



ИННОВАЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ АПК INNOVATIVE DEVELOPMENT OF THE AGROINDUSTRIAL COMPLEX

УДК 636.2:619:616.155.392

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ЛЕЙКОЗНОГО ПРОЦЕССА У НОСИТЕЛЕЙ 4-го И 7-го ГЕНОТИПОВ BLV

Новосибирский государственный аграрный университет



Н.В. Батенёва,
канд. биол. наук

Ключевые слова: вирус лейкемии крупного рогатого скота, генотипирование, секвенирование, gp51, env, болезни животных, вирусы.

BLV экзогенный онковирус типа C, отличающийся от всех известных вирусов типа C млекопитающих. Ученые всего мира исследуют структуру провирусной ДНК, течение инфекции, вызванной BLV, эпизоотические особенности лейкоза. До настоящего времени данная проблема остается актуальной. Достаточно хорошо изучена структура генома вируса, однако только некоторые работы посвящены влиянию генотипа BLV на особенности течения лейкозной инфекции. Определена вирусная нагрузка BLV на 1000 здоровых клеток у животных с гематологической стадией развития лейкоза. Показана зависимость способности вируса реализовать свои лейкозогенные потенции от структуры генома BLV.

OF COURSE LEUKEMIC PROCESS IN MEDIA 4 AND 7 GENOTYPES BLV

N.V. Bateneva

Novosibirsk state agrarian University

Key words: leukemia virus, bovine, genotyping, sequencing, gp51, env, animal diseases, viruses.

BLV exogenous oncovirus type, different from all known viruses-type mammals. Scientists around the world investigate the structure of proviral DNA, the infection is caused by BLV, an epizootic features of leukemia. To date, this is still a problem. Well understood structure of the viral genome, however only some works devoted to the influence of genotype BLV in the course of leukosis infection. Defined BLV viral load per 1000 cells in healthy animals with blood stage in the development of leukemia. The dependence of the virus's ability to realize their leukozogennym potency from the structure of the BLV genome.

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV) относится к ретровирусам и обладает сходством с человеческим Т-лимфотропным вирусом 1 типа, природный носитель которого – крупный рогатый скот. BLV интегрируется в геномную ДНК В-лимфоцитов в качестве промежуточной ДНК-формы (провируса) [1–4].

С каждым годом появляется все больше публикаций, посвящённых проблеме борьбы с лейкозом крупного рогатого скота. Некоторые авторы изучают эпизоотические особенности

вируса, другие – структурные [4–6, 8–11, 24]. Однако проблема до настоящего времени остаётся более чем актуальной во всем мире [7, 26–33].

С течением времени под действием факторов внешней среды, а также физиологических, генетических особенностей организма «хозяина» вирус лейкоза способен изменять структуру генома [12, 18–21].

BLV обладает выраженной антигенной активностью [29, 31–33]. За инфекционность и антигенную активность отвечает белок gp51, в котором выявлены 3 эпитопа, способных нейтрализовать вирус [18, 33].

Поли- и моноантитела против gp51 обладают ВН-активностью, подавляют синцитийобразующую активность вируса, препятствуют выходу из клеток и вызывают лизис инфицированных клеток в присутствии комплемента [18].

До настоящего времени чаще других для типирования вируса используют участок гена env (gp 51) [2, 3, 15, 24, 28, 30].

Для исследований были взяты пробы крови крупного рогатого скота Краснодарского и Ставропольского краев, инфицированных BLV, с гематологической стадией развития лейкозной инфекции.

Из вышеуказанных проб была выделена ДНК с использованием сорбентного метода.

Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием праймеров, фланкирующих участок гена env (gp51). Детекцию продуктов амплификации производили классическим методом – нанесением образцов на агарозный гель. В дальнейшем произвели очистку продуктов амплификации, вырезав участки геля с накопленными продуктами, из которых повторно выделяли ДНК.

Вирусную нагрузку определяли методом постановки ПЦР RialTime. Реакцию амплификации проводили с плазмидной ДНК, в результате которой было определено количество вирусных клеток (Q, PCR) на 1000 здоровых.

Для проведения реакции использовали кольцевую плазмиду GAPDH (2974 п. н.), которую разрезали эндонуклеазой рестрикции. В качестве искомого фрагмента провируса BLV использовали участок гена *pol* (рис. 1), ограниченный олигонуклеотидными праймерами.

Типирование производили методом секвенирования с дальнейшим сравнением образцов с геномом BLV 1 генотипа и построением филогенетического дерева (NCBI).

Состав ПЦР смеси (расчет на 1 пробу)

Компоненты смеси, мкл	Pol, 3971 bp	GAPDG, 2974 bp
ПЦР буфер	11,5	11,5
Pr 1, 50 ng	0,5	0,5
Pr 2, 50 ng	0,5	0,5
Краситель	0,25 <i>green</i>	0,25 <i>yellow</i>
Tag pol	1,0	1,0
Вода	1,25	1,25
ДНК, 50 ng	10,0	10,0

Показатели крови определяли на автоматическом гематологическом анализаторе Exigo.

Все исследуемые нуклеотидные последовательности провируса лейкоза крупного рогатого скота относились к 4-му и 7-му генотипам BLV. Животных – носителей 7-го генотипа BLV было выявлено 20% из всех исследованных образцов ДНК, остальные 80% являлись носителями 4-го генотипа BLV.

Все исследуемые пробы были нанесены на схему с учетом вирусной нагрузки и лейкоцитоза образца, выделены цветом с учетом генотипа BLV (рис. 2).

Анализируя схему, можно провести условную дифференциацию всех исследованных образцов на три группы по типу реализации вирусных потенциалов, две из которых образовались среди носителей 4-го генотипа BLV. Первая группа состояла из животных, вирусная нагрузка

в клетках которых варьировалась от 0,7 до 460 клеток BLV, при этом содержание лейкоцитов в крови (за счет лимфоцитов) превышало физиологическую норму. У данных коров развитие лейкозной инфекции находилось в гематологической стадии, при этом содержание лейкоцитов в крови не превышало $17,5 \times 10^9$ г/л. В данном случае можно говорить о хронической форме течения инфекции.

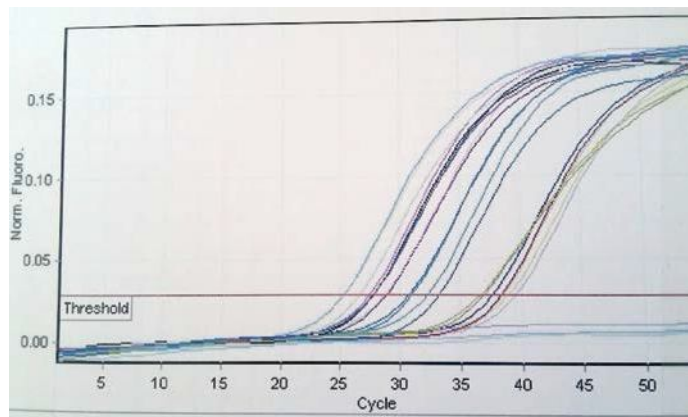


Рис. 1. Кривая накопления продуктов амплификации участка гена Pol (3971 bp)

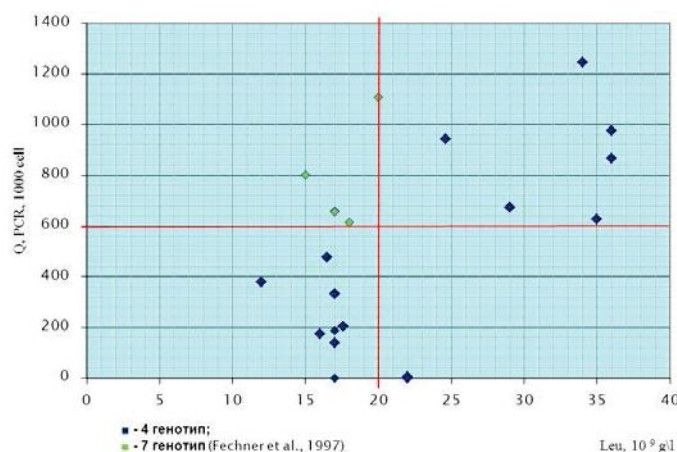


Рис. 2. Схема распределения накопления количества лейкоцитов в крови и вирусной нагрузки в зависимости от генотипа BLV

Вторая группа носителей 4-го генотипа отличалась высокими показателями содержания лейкоцитов в крови (от 24×10^9 г/л) и вирусной нагрузки (от 600 клеток BLV на 1000 здоровых клеток). На схеме видна определенная закономерность с достижением рубежа в 600 вирусных клеток на 1000 здоровых, лейкоцитоз резко увеличивается.

Животные, относящиеся к третьей группе, – носители 7-го генотипа BLV, отличались высоким содержанием вирусных клеток в крови (от 600 до 1600), но при этом содержание лейкоцитов находилось на уровне от 15 до 20×10^9 г/л.

Таким образом, при анализе образцов крови животных-носителей двух генотипов BLV прослеживается влияние структуры генома вируса на реализацию его лейкозогенных потенций.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Evaluation of total white blood cell count as a marker for proviral load of bovine leukemia virus in dairy cattle from herds with a high seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus* / I. Alvarez, G. Gutierrez, M. Gammella [et al.] // J. Vet. Res. – 2013. – N 74. – P. 744–749.
2. *Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis*. Onderstepoort / A. Burny, C. Bruck, Y. Cleuter [et al.] // J. Vet. Res. – 1985. – N 52. – P. 133–144.

3. *Mechanisms* of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human / N. Gillet, A. Florins, M. Boxus [et al.] // *Retrovirology*: 10.1186/1742-4690-4-18. PMID 17362524.
4. Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load / G. Gutierrez, H. Carignano, I. Alvarez [et al.] // *BMC Vet Res.* – 2012. – N 8. – 187 p.
5. *BLV-CoCoMo-qPCR*: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status / M. Jimba, SN. Takeshima, H. Murakami [et al.] // *BMC Vet Res.* – 2012. – N 8. – 167 p.
6. *Deep sequencing* reveals abundant no canonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia / lymphoma / N. Rosewick, M. Momont, K. Durkin [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2013. – 110 (6). – P. 2306–2311: 10.1073/pnas.1213842110. PMC 3568357. PMID 23345446.
7. *Bovine Leucosis Virus on U.S. Dairy Operations, 2007.* (PDF). NAHMS Dairy. U.S. Department of Agriculture. – 2007.
8. *Bovine Leukemia Virus* reviewed and published by WikiVet. – 2011.
9. *Johnson E. S.* Assessing the role of transmissible agents in human disease by studying meat workers. *Cell science Reviews* 2 (1). ISSN 1742-8130. Archived from the original on 2006-10-18. – 2005.
10. *OIE.* Chapter 2.4.11 Enzootic bovine leucosis (PDF). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* World Organisation for Animal Health (OIE). – 2010.
11. *The molecular* characterization of bovine leukaemia virus isolates / M. Rola-Luszczak, A. Pluta, M. Olech [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – T. 8, N 3. – P. 658–705.
12. *Buehring G. C., Philpott S. M., Choi K. Y.* Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2003. – N 19 (12). – P. 1105–1113.
13. *Влияние* экологических факторов на организм животных / И.М. Донник, И.А. Шкуратова, А.Д. Шушарин [и др.] // *Ветеринария.* – 2007. – № 6. – С. 38–42.
14. *Новые* методы исследований по проблемам ветеринарной медицины / А.М. Смирнов, М.И. Гулюкин, В.В. Субботин [и др.] // *Лабораторные методы исследований инфекционной патологии животных.* – М.: ИРА УТК, 2008. – 616 с.
15. *Особенности* течения и распространения лейкоза крупного рогатого скота на южном Урале / М.В. Петропавловский, И. М. Донник, А. Т. Татарчук [и др.] // *Аграрный вестник Урала.* – Екатеринбург, 2010. – № 10. – С. 48.
16. *Донник И. М., Джаилиди Г. А.* Профилактика лейкоза крупного рогатого скота в племенных хозяйствах Краснодарского края // *Ветеринария Кубани.* – 2013. – № 5. – С. 8–10.
17. *Донник И. М., Петропавловский М. В.* Региональная молекулярно-генетическая структура вируса лейкоза крупного рогатого скота // *Ветеринария Кубани.* – 2010. – № 3. – С. 12–13.
18. *Смирнов П. Н.* Болезнь века – лейкоз крупного рогатого скота. – Новосибирск, 2007.
19. *Смирнов П. Н., Батенёва Н. В., Белявская В. А.* Генотипическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Новосибирской области и Краснодарского края // *Вестн. НГАУ.* – 2011. – № 2 (18). – С. 81–83.
20. *Вирусные* болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина. – М.: ВНИТИБП, 2001. – 928 с.
21. *Blood D. C., Henderson J. A., Radostits O. M.* *Veterinary medicine.* – London: Baillière Tindall, 1979. – P. 611.
26. *Experimental* transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease / M. Mammerickx, D. Portetelle, K. Clercq, A. Burny // *Leuk Res.* – 1987. – N 11. – P. 353–358.
22. *Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E.* *Retroviruses* // Cold Spring Harbor (NY). – 1997.
23. *The gag* and pol genes of bovine leukemia virus: Nucleotide sequence and analysis / N.R. Rice, R.M. Stephens, A. Burny, R. V. Gilden // *Virology.* – 1985. – N 142. – P. 357–377.
24. *The nucleotide* sequence of the env gene and post-env region of bovine leukemia virus / N.R. Rice, R.M. Stephens, D. Couez [et al.] // *Virology.* – 1984. – N 138. – P. 82–93.
25. *Complete* nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses / N. Sagata, T. Yasunaga, J. Tsuzuku-Kawamura [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1985. – N 82. – P. 677–681.