

Ветеринарная вирусология

УДК 636.2:619:616.155.392

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ УСЛОВНЫХ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Н.В. БАТЕНЁВА, П.Н. СМИРНОВ, И.В. МИХНОВИЧ

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследовали 762 пробы крови от животных разных пород крупного рогатого скота, больных и инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС). При помощи программы Vector NTI были подобраны эндонуклеазы рестрикции. На основании данных, полученных при анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ), по типам паттернов выделили 11 групп, обозначенных как условные генотипы.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС), генотипы, эндонуклеаза рестрикции, полимеразная цепная реакция, породы крупного рогатого скота, *gag*, p24.

Keywords: bovine leukemia virus (BLV), genotypes, restriction enzyme, polymerase chain reaction, breeds of cattle, *gag*, p24.

BLV — инфекционный ретровирус, имеющий три основных структурных гена, которые кодируют вирусные протеины и расположены в следующем порядке: 5'-*gag-pol-env*-3'. Ген *gag* кодирует белки (p24), которые формируют коровую часть вируса и необходимы для его внутриклеточной сборки, а также высвобождения из клетки.

Генотипическая неоднородность вируса лейкоза крупного рогатого скота (bovine leukemia virus — BLV), носительство которого регистрируют как в России, так и за рубежом, продолжает вызывать интерес не только в общеприкладном, но и в прикладном аспекте. В то же время следует отметить, что этой проблеме посвящено ограниченное число публикаций, в силу чего сложить более или менее определенное мнение по проблеме затруднительно (1-13). Вместе с тем появляются сообщения об особенностях течения лейкозной инфекции, ее этиологическом агенте (3, 5, 7), о высокой степени агрессивности некоторых генотипов BLV (2).

Большинство авторов изучали BLV по *env*-гену и только некоторые исследования выполнены по *gag*-гену (1, 2, 6, 7, 10). Сведений по вариабельности гена *gag* BLV в доступной научной литературе мы не обнаружили. При этом идентифицировать вирус в организме животных по гену *gag* удается на 5-7 мес раньше, чем по гену *env* (3, 4).

Мы попытались охарактеризовать генотипическую вариабельность у вируса лейкоза крупного рогатого скота по *gag*-гену.

Методика. Исследовали 762 пробы крови от животных разных пород крупного рогатого скота, содержащихся на сельскохозяйственных предприятиях Краснодарского края (2006-2009 годы) и серопозитивных в реакции иммунодиффузии (РИД+) со штаммом gr 51 BLV.

ДНК провируса лейкоза выделяли из лейкоцитов крови сорбентным методом с использованием набора Diatom DNA Prep 100 (ООО Лаборатория «Изоген», Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Для ПЦР использовали наборы GenePak™ PCR test (ООО Лаборатория «Изоген», Россия), включающие положительный и отрицательный контроли для вируса лейкоза (*gag*).

При выполнении ПЦР режим амплификации, предложенный M.R. Mohammadabadi (10), оптимизировали, исходя из ожидаемой длины фрагмен-

та. Число циклов элонгации подбирали эмпирически для наиболее высокого выхода специфичного ампликона при минимальном содержании неспецифических фрагментов. Реакцию проводили в амплификаторе Mastercycler Gradient (фирма «Eppendorf AG», Германия). Объем реакционной смеси — 40 мкл, температурно-временной режим: начальная денатурация при 94 °С в течение 3 мин; 42 цикла (денатурация при 94 °С — 15 с, отжиг при 58 °С — 15 с, элонгация при 72 °С — 30 с); финальная элонгация при 72 °С в течение 3 мин.

Для выявления вирусоносителей по гену *gag* (p24) (ожидаемая длина фрагмента 347 п.н.) применили олигонуклеотидные праймеры 5'-GGA GGW GGR AAG ATG CGA АСТ АТТ-3' и 5'-GTC CGY TCT АСУ ААС ССТ GAA СТТ-3' (10). Праймеры синтезировали в лаборатории «МедиГен» (г. Новосибирск). Дизайн праймеров осуществлен, исходя из последовательности полноразмерной копии гена *gag*, взятой из базы данных NSBI (National Center for Biotechnology Information, gi40796166, NP_777381.1).

При анализе структуры наиболее вариабельных участков (с целью подбора эндонуклеаз рестрикции для оценки их полиморфизма) использовали программу Vector NTI.

Результаты. Длина области *gag*-гена, фланкированная специфичными праймерами, составляла 347 п.н. На рисунке 1 приведена типичная электрофореграмма продуктов амплификации, свидетельствующая о наличии провирусной ДНК (интегрирована в ДНК клетки животного-хозяина). Во всех анализируемых образцах ДНК диагностировался фрагмент, соответствующий расчетной длине ампликона (347 п.н.).

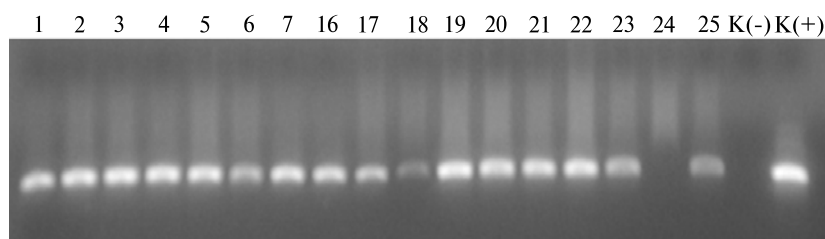


Рис. 1. Типичная электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации области гена *gag* провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (347 п.н.), полученных с использованием образцов ДНК (1-25) обследованных животных красной степной породы (СПК «Колос», Краснодарский край, Динский р-н): К(-) — отрицательный контроль, К(+) — положительный контроль (GenePak™ PCR test, ООО Лаборатория «Изоген», Россия).

ПЦР-анализ наличия провирусной ДНК у крупного рогатого скота с использованием праймеров, специфических для области *gag*-гена размером 347 п.н., показал (табл. 1), что доля РИД-серопозитивных животных с отрицательным результатом в ПЦР составляла 2,6 %.

1. Наличие провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (область гена *gag*, 347 п.н.), выявляемой методом ПЦР у животных, серопозитивных в реакции иммунодиффузии (РИД) (Краснодарский край, 2006-2009 годы)

Порода крупного рогатого скота	Число животных, гол.		
	РИД+	РИД+, ПЦР+	РИД+, ПЦР-
Черно-пестрый голштинизированный скот	284	263	21
Красная степная	255	244	11
Айрширский скот	223	217	6
Всего	762	724	38

Примечание. Черно-пестрый голштинизированный скот — ЗАО «Агроном», красная степная порода — СПК «Колос», айрширский скот — ПЗ «им. В.И. Чапаева».

При изучении структуры последовательностей *gag*-гена, имеющих-

ся в ресурсе NSBI, проанализировали данные для 11 изолятов BLV, в результате чего были выявлены наиболее варибельные участки *gag*-гена. На этом основании для оценки полиморфизма длин рестриционных фрагментов выбрали две эндонуклеазы (HaeIII и FaeI). Процедура определения полиморфизма длин рестриционных фрагментов была предварительно оптимизирована: ПЦР — по критерию максимального выхода ампликона, ПДРФ — по полноте гидролиза, электрофоретическое разделение — по параметрам режима, обеспечивающим наибольшую четкость паттернов. Для генотипирования с использованием ограниченной панели с ДНК от животных, серопозитивных к BLV в РИД, образцы (по 10 из каждой панели) отбирали случайным образом, в результате чего на панели располагались изоляты от особей разной породной и территориальной принадлежности. Пример электрофореграммы продуктов гидролиза ампликона рестриктазой HaeIII представлена на рисунке 2.

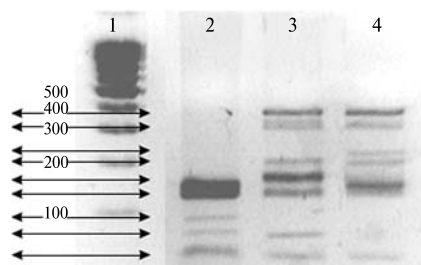


Рис. 2. Пример электрофореграммы продуктов гидролиза эндонуклеазой рестрикции HaeIII ампликонов (347 п.н.) гена *gag* вируса лейкоза крупного рогатого скота, полученных с использованием провирусной ДНК из лейкоцитов цельной крови животных: 1 — маркер молекулярных масс (ООО Лаборатория «Медиген», г. Новосибирск), 2-4 — опытные образцы (случайная выборка; соответственно II, X и IV условные генотипы провируса).

Метод использовали для исследования черно-пестрого голштинизированного скота (ЗАО «Агроном»), животных красной степной породы (СПК «Колос») и айрширского скота (ПЗ «им. В.И. Чапаева») (Краснодарский край, 2006-2009 годы).

Сравнивая фактические и ожидаемые спектры продуктов гидролиза, мы условно разделили изученные варианты вируса BLV по полиморфизму *gag*-гена. При гидролизе рестриктазой HaeIII можно визуализировать не менее 8 групп паттернов, Fae I — 4 группы, включая вариант, в котором отсутствуют сайты рестрикции. То есть всего с использованием двух рестриктаз можно выделить не менее 11 условных генотипов, регистрируемых у изученных групп крупного рогатого скота: 8 — у животных айрширской породы, 6 — у черно-пестрого голштинизированного и 3 — у красного степного скота. При этом у животных всех обследованных пород были зарегистрированы три одинаковых условных генотипа провируса — I, II и III (табл. 2).

2. Распределение (%) условных генотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота (по гену *gag*) в обследованных хозяйствах Краснодарского края (2006-2009 годы)

Хозяйство, порода	Условный генотип										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
ЗАО «Агроном», красная степная	17	8	75	—	—	—	—	—	—	—	—
СПК «Колос», черно-пестрый голштинский скот	44	12	6	6	13	19	—	—	—	—	—
ПЗ «им. В.И. Чапаева», айрширская	40	6	6	—	—	—	7	20	7	7	7
В среднем	36	10	27	2	5	7	2	7	2	2	2

Примечание. Прочерки означают, что вариант не выявлялся.

Таким образом, нами изучено распространение условных генотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) по *gag*-гену в трех хозяйствах Краснодарского края. Среди инфицированных BLV животных наибольшее разнообразие генотипов провируса BLV было выявлено у крупного рогатого скота айрширской породы, наименьшее — у животных

красной степной породы. Следовательно, можно предположить наличие взаимосвязи между породной принадлежностью и восприимчивостью животного к определенному генотипу BLV по *gag*-гену.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чичина С.В. Роль аллельной варибельности генов цитокинов в формировании резистентности крупного рогатого скота к лейкозу. Автореф. канд. дис. Новосибирск, 2005.
2. Дробот Е.В. Результаты изучения генотипического разнообразия вируса лейкоза крупного рогатого скота и особенности эпизоотологического и гематологического проявления. Автореф. канд. дис. Новосибирск, 2007.
3. Иванов О.В., Федотов В.П., Крючкова Е.Н. Об эффективности серодиагностики лейкоза коров при трематодозной инвазии. С.-х. биол., 2009, 2: 111-113.
4. Крикун В.А. Лейкоз крупного рогатого скота и иммунологическая толерантность. Ветеринария, 2002, 6: 7-9.
5. Смирнов П.Н. Болезнь века — лейкоз крупного рогатого скота. Новосибирск, 2007.
6. Смирнов П.Н., Грачева Н.В., Белявская В.А. Генотипическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота разной породной принадлежности. Аграрный вестник Урала, 2009, 4: 89-91.
7. Петропавловский М.В., Донник И.М., Татарчук А.Т. Методология снижения инфицированности животных вирусом лейкоза в оздоравливаемых стадах крупного рогатого скота. Екатеринбург, 2009.
8. Yang D., Snanks R.D., Stewart J.A., Lewin H.A. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holsten cattle with persistent lymphocytosis. PNAS USA, 1993, 90: 6538-6541.
9. Beier D., Siakkou H.A. Comparison of serological tests for the diagnosis of enzootic bovine leukosis and eradication of infection from a large herd. Tierarztliche Umschau., 1994, 49(6): 356-360.
10. Mohammadabadi M.R. Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in Yaroslavl', Mongolian and Black pied cattle by PCA. Cell. Mol. Biol. Lett., 2004, 9(4A): 766-768.
11. Riebe R., Blankenstein P., Starick E., Bondzio A. Establishment of a new bovine leucosis virus producing cell line. J. Virol. Meth., 2004, 121(2): 239-246.
12. Johnston E.R., Albritton L., Radke K. Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of bovine leukemia virus surface protein. J. Virol., 2002, 76(21): 10861-10872.
13. Licursi M., Inoshima Y., Yokoyama T., Gonzales E., Sentsui H. Genetic heterogeneity bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. Virus Res., 2002, 86: 101-110.

ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный
аграрный университет,
630039 г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 162,
e-mail: ngaufiziologi@mail.ru

Поступила в редакцию
27 февраля 2012 года

A STUDY OF HETEROGENEITY OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS GENOTYPES IN CATTLE

N.V. Bateneva, P.N. Smirnov, I.V. Mikhnovich

S u m m a r y

By polymerase chain reaction (PCR), a proviral DNA was tested in 762 blood samples from cattle of different breeds, sick and infected with bovine leukemia virus, to examine a viral heterogeneity. Using the Vector NTI software, the appropriate endonucleases were found out for RFLP analysis. Based on data obtained from the analysis of polymorphisms of restriction fragment length, the 11 groups were defined as genotypes according to the types of patterns.

Новые книги

Борисенко Е.Г., Ванькова А.А., Войно Л.И., Сидоренко О.Д. **Микробиология.** М.: изд-во «Инфра-М», 2010, 287 с.

Учебник представляет современные данные по общей микробиологии, биотехно-

логии и биоконверсии возобновляемых ресурсов. Впервые отходы сельского хозяйства рассматриваются как исходное сырье для получения полезных продуктов: органических удобрений, кормовых добавок, лечебных препаратов и т.п.