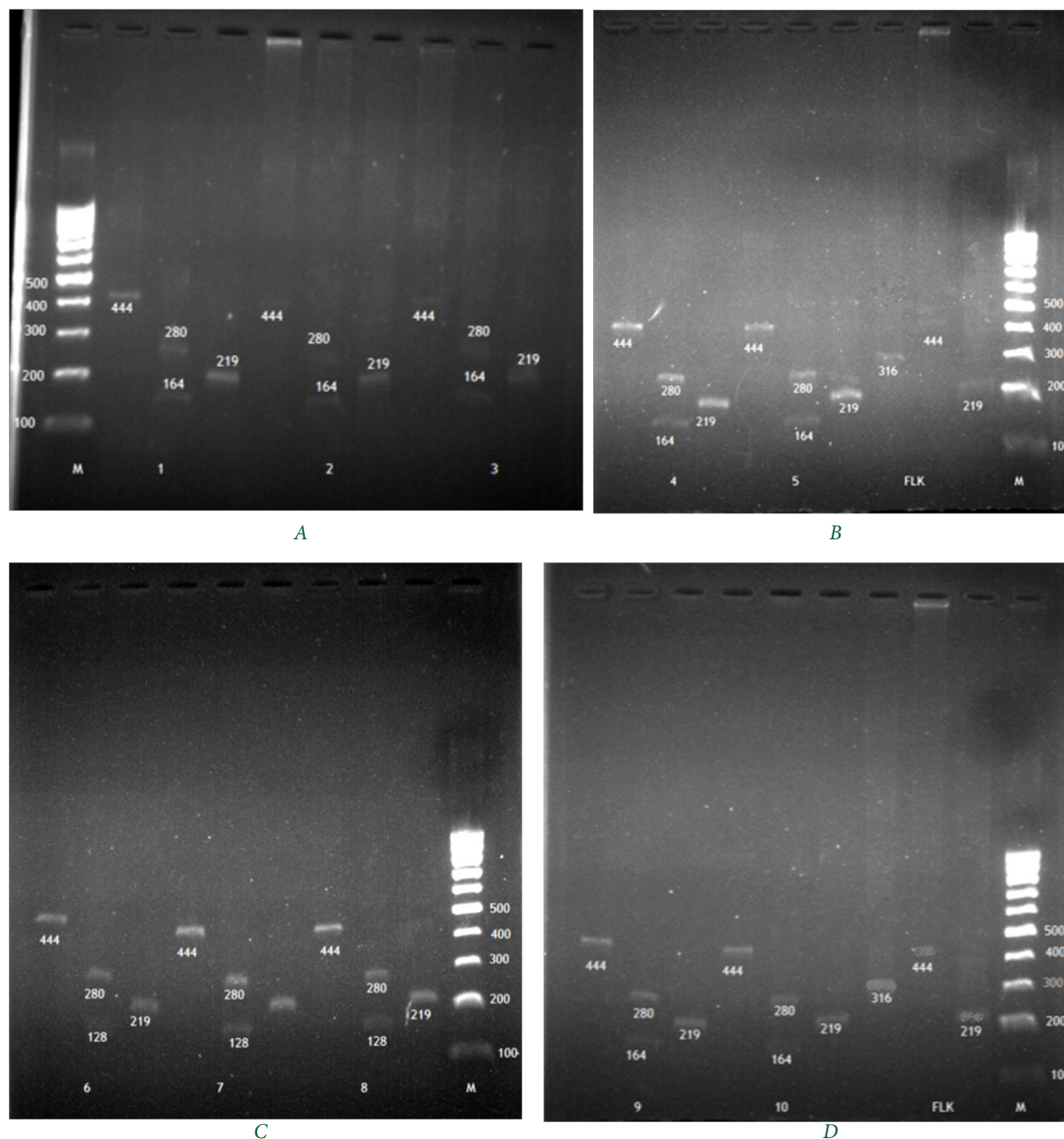


Рис. 4. Электрофореграммы распределения сайтов рестрикции при исследовании *env* гена BLV, участок 444 п. н. методом ПДРФ: М – маркер м100 шагом; бельгийский генотип BLV образцы: А – 1, 2, 3; В – 4, 5; С – 6, 7, 8; D – 9, 10; FLK BLV (положительный контрольный образец, реагирует как австралийский генотип)
 Fig. 4 Electrophoregrams of the distribution of restriction sites in the study of the *env* gene BLV, site 444 b. p. by the RFLP method: M – marker m100 step; belgian genotype BLV samples: A – 1, 2, 3; B – 4, 5; C – 6, 7, 8; D – 9, 10; FLK BLV (positive control sample, reacts as australian genotype)

Поверхностный гликопротеин gp51 (SU) и трансмембранный gp30 (TM) обуславливают вирулентность вируса и имеют большое значение в их серологической диагностике [7; 18; 24]. Названные белки возбудителя кодируются *env* геном [17; 24].

Изучение нуклеотидных (SNP) замен в доменах, кодирующих важные структурные белки BLV, является актуальной задачей. В связи с этим в качестве таргетных участков гена *env* возбудителя лейкоза с целью проведения генотипирования, ДНК-

секвенирования и последующей филогенетической оценки, выбран фрагмент *env* гена, длиной 444 п. н. [5; 16; 18].

Генотипирование последовательностей осуществляют несколькими способами: полногеномным исследованием всей ДНК-последовательности провируса; секвенированием коротких участков генома вируса лейкоза; выявлением полиморфизмов коротких фрагментов при помощи рестриктаз (энзимов) [16].

Электрофоретической характеристикой длин выявленных отрезков ДНК определяют генетическую кластеризацию BLV. Согласно опубликованным ранее сведениям о генотип-специфических полиморфизмах различных вариантов BLV, воздействие рестриктаз на определенные нуклеотидные последовательности в этих местах (имеющие SNP) и позволяет классифицировать изолят вируса лейкоза в тот или иной кластер (австралийский, бельгийский или японский) [3; 5; 16].

ДНК-секвенирование всего выделенного участка позволяет провести подробный биоинформатический анализ, включая сравнительную филогенетическую оценку изучаемых последовательностей с изолятами, выявленными на других географических территориях и определить аминокислотные полиморфизмы [5; 12; 16; 17].

В настоящее время генетическое разнообразие BLV, основанное на генотипировании env-гена, классифицировано и представлено 12 различными генетическими группами вируса в разных географических точках мира [3; 5; 13; 15; 16; 18; 20; 21; 23]. В Российской Федерации в настоящее время выявлены распространённые представители генотипа вируса лейкоза – G4 (бельгийский), G7 (австралийский) и G8 (австралийский) [13; 18].

Проведенными ранее исследованиями (ПДРФ- и ДНК-секвенирование) env-фрагментов BLV, полученных в 2010–2020 гг. на территориях Тюменской, Курганской, Челябинской, Свердловской областей, Краснодарского края было показано присутствие G4 и G7 генотипов в этих регионах, а также (на примере Тюменской области) отмечено изменение доминирующего генотипа вируса лейкоза с G7 австралийского на другой – G4 бельгийский [13; 18]. У крупного рогатого скота, инфицированного вирусом лейкоза G4 генетической группы, несмотря на средний возраст 3,5 года, лейкозный процесс описан на сублейкемической и лейкемической стадиях, что означает его быстрый переход от одной форме к другой. У животных показаны выраженные нарушения функции кроветворения и значительная дисфункция иммунной системы [14]. Скорость перехода заболевания в гематологическую и терминальные стадии может быть обусловлена увеличением провирусной нагрузки за счет усиления иммуногенных свойств вируса. Это реализуется за счет антигенных изменений в конформационных эпитопах, что, по-видимому, является приспособительной особенностью возбудителя и способствует его «маскировке» от иммунного надзора макроорганизма.

На основании эпизоотологических, молекулярно-генетических и иммуногематологических исследований был сделан вывод о потенциальной опасности варианта G4 (бельгийский) вируса лейкоза для отрасли животноводства. Увеличение прови-

русной нагрузки может повышать контагиозность животных, способствуя широкому распространению данной генетической группы патогена среди популяций крупного рогатого скота, создавая тем самым проблемы при проведении оздоровительных противолейкозных мероприятий. Увеличение патогенности обуславливает скорость перехода заболевания в гематологическую и терминальные стадии, нанося весомый экономический ущерб сельскохозяйственным предприятиям [13; 18].

Проведение исследований по изучению молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса лейкоза в Белгородской области осуществлено впервые.

Методом двухэтапной гнездовой (nested) ПЦР был амплифицирован целевой фрагмент env гена BLV (444 п. н.) и осуществлено генотипирование данного участка для всех изучаемых образцов с применением метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP). При проведении данного анализа было выяснено, что все образцы соответствовали ($n = 10$) бельгийскому генотипу вируса лейкоза (VamH1 – 444 п. н., PvuII – 280, 164 п. н., BclI – 219 п. н.).

Исходя из данных о географическом распространении изолятов вируса лейкоза в Российской Федерации, вероятно, на территории данного региона ассимилировал генотип вируса лейкоза крупного рогатого скота группы G4, подробные данные могут быть предоставлены только после проведения ДНК-секвенирования образцов, биоинформатической обработки результатов и дальнейшего скрининга генотипов вируса лейкоза в регионе.

Проведенными гематологическими исследованиями животных, от которых был отобран биоматериал, отмечены значительные изменения показателей белой крови, была установлена стадия лейкозного процесса у каждого животного. Начальная (сублейкемическая) стадия заболевания лейкозом определена у одного животного, количество лейкоцитов составляло $19,4 \cdot 10^9/\text{л}$, а абсолютное количество лимфоцитов – $10,5 \cdot 10^9/\text{л}$. У остальных исследованных коров выявлена алейкемическая стадия лейкоза (при значительно выраженном лейкоцитозе в пределах от 23,7 до $30,4 \cdot 10^9/\text{л}$ и абсолютном количестве лимфоцитов – от 4,4 до $9,9 \cdot 10^9/\text{л}$). Это указывает на возможное дальнейшее прогрессирование лейкозного патологического процесса у обследованных животных при возрастающей провирусной нагрузке.

Таким образом, изучением полиморфизмов, выделенных в Белгородской области изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота дана первичная оценка генетической вариативности BLV с установлением генетической группы (бельгийский генотип по RFLP).

В ходе работы были получены специфические участки гена env gp51 BLV, которые будут использованы для дальнейшего проведения ДНК-секвенирования с последующим филогенетическим

анализом и установлением аминокислотных изменений в структуре поверхностного гликопротеина gp51 (SU) вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Библиографический список

1. Донник И. М., Гулюкин М. И., Бусол В. А., Коваленко Л. В., Коваленко А. М. Лейкоз крупного рогатого скота – диагностика, оздоровление, антропозоонозный потенциал (история вопроса) (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56. № 2. С. 230–244.
2. Гулюкин М. И., Капустина О. В., Ездакова И. Ю., Вальциферова С. В., Степанова Т. В., Аноятбеков М. Выявление специфических антител классов G и M к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотках крови // Вопросы вирусологии. 2019. № 64 (4). С. 173–177. DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177.
3. Asfaw Y., Tsuduku S., Konishi M., Murakami K., Tsuboi T., Wu D. et al. Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan // Archives of Virology. 2005. No. 150. Pp. 493–505.
4. Bartlett P. C., Ladronka R. M., Ruggiero V. J., Hutchinson H. What dairy veterinarians should know about bovine leukemia virus // Bovine Practitioner. 2018. No. 52 (1). Pp. 1–7.
5. Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuzmak J. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing // Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2001. Vol. 114. No. 7-8. Pp. 252–256.
6. Chen Y. C., Chin W. Y., Chang C. C., Chuang S. T., Hsu W. L. Potential Risk Factors Associated with Infection with Bovine Leukaemia Virus in Dairy and Beef Cattle in Taiwan // Pathogens. 2021. No. 10 (12). Article number 1553. DOI: 10.3390/pathogens10121553.
7. Fechner H., Blankenstein P., Looman A. C., Elwert J., Geue L., Albrecht C. et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle // Virology. 1997. Vol. 237. No. 2. Pp. 261–269.
8. Frie M. C., Coussens P. M. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle // Veterinary Immunology and Immunopathology. 2015. Vol. 163 (3-4). Pp. 103–114. DOI: 10.1016/j.vetimm.2014.11.014.
9. Kuczewski A., Adams C., Lashewicz B., van der Meer F. Alberta dairy farmers' and veterinarians' opinion about bovine leukemia virus control measures // Preventive Veterinary Medicine. 2022. Vol. 200. Article number 105590. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2022.105590.
10. LaDronka R. M., Ainsworth S., Wilkins M. J., Norby B., Byrem T. M., Bartlett P. C. Prevalence of bovine leukemia virus antibodies in US dairy cattle // Veterinary Medicine International. 2018. Vol. 2018. DOI: 10.1155/2018/5831278.
11. Enzootic Bovine Leukosis Disease situation [e-resource] URL: <https://wahis.woah.org/#/dashboards/country-or-disease-dashboard> (date of reference: 13.06.2022).
12. Pavliscak L. A., Nirmala J., Singh V. K., Sporer K. R. B., Taxis T. M., Kumar P., Goyal S. M., Mor S. K., Schroeder D. C., Wells S.J., Droscha C. J. Tracing Viral Transmission and Evolution of Bovine Leukemia Virus through Long Read Oxford Nanopore Sequencing of the Proviral Genome // Pathogens. 2021. Vol. 10 (9). Article number 1191. DOI: 10.3390/pathogens10091191.
13. Petropavlovskiy M. et al. Epizootiological and genetic characterization of the bovine leukemia virus in the Russian Federation – evaluation of bovine leukemia virus in Russia // Veterinary Archives. 2019; 89: 785–798.
14. Petropavlovsky 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.
15. Pluta A., Rola-Łuszczak M., Kubis P., Balov S., Moskalik R., Choudhury B., Kuzmak J. Molecular characterization of bovine leukemia virus from Moldovan dairy cattle. Archives of Virology. 2018. Vol. 162. No. 6. Pp. 1563–1576.
16. Polat M., Takeshima S., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus // Virology Journal. 2017. Vol. 14. Article number 209. DOI: 10.1186/s12985-017-0876-4.
17. Rice N. R., Stephens R. M., Couez D., Deschamps J., Keltmann R., Burny A. et al. The nucleotide sequence of the env gene and the post-env region of bovine leukemia virus // Virology. 1984. Vol. 138. Pp. 82–93.
18. Rola-Łuszczak M., Pluta A., Olech M., Donnik I., Petropavlovskiy M., Gerilovych A. et al. The molecular characterization of bovine leukemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny // PLoS One. 2013. Vol. 8. No. 3. Article number e58705. DOI: 10.1371/journal.pone.0058705.
19. Ruggiero V. J., Bartlett P. C. Control of Bovine Leukemia Virus in Three US Dairy Herds by Culling ELISA-Positive Cows // Veterinary Medicine International. 2019. Article number 3202184. DOI: 10.1155/2019/3202184.

20. Sultanov A., Rola-Łuszczak M., Mamanova S., Ryło A., Osiński Z., Saduakassova M. A., Bashenova E., Kuźmak J. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan // *Pathogens*. 2022. Vol. 11 (2). Article number 180. DOI: 10.3390/pathogens11020180.
21. Suzuki A., Chapman R., Douglass N., Carulei O., van Rensburg J., Williamson A. L. Phylogenetic Analysis of South African Bovine Leukaemia Virus (BLV) Isolates. *Viruses*. 2020. Vol. 12. No. 8. Article number 898. DOI: 10.3390/v12080898.
22. Enzootic bovine leucosis [e-resource] // In: OIE Terrestrial Manual 2018. Chap 3.4.9. Pp. 1113–1124. URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.09_EBL.pdf (date of reference: 13.06.2022).
23. Yang, Y., Chen, L., Dong, M. et al. Molecular characterization of bovine leukemia virus reveals existence of genotype 4 in Chinese dairy cattle. *Virology Journal*. 2019. Vol. 16. Article number 108. DOI: 10.1186/s12985-019-1207-8.
24. Zhao X., Buehring G. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape // *Virology*. 2007. Vol. 366. Pp. 150–165.

Об авторах:

Максим Валерьевич Петропавловский¹, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ORCID 0000-0002-9892-6092, AuthorID 676746; +7 902 877-46-57, petropavlovsky_m@mail.ru

Ирина Михайловна Донник¹, академик РАН, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, ORCID 0000-0002-8593-7470, AuthorID 313786; ktqrjp7@yandex.ru

Наталья Александровна Безбородова¹, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ORCID 0000-0003-2793-5001, AuthorID 665979; n-bezborodova@mail.ru

Анатолий Михайлович Коваленко², доктор ветеринарных наук, профессор, ORCID 0000-0002-7219-4049, AuthorID 345276; mycobacteria@rambler.ru

Светлана Николаевна Беляева², кандидат биологических наук, доцент, ORCID 0000-0002-2181-6899, AuthorID 1078572; belysveta2@yandex.ru

¹ Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр

Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

² Белгородский государственный аграрный университет имени В. Я. Горина, Майский, Россия

Study of genetic diversity of bovine leukemia virus isolates obtained in the Belgorod region

M. V. Petropavlovskiy¹✉, I. M. Donnik¹, N. A. Bezborodova¹, A. M. Kovalenko², S. N. Belyaeva²

¹ Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

² Belgorod State Agricultural University named after V. Gorin, Mayskiy, Russia

✉ E-mail: Petropavlovsky_m@mail.ru

Abstract. The purpose of the research Was to study genetic diversity of bovine leukemia virus isolates obtained in the Belgorod Region using restriction fragment length polymorphism method (RFLP). **Scientific novelty.** Bovine leukosis is one of the most common chronic infectious diseases of cattle in many countries of the world, which causes significant economic losses in the livestock industry. The typing of bovine leukemia virus (BLV), the study of its genetic structure, the evaluation of the mutation vector and a more detailed disclosure of the biological properties of the pathogen represent fundamental and applied value. **Methods.** The object of the research was 3–4-year-old cows infected with leukemia virus ($n = 10$), identified by serological methods in disadvantaged dairy farms. The immunodiffusion (ID) test, hematologic studies, PCR, genotyping, statistical processing of obtained data were conducted. **Results.** Conducted hematological studies determined the stage of the leukemic process in each animal. The target env fragment of the BLV gene (444 bp) was amplified by 2-stage nested PCR, and this region was genotyped for all studied leukemia virus isolates using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. In the course of the work, specific regions of the BLV env (gp51) gene, 970 bp long, were also obtained. We have given a primary assessment of the genetic diversity of BLV with the establishment of a genetic group (Belgian genotype according to RFLP). In the course of the work, specific regions of the env gp51 BLV gene, 444 bp long, were obtained. These fragments will be used for further DNA sequencing followed by phyloge-

netic analysis and determination of amino acid changes in the structure of the surface glycoprotein (gp51) of the bovine leukemia virus. Monitoring studies of BLV genotypes and the study of antigenic changes in the pathogen will allow timely development of the latest means of controlling and restricting the spread of bovine leukosis and improvement of diagnostic serological and PCR test systems.

Keywords: bovine leukemia virus, molecular genetic characteristics, phylogenetics, hematology, cattle, genotyping, DNA sequencing, enzyme polymorphism reaction.

For citation: Petropavlovskiy M. V., Donnik I. M., Bezborodova N. A., Kovalenko A. M., Belyaeva S. N. Izucheniye geneticheskoy variabel'nosti vydelennykh izolyatov virusa leykoza krupnogo rogatogo skota v Belgorodskoy oblasti [Study of genetic diversity of bovine leukemia virus isolates obtained in the Belgorod region] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2022. Special issue "Biology and biotechnologies". Pp. 33–43. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-229-14-33-43. (In Russian.)

Date of paper submission: 28.11.2022, **date of review:** 08.12.2022, **date of acceptance:** 12.12.2022.

References

1. Donnik I. M., Gulyukin M. I., Busol V. A., Kovalenko L. V., Kovalenko A. M. Leykoz krupnogo rogatogo skota – diagnostika, ozdorovlenie, antropozoonoznyy potentsial (istoriya voprosa) (obzor) [Bovine leukemia virus infection – diagnostics, eradication, and anthroozoonotic potential (background) (review)] // Agricultural Biology. 2021. Vol. 56. No. 2. Pp. 230–244.
2. Gulyukin M. I., Kapustina O. V., Ezbekova I. Yu., Valtsiferova S. V., Stepanova T. V., Anoyatbekov M. Detection of specific antibodies of classes G and M to bovine leukemia virus in the blood serum // Problems of Virology, Russian journal. 2019. No. 64 (4). Pp. 173–177. DOI:10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177.
3. Asfaw Y., Tsuduku S., Konishi M., Murakami K., Tsuboi T., Wu D. et al. Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan // Archives of Virology. 2005. No. 150. Pp. 493–505.
4. Bartlett P. C., Ladronka R. M., Ruggiero V. J., Hutchinson H. What dairy veterinarians should know about bovine leukemia virus // Bovine Practitioner. 2018. No. 52 (1). Pp. 1–7.
5. Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuzmak J. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing // Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2001. Vol. 114. No. 7-8. Pp. 252–256.
6. Chen Y. C., Chin W. Y., Chang C. C., Chuang S. T., Hsu W. L. Potential Risk Factors Associated with Infection with Bovine Leukaemia Virus in Dairy and Beef Cattle in Taiwan // Pathogens. 2021. No. 10 (12). Article number 1553. DOI: 10.3390/pathogens10121553.
7. Fechner H., Blankenstein P., Looman A. C., Elwert J., Geue L., Albrecht C. et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle // Virology. 1997. Vol. 237. No. 2. Pp. 261–269.
8. Frie M. C., Coussens P. M. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle // Veterinary Immunology and Immunopathology. 2015. Vol. 163 (3-4). Pp. 103–114. DOI: 10.1016/j.vetimm.2014.11.014.
9. Kuczewski A., Adams C., Lashewicz B., van der Meer F. Alberta dairy farmers' and veterinarians' opinion about bovine leukemia virus control measures // Preventive Veterinary Medicine. 2022. Vol. 200. Article number 105590. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2022.105590.
10. LaDronka R. M., Ainsworth S., Wilkins M. J., Norby B., Byrem T. M., Bartlett P. C. Prevalence of bovine leukemia virus antibodies in US dairy cattle // Veterinary Medicine International. 2018. Vol. 2018. DOI: 10.1155/2018/5831278.
11. Enzootic Bovine Leukosis Disease situation [e-resource]. URL: <https://wahis.woah.org/#/dashboards/country-or-disease-dashboard> (date of reference: 13.06.2022).
12. Pavliscak L. A., Nirmala J., Singh V. K., Sporer K. R. B., Taxis T. M., Kumar P., Goyal S. M., Mor S. K., Schroeder D. C., Wells S. J., Droscha C. J. Tracing Viral Transmission and Evolution of Bovine Leukemia Virus through Long Read Oxford Nanopore Sequencing of the Proviral Genome // Pathogens. 2021. Vol. 10 (9). Article number 1191. DOI: 10.3390/pathogens10091191.
13. Petropavlovskiy M. et al. Epizootiological and genetic characterization of the bovine leukemia virus in the Russian Federation – evaluation of bovine leukemia virus in Russia // Veterinary Archives. 2019; 89: 785–798.
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.

15. Pluta A., Rola-Łuszczak M., Kubis P., Balov S., Moskalik R., Choudhury B., Kuzmak J.. Molecular characterization of bovine leukemia virus from Moldovan dairy cattle. *Archives of Virology*. 2018. Vol. 162. No. 6. Pp. 1563–1576.
16. Polat M., Takeshima S., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus // *Virology Journal*. 2017. Vol. 14. Article number 209. DOI: 10.1186/s12985-017-0876-4.
17. Rice N. R., Stephens R. M., Couez D., Deschamps J., Keltmann R., Burny A. et al. The nucleotide sequence of the env gene and the post-env region of bovine leukemia virus // *Virology*. 1984. Vol. 138. Pp. 82–93.
18. Rola-Łuszczak M., Pluta A., Olech M., Donnik I., Petropavlovskiy M., Gerilovych A. et al. The molecular characterization of bovine leukemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. No. 3. Article number e58705. DOI: 10.1371/journal.pone.0058705.
19. Ruggiero V. J., Bartlett P. C. Control of Bovine Leukemia Virus in Three US Dairy Herds by Culling ELISA-Positive Cows // *Veterinary Medicine International*. 2019. Article number 3202184. DOI: 10.1155/2019/3202184.
20. Sultanov A., Rola-Łuszczak M., Mamanova S., Ryło A., Osiński Z., Saduakassova M. A., Bashenova E., Kuźmak J. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan // *Pathogens*. 2022. Vol. 11 (2). Article number 180. DOI: 10.3390/pathogens11020180.
21. Suzuki A., Chapman R., Douglass N., Carulei O., van Rensburg J., Williamson A. L. Phylogenetic Analysis of South African Bovine Leukaemia Virus (BLV) Isolates. *Viruses*. 2020. Vol. 12. No. 8. Article number 898. DOI: 10.3390/v12080898.
22. Enzootic bovine leucosis [e-resource] // In: OIE Terrestrial Manual 2018. Chap 3.4.9. Pp. 1113–1124. URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.09_EBL.pdf (date of reference: 13.06.2022).
23. Yang, Y., Chen, L., Dong, M. et al. Molecular characterization of bovine leukemia virus reveals existence of genotype 4 in Chinese dairy cattle. *Virology Journal*. 2019. Vol. 16. Article number 108. DOI: 10.1186/s12985-019-1207-8.
24. Zhao X., Buehring G. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape // *Virology*. 2007. Vol. 366. Pp. 150–165.

Authors' information:

Maksim V. Petropavlovskiy¹, candidate of veterinary sciences, senior researcher, ORCID 0000-0002-9892-6092, AuthorID 676746; +7 902 877-46-57, petropavlovsky_m@mail.ru

Irina M. Donnik¹, academician of the Russian academy of sciences, doctor of biological sciences, chief researcher, ORCID 0000-0002-8593-7470, AuthorID 313786; ktqrjp7@yandex.ru

Natalya A. Bezborodova¹, candidate of veterinary sciences, senior researcher, ORCID 0000-0003-2793-5001, AuthorID 665979; n-bezborodova@mail.ru

Anatoliy M. Kovalenko², doctor of veterinary sciences, professor, ORCID 0000-0002-7219-4049, AuthorID 345276; mycobacteria@rambler.ru

Svetlana N. Belyaeva², candidate of biological sciences, associate professor, ORCID 0000-0002-2181-6899, AuthorID 1078572; belysveta2@yandex.ru

¹Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

²Belgorod State Agricultural University named after V. Gorin, Mayskiy, Russia