

Ветеринарная вирусология, иммунология

УДК 636.52/.58:619:578:575

doi: 10.15389/agrobiology.2018.4.842rus

**ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА ПТИЦ ПОДГРУППЫ К
В РОССИИ И ЕГО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ***

А.М. БОРОДИН¹, Я.И. АЛЕКСЕЕВ^{2, 3}, Н.В. КОНОВАЛОВА^{2, 3},
Е.В. ТЕРЕНТЬЕВА^{2, 3}, Д.Н. ЕФИМОВ⁴, Ж.В. ЕМАНУЙЛОВА⁴,
С.В. СМОЛОВ⁴, О.А. ОГНЕВА⁴, В.И. ФИСИНИН⁵

Вирус лейкоза птиц (ВЛП) принадлежит к роду *Alpharetrovirus* семейства *Retroviridae*. Геном вируса представлен одноцепочечной РНК длиной более 7 тыс. нуклеотидов. У кур описаны подгруппы ВЛП А, В, С, D, J, К и Е. Их классифицируют по антигенам белка оболочки GP85. ВЛП широко распространен по всем миру, вызывает различные патологии, снижает продуктивность и наносит огромный ущерб промышленному птицеводству. ВЛП подгруппы К был впервые обнаружен в странах Азии. Исследования превалентности ВЛП подгруппы К немногочисленны и на территории России ранее не проводились. Нашей целью было изучение распространения ВЛП этой подгруппы у кур из российских птицеводческих хозяйств с использованием тест-системы, разработанной для идентификации генома ВЛП подгруппы К методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), и анализ свойств ВЛП подгруппы К. Испытание тест-системы проводили на 5292 образцах ДНК кур отечественного мясного кросса бройлерного типа из хозяйства Московской области и у кур мясных и яичных пород из хозяйств в разных регионах России. Нуклеотидные последовательности гена *gp85* ВЛП подгруппы К обнаружили у 177 кур (3,3 %) одного из хозяйств Московской области. Секвенирование фрагментов *gp85* показало наличие двух вариантов ВЛП подгруппы К у кур этого хозяйства: один имел сходство 96 % со штаммами Ok1 009, GDFX0601, GDFX0602, GDFX0603, Km_5845 и др., второй — сходство до 100 % со штаммом TW-3593 ВЛП подгруппы К. С использованием референсной полногеномной последовательности KU605774 штамма GD14LZ ВЛП подгруппы К в базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank обнаружены 22 полноразмерные геномные последовательности со степенью сходства с последовательностями гена *gp85* штамма GD14LZ от 95 до 100 %, относящиеся к ВЛП подгруппы К. Построение филогенетических деревьев с использованием последовательностей гена *gp85* показало, что вирусы подгруппы К образуют отдельную, отличную от остальных группу, которая может быть разделена на четыре кластера на основании гетерогенности длинных концевых повторов. Вирусы подгруппы К обладают набором из четырех различных 3'-UTR, которые характерны для патогенного ВЛП подгруппы J и для менее патогенного ВЛП подгруппы Е, имеются и 3'-UTR, специфичные для подгрупп К (ВЛП К и Ok1). Кроме Московской области, ВЛП подгруппы К обнаружен нами в Калининградской, Ленинградской, Свердловской и Новгородской областях. Таким образом, распространение ВЛП этой подгруппы не ограничивается странами Азии. Анализ данных литературы показывает, что ВЛП подгруппы К может вызывать глиомы и миокардиты. Нужна программа его контроля, поскольку экзогенные и эндогенные формы ВЛП даже при субклинической инфекции могут вести к большому экономическим потерям.

Ключевые слова: вирус лейкоза птиц, тест-система для выявления вируса лейкоза птиц подгруппы К, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Вирус лейкоза птиц (ВЛП) принадлежит к роду *Alpharetrovirus* семейства *Retroviridae*. Геном вируса представлен одноцепочечной РНК длиной более 7 тыс. нуклеотидов. Для кур специфичны ВЛП подгрупп А, В, С, D, J, К и Е, которые различаются антигенными участками белка оболочки GP85 (1-3). ВЛП может вызывать не только лимфоидный и миелоидный лейкоз, но и новообразования других тканей (4-6) включая глиомы

* При проведении исследования использовано научное оборудование центра коллективного пользования «Биотехнология» Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии. Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО России, государственное задание ФГБУ СГЦ «Смена» № 007-01359-17-00, в рамках выполнения Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017-2025 годы. Подпрограмма «Создание отечественных конкурентоспособных мясных кроссов бройлерного типа». Часть работы, связанная с выделением ДНК с помощью роботизированного комплекса для молекулярно-генетических исследований Савраска-02 (ООО «Синтол», Россия), была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.579.21.0012 от 05.06.2014 г. ID RFMEFI57914X0012).

и нейрофибросаркомы (7, 8). Определить подгруппу вируса можно на основании анализа нуклеотидной последовательности гена белка оболочки GP85 (3, 9, 10). По способу инфицирования клеток хозяина ВЛП делятся на экзогенные (1, 4) и эндогенные. Вирусы подгрупп А, В, С, D, J и К относятся к экзогенным и более патогенны, чем эндогенный вирус подгруппы Е, у которого патогенность слабая или отсутствует. Геном эндогенных вирусов встроен в геном хозяина и передается, как и остальные гены хозяина, вертикально. Экзогенные вирусы способны распространяться посредством одной из форм вертикальной передачи — конгенитально, то есть через инфицирование кур и далее через эмбрион. Эндогенные ВЛП иногда могут вести себя как экзогенные, заражая кур горизонтально. Обычно смертность кур от инфекции ВЛП не превышает нескольких процентов, но при активной форме инфекции смертность может составлять более 20 % (9). ВЛП широко распространен, вызывает различные патологии, снижает продуктивность и наносит огромный ущерб промышленному птицеводству.

ВЛП подгруппы К обнаружен недавно в странах Азии — Китае (3, 10, 11), Японии (8) и на Тайване (12). Патогенность этих изолятов не ясна. Существует опасность рекомбинации ВЛП подгруппы К с вирусами других подгрупп, в частности с ВЛП-*J*, что может привести к появлению новой подгруппы ВЛП с более высокой патогенностью (10, 11). Исследования распространенности ВЛП подгруппы К немногочисленны и на территории России ранее не проводились (13).

В этой статье сообщается о первой идентификации ВЛП подтипа К в российских промышленных популяциях кур и представлены результаты его молекулярно-генетического изучения.

Нашей целью было выявление ВЛП подгруппы К в птицеводческих хозяйствах России с использованием разработанной тест-системы на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и последующий анализ свойств ВЛП подгруппы К.

Методика. Праймеры и зонд для ПЦР-РВ и секвенирования по Сэнгеру были синтезированы в ООО «Синтол». Они подбирались так, чтобы амплифицировать ДНК ВЛП подгруппы К без амплификации известных эндовирусов. Использовали в качестве флуоресцентной метки карбоксифлуоресцеин (6FAM), в качестве гасителя флуоресценции — краситель BHQ-1, для 3'-концевой модификации зонда — фосфат (р).

Для выявления ВЛП подтипа К методом ПЦР-РВ использовали следующие праймеры и зонд:

ALVKF (5'→3') — CGGAGCATTGACACGCTTTCAGA,

ALVKR (5'→3') — GTGGTTGCGGCGGAGGAGGA,

KPL (5'→3') — (6FAM)CCACCTCGTGAG(dT-BHQ-1)TGCGGCC-р.

Длина синтезируемого ампликона — 72 п.н., фрагмент представляет собой часть гена *gp85*, кодирующего белок оболочки GP85.

Праймеры, которые были использованы для ПЦР и секвенирования ДНК ВЛП подтипа К:

ALVKF (5'→3') — CGGAGCATTGACAAGCTTTCAGA,

SEQA-KR (5'→3') — CGCGATCCCCACAAATGAGGAAA.

Длина продукта амплификации (часть гена *gp85*, кодирующего белок оболочки GP85) — 466 п.н.

Типирование 3'-концевых фрагментов генов *gp85* и вариантов длинных концевых повторов (LTR) осуществляли с помощью трех обратных праймеров и универсального праймера SEQKF:

SEQKF (5'→3') — GGCCGTTCAATTTGCTGAAAGGA,

SEQRRKm (5'→3') — CAGGCTAGGCACTTAAGTACAACA,
SEQKRJ (5'→3') — GGGCACTTAAATACAGTATCTCTG,
SEQKROKI (5'→3') — CAATCAGCATGCGCCACGATGAA.

Для амплификации 3'-концевых фрагментов гена *gp85* и длинных концевых повторов, сходных с эндовирусными, применяли специальную пару праймеров, которые исключали амплификацию последовательностей ДНК ВЛП подгруппы Е:

SEQKF12 (5'→3') — GTGGCTCCTCCTCCGCCGCAA,
SEQKREV (5'→3') — GCAGCTTATATAATCGTGCATAGC.

Испытание тест системы проводили на 5292 образцах ДНК кур мясного кросса бройлерного типа из хозяйства в Московской области.

ДНК выделяли из перьев с использованием набора М-Сорб (ООО «Синтол», Россия) с помощью роботизированного комплекса для молекулярно-генетических исследований Савраска-02 (ООО «Синтол», Россия). Фрагмент пера длиной 0,3-0,5 см помещали в пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 400 мкл лизирующего раствора и инкубировали при 60 °С в течение 20 мин с перемешиванием, лизат осаждали в высокоскоростной микроцентрифуге Циклотемп-902 (ЗАО «Циклотемп», Россия) в течение 3 мин при 13 тыс. об/мин. Супернатант переносили в пробирку объемом 1,5 мл и продолжали выделение в соответствии со стандартным протоколом к набору М-Сорб.

Режим для проведения ПЦР был универсальным, в реакцию брали 1,5 мкл выделенной ДНК. Концентрация праймеров в реакционной смеси составляла 450 нМ, концентрация зонда — 150 нМ. ПЦР-РВ (канал детекции — FAM) проводили на приборе АНК-48 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) по следующей программе (45 циклов): денатурация при 93 °С — 10 с, отжиг при 60 °С — 30 с. Для амплификации ДНК использовали реакционную смесь (10 мкл) для ПЦР-РВ (Кат. № М-428, ООО «Синтол», Россия).

Специфичность ПЦР-РВ подтверждали секвенированием продуктов амплификации, полученных при помощи праймеров ALVKF и SEQAKR, на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия).

Для филогенетического анализа и подбора специфических участков ДНК при типировании ВЛП подгруппы К и секвенировании использовали геномные последовательности штаммов ВЛП разных подгрупп: подгруппа А — MQNCSU-A (DQ365814); подгруппа В — Schmidt-Ruppin В (AF052428); подгруппа С — Prague С (J02342.1); подгруппа D — Schmidt-Ruppin D (D10652); подгруппа Е — ev-1 (AY013303); подгруппа J — HPRS103 J (Z46390); подгруппа К — Km_6222 (AB764103), Km_5943 (AB669897), Km_5845 (AB670314), Km_5844 (AB670312), Km_6202 (AB764101), Km_5892 (AB682778), Km_6181 (AB764100), Km_6349 (AB764106), Km_6249 (AB764104), Km_6343 (AB764105), Sp-53 (AB617820), SD110503R (KF738251), Sp-40 (AB617819), JS14CZ02 (KY490696), GDFX0601 (KP686142), GDFX0602 (KP686143), TW-3593 (HM582658), GD14LZ (KU605774), JS11C1 (KF746200), GDFX0603 (KP686144), JS14CZ01 (KY490695), Oki 009 (AB669433) (в скобках указаны номера последовательностей, депонированных в GenBank). Консервативные участки генома ВЛП, специфичные для подгруппы К, подбирали с помощью программ ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Построение филогенетических деревьев для ВЛП разных подгрупп проводили при помощи программы ClustalW с использованием алгоритма Rooted phylogenetic tree (UPGMA).

Результаты. Подобранные участки генома ВЛП, специфичные для подгруппы К, использовали для амплификации и секвенирования ДНК. Положительным контролем при разработке системы служил синтетический фрагмент ДНК, соответствующий расчетному ампликону для ВЛП подгруппы К. Аналитическую чувствительность системы оценивали в тесте с разведениями положительного контроля. Она составила 100 копий генома ВЛП подгруппы К, или приблизительно 70 геном-эквивалентов/мкл в исходной пробе. В качестве отрицательного контроля использовали раствор, не содержащий разведений синтетического ампликона.

С помощью разработанной тест-системы изучили 5292 образца ДНК от бройлеров одного из хозяйств Московской области. Специфичные последовательности гена *gp85* ВЛП подгруппы К обнаружили у 177 птиц, что составляет 3,3 % от общего числа. Были проанализированы пробы от кур из других регионов России. В результате геномные последовательности ВЛП подгруппы К также выявили у птицы из ряда областей — Калининградской (3 образца), Ленинградской (2 образца), Свердловской (5 образцов) и Новгородской (3 образца). Учитывая, что комплектование одной из птицефабрик в Калининградской области, где детектировали ВЛП подгруппы К, происходит из Германии, география распространения ВЛП этого типа в Европе, вероятно не ограничивается Россией.

Для подтверждения специфичности тест-системы секвенировали фрагменты гена *gp85*, используя праймеры ALVKF и SEQA-KR и ДНК 12 кур из хозяйства Московской области. Анализ выявил два варианта геномных последовательностей ВЛП подгруппы К. Вирус в одной группе имел сходство 96 % со штаммами ВЛП Оки 009, GDFX0601, GDFX0602, GDFX0603, Km_5845 и др., во второй — сходство до 100 % со штаммом TW-3593. Секвенирование показало, что оба варианта исследованных ВЛП имели LTR, сходные с таковыми у ВЛП подгруппы Е.

При анализе географической распространенности и связи ВЛП подгруппы К с заболеваниями кур на основании данных GenBank в качестве референсной использовали последовательность генома изолята GD14LZ ВЛП подгруппы К (KU605774) (3). Наличие сходных с геномом GD14LZ последовательностей выявило страны, в которых распространен ВЛП подгруппы К. В базе данных GenBank был обнаружен ряд полноразмерных геномных последовательностей ВЛП со сходством нуклеотидных последовательностей гена *gp85* с последовательностью гена *gp85* у изолята GD14LZ от 95 до 100 %. Вариабельность вирусного генома у ВЛП подгруппы J очень высока и может достигать внутри одного организма 94,9 % (14). Был сформирован пул, состоящий из 22 полноразмерных геномных последовательностей ВЛП, предположительно относящихся к подгруппе К, и проведен их анализ (табл., рис.).

Построение филогенетических деревьев на основе нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *gp85* показало, что ВЛП подгруппы К образуют отдельную, отличную от остальных вирусов группу (см. рис., А). Анализ 3'-UTR последовательностей ВЛП подгруппы К демонстрирует их гетерогенность и то, что ВЛП подгруппы К могут быть разделены на четыре кластера (см. рис., Б). У ВЛП подгруппы К имеются четыре различных 3'-UTR области (см. табл.), сходные с 3'-UTR как патогенных штаммов ВЛП подгруппы J, так и менее патогенных вирусов подгруппы Е. Также имеются 3'-UTR, специфичные для подгруппы К, — ВЛП К и Оки.

Разные 3'-UTR могли быть получены в результате рекомбинации с другими вирусами, например известен вирус, несущий ген *gp85* от ВЛП

подгруппы А и LTR от ВЛП подгруппы J (15). ВЛП подгруппы J предположительно представляет собой продукт рекомбинации между эндогенными и экзогенными формами вируса (16).

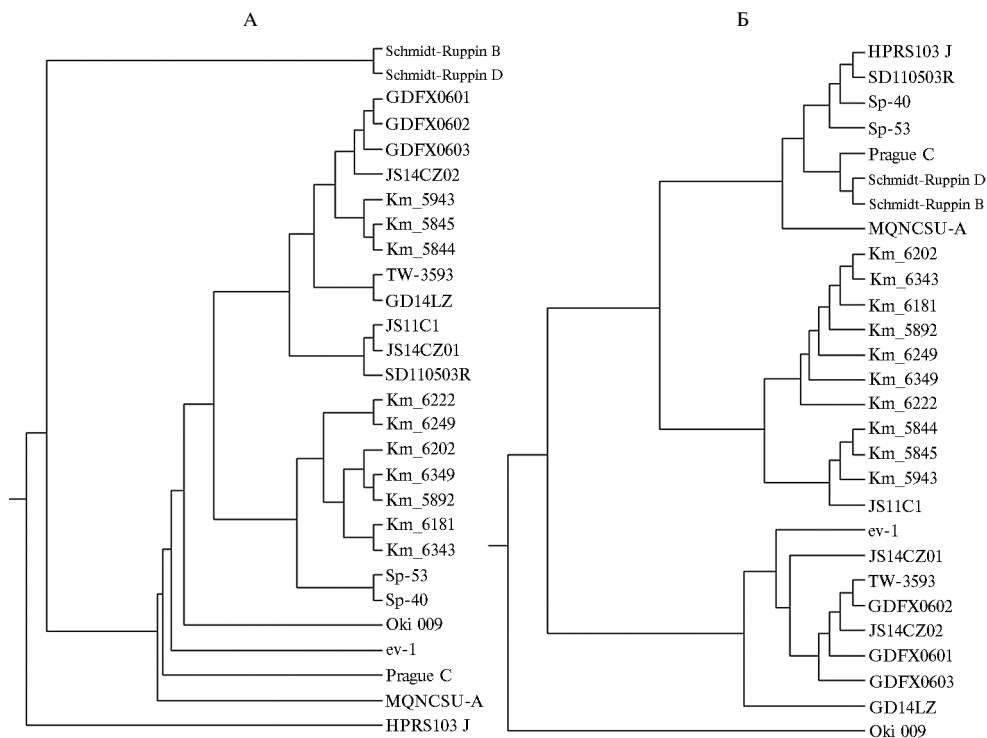
Патогенные свойства и распространение изолятов вируса лейкоза птиц подгруппы К, описанные в литературе и представленные в GenBank (NCBI)

Изолят (район)	№ депонирования в GenBank	Автор (ссылка)	Тип 3'-UTR	Патология
SD110503R (Китай)	KF738251	Chen J. н.о.	ВЛП J	Не известна
Sp-40 (Япония)	AB617819	Nakamura S. et al. (8)	ВЛП J	Глиома
Sp-53 (Япония)	AB617820	Nakamura S. et al. (8)	ВЛП J	Глиома
Km_6222 (Япония)	AB764103	Nakamura S. н.о.	ВЛП К	Не известна
Km_6343 (Япония)	AB764105	Nakamura S. н.о.	ВЛП К	Не известна
Km_6181 (Япония)	AB764100	Nakamura S. н.о.	ВЛП К	Не известна
Km_5892 (Япония)	AB682778	Nakamura S. et al. (17)	ВЛП К	Миокардит
Km_6249 (Япония)	AB764104	Nakamura S. н.о.	ВЛП К	Не известна
Km_6349 (Япония)	AB764106	Nakamura S. н.о.	ВЛП К	Не известна
Km_6222 (Япония)	AB764103	Nakamura S. н.о.	ВЛП К	Не известна
Km_5844 (Япония)	AB670312	Ochi A. et al. (18)	ВЛП К	Глиома
Km_5845 (Япония)	AB670314	Ochi A. et al. (18)	ВЛП К	Пролиферация астроцитов
Km_5943 (Япония)	AB669897	Ochi A. et al. (18)	ВЛП К	Не известна
JS11C1 (Китай)	KF746200	Cui N. et al. (10)	ВЛП К	Не известна
JS14CZ01 (Китай)	KY490695	Shao H. et al. (11)	ВЛП Е	Не известна
TW-3593 (Тайвань)	HM582658	Chang S.W. et al. (12)	ВЛП Е	Не известна
GDFX0601 (Китай)	KP686142	Jianyong H. н.о.	ВЛП Е	Не известна
GDFX0602 (Китай)	KP686143	Jianyong H. н.о.	ВЛП Е	Не известна
GDFX0603 (Китай)	KP686144	Jianyong H. н.о.	ВЛП Е	Не известна
JS14CZ02 (Китай)	KY490696	Shao H. et al. (11)	ВЛП Е	Не известна
GD14LZ (Китай)	KU605774	Li X. et al. (3)	ВЛП Е	Не известна
Oki 009 (Япония)	AB669433	Ochi A. et al. (18)	Oki	Не известна

Примечание. н.о. — не опубликовано (депонировано в GenBank).

Анализ литературы показывает, что ВЛП подгруппы К может вызывать глиомы и миокардиты (8, 17, 18) — нетипичные для ВЛП патологии. В случае вируса лейкоза птиц механизм патогенеза изучен неполно. Предполагается, что высокая изменчивость ретровирусов может вносить вклад в их вирулентность и патогенез (19). В LTR областях у некоторых штаммов ВЛП присутствует E элемент, который не является онкогеном, но увеличивает патогенность вирусов (20). Некоторые из изученных последовательностей ВЛП подгруппы К имеют последовательности, сходные с E элементом. Примером может служить штамм SD110503R (KF738251) из Китая (о патогенности этого штамма ничего не известно, поскольку опубликована только геномная последовательность в GenBank). Два штамма ВЛП, вызывающие глиому, описаны в Японии: это Sp-40 (AB617819) и Sp-53 (AB617820). Их геномы содержат небольшой фрагмент длиной 27 нуклеотидов, сходный с E элементом (8) (см. табл.). Один из механизмов патогенеза при заражении вирусом лейкоза птиц — инсерционный мутагенез (21, 22), также может происходить изменение экспрессии генов клетки-хозяина за счет дополнительной транскрипции с LTR ВЛП (23, 24). Многие в механизмах проявления инфекции остается неясным, поскольку спектр заболеваний, вызываемый ВЛП, достаточно широк. Например, в развитии гемангиом предполагается ведущая роль инсерционного мутагенеза с изменением экспрессии гена *met* (21), другие авторы подчеркивают важность участия белка оболочки GP85 в развитии этого заболевания (24). Есть данные, что белок оболочки служит основной детерминантой при лимфоидном и миелоидном лейкозе (25). Можно ожидать, что наличие ВЛП подгруппы К снижает продуктивность птицы. Так, считается что ВЛП с LTR, сходными с LTR ВЛП подгруппы Е, не обладают заметной патогенностью. Однако проведенный метагеномный анализ возможного инфекционного агента, ставшего причиной до 20 % потерь куриного стада

(26), показал, что у этого вируса нуклеотидные последовательности проявляют 100 % сходства с геном *gp85* и LTR ВЛП штамма TW-3593, имеющего LTR ВЛП подгруппы Е.



Филогенетические деревья, построенные на основе сравнения последовательностей гена *gp85* белка оболочки (А) и 3'-UTR (Б) у штаммов разных подтипов вируса лейкоза птиц из GenBank. Описание штаммов см. в разделе «Методика».

Экзогенные и эндогенные вирусы лейкоза птиц могут вызывать большие экономические потери даже при субклинической инфекции (6, 27). Для изучения патогенных свойств вариантов ВЛП подгруппы К, обнаруженных нами у мясного кросса бройлерного типа, 123 инфицированные птицы в возрасте 58 сут были изолированы от основного стада. В возрасте 156 сут у 6 павших птиц не выявили неопластических процессов.

Итак, разработана тест-система ПЦР в реальном времени для детекции вируса лейкоза птиц подгруппы К, при помощи которой вирус этой подгруппы обнаружен в России. Таким образом, распространение ВЛП подгруппы К не ограничивается странами Азии. Анализ данных литературы позволяет говорить о возможной патогенности ВЛП подгруппы К, поэтому нужна программа его мониторинга и контроля.

¹НП Институт медико-биологических исследований,
603000 Россия, г. Нижний Новгород, ул. Студеная, 10,
e-mail: Aborodinn@sinn.ru;

²ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
биотехнологии,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: jalex@iab.ac.ru;

³ООО «Синтол»,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: jalex@syntol.ru ☒;

⁴ФГБУ Селекционно-генетический центр «Смена»,
141327 Россия, Московская обл., пос. Березняки,
e-mail: Smena@tsinet.ru, dmi40172575@yandex.ru ☒;

Поступила в редакцию
27 ноября 2017 года

DETECTION OF AVIAN LEUKEMIA VIRUS SUBGROUP K IN RUSSIA AND ITS MOLECULAR GENETIC ANALYSIS

A.M. Borodin¹, Ya.I. Alekseev^{2, 3}, N.V. Konovalova^{2, 3}, E.V. Terentyeva^{2, 3}, D.N. Efimov⁴,
Zh.V. Emanuilova⁴, S.V. Smolov⁴, O.A. Ogneva⁴, V.I. Fisinin⁵

¹Non-profit Partnership Institute of Medico-Biological Research, 10, ul. Studenaya, Nizhni Novgorod, 603000 Russia, e-mail Aborodinn@sinn.ru;

²All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Federal Agency of Scientific Organizations, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail jalex@iab.ac.ru (✉ corresponding author);

³LLC Syntol, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail jalex@syntol.ru;

⁴Breeding and Genetic Center Smena, Federal Agency of Scientific Organizations, pos. Bereznyaki, Moscow Province, 141327 Russia, e-mail Smena@tsinet.ru, dmi40172575@yandex.ru (✉ corresponding author);

⁵Federal Scientific Center All-Russian Research and Technological Poultry Institute RAS, Federal Agency of Scientific Organizations, 10, ul. Ptitsogradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141315 Russia, e-mail olga@vnitip.ru, vnitip@vnitip.ru

ORCID:

Borodin A.M. orcid.org/0000-0002-1478-1261

Alekseev Ya.I. orcid.org/0000-0002-1696-7684

Konovalova N.V. orcid.org/0000-0003-4316-1077

Terentyeva E.V. orcid.org/0000-0003-2777-0948

Efimov D.N. orcid.org/0000-0002-4152-2476

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The study was carried out with the equipment of «Biotechnology» center (All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology).

Supported financially by Federal Agency of Scientific Organizations, the state assignment for Breeding and Genetic Center Smena № 007-01359-17-00 in the framework of the Federal Scientific and Technical Program of agricultural development for 2017-2025, Subprogram «Development of competitive national broiler meat cross»

Received November 27, 2017

doi: 10.15389/agrobiology.2018.4.842eng

Abstract

The Avian leukemia virus (ALV) belongs to the genus *Alpharetrovirus* (*Retroviridae*). The genome of the virus is a single-stranded RNA of more than 7,000 nucleotides in length. The ALV subgroups A, B, C, D, J, K and E are specific viruses of chicken. ALV classification is based on the type-specific envelope protein antigens, GP85. ALV is widely spread all over the world, causes various diseases, reduces productivity and leads to huge damage to poultry industry. The viruses of subgroup K were first discovered in Asian countries. Studies of the prevalence of ALV of subgroup K are few and have not been conducted in Russia before. Our goal was to study the spread of the ALV of this subgroup to the chickens of Russian poultry farms using a test system designed to identify the genome of the ALV subgroup K by real-time PCR and analysis of the properties of the ALV of subgroup K. The test of the real-time PCR test system was carried out on 5292 DNA samples of chickens of domestic broiler meat type of one of the farms in the Moscow Province and in chickens of meat and egg breeds from various regions of Russia. The ALV-K-specific gene *gp85* sequences were found in 177 (3.3 %) broilers of one of the farms in the Moscow Province. Sequencing of *gp85* gene fragments revealed the presence of two groups of different ALV subgroup K in the chickens of this farm: one had 96 % similarity to the ALV subgroup K strains Oki 009, GDFX0601, GDFX0602, GDFX0603, Km_5845 etc., and the other - up to 100 % similar to ALV subgroup K strain TW-3593. Using the reference sequence of the ALV subgroup K strain GD14LZ (KU605774), 22 full-length genomic sequences, belonging to ALV subgroup K, with 95 to 100 % similarity to the GD14LZ *gp85* gene sequences were detected in GenBank. The construction of phylogenetic trees based on the *gp85* gene sequences showed that subgroup K viruses form a separate group, distinct from the rest of the viruses, which can be divided into four clusters based on differences in long terminal repeats. The subgroup K viruses have a set of four different 3'UTR sequences belonging to both the pathogenic ALV subgroup J and the less pathogenic ALV subgroup E, and there are also ALV K and Oki, the ALV-K-specific 3'UTRs. In addition to the Moscow region, ALV subgroup K was found in the Kaliningrad, Leningrad, Sverdlovsk, and Novgorod regions of Russia. Thus, the distribution of ALV subgroup K is not limited to the countries of Asia. Scientific publications show that ALV subgroup K can cause gliomas and myocarditis. Literature data allows us to say that ALV subgroup K can be pathogenic and these viruses need a control program, because even the subclinical form of exogenous and endogenous ALV can lead to large economic losses.

Keywords: avian leukosis virus subgroup K, real time PCR, ALV subgroup K detection.

REFERENCES

1. Lloyd Spencer J. Progress towards eradication of lymphoid leukosis viruses — a review. *Avian Pathol.*, 1984, 13(4): 599-619 (doi: 10.1080/03079458408418560).
2. Payne L.N., Brown S.R., Bumstead N., Howes K., Frazier J.A., Thouless M.E. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *J. Gen. Virol.*, 1991, 72: 801-807 (doi: 10.1099/0022-1317-72-4-801).
3. Li X., Lin W., Chang S., Zhao P., Zhang X., Liu Y., Chen W., Li B., Shu D., Zhang H., Chen F., Xie Q. Isolation, identification and evolution analysis of a novel subgroup of avian leukosis virus isolated from a local Chinese yellow broiler in South China. *Arch. Virol.*, 2016, 161(10): 2717-2725 (doi: 10.1007/s00705-016-2965-x).
4. Crittenden L.B. Exogenous and endogenous leukosis virus genes — A review. *Avian Pathol.*, 1981, 10(2): 101-112 (doi: 10.1080/03079458108418464).
5. Payne L.N., Fadly A.M. Leukosis/sarcoma group. In: *Diseases of poultry*. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. Mc Dougald, Y.M. Saif (eds.). Iowa, 1997, V. 10: 414-466.
6. Payne L.N. Retrovirus-induced disease in poultry. *Poultry Sci.*, 1998, 77(8): 1204-1212 (doi: 10.1093/ps/77.8.1204).
7. Ochi A., Ochiai K., Nakamura S., Kobara A., Sunden Y., Umemura T. Molecular characteristics and pathogenicity of an avian leukosis virus isolated from avian neurofibrosarcoma. *Avian Dis.*, 2012, 56(1): 35-43 (doi: 10.1637/9830-060711-Reg.1).
8. Nakamura S., Ochiai K., Hatai H., Ochi A., Sunden U., Umemura T. Pathogenicity of avian leukosis viruses related to fowl glioma-inducing virus. *Avian Pathol.*, 2011, 40(5): 499-505 (doi: 10.1080/03079457.2011.605783).
9. Gao L., Qin L.T., Pan W., Wang Y.Q., Lee Qi.X., Gao H.L., Wang X.M. Avian leukosis virus subgroup J in layer chickens, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, 16(10): 1637-1638 (doi: 10.3201/eid1610.100780).
10. Cui N., Su S., Chen Z., Zhao X., Cui Z. Genomic sequence analysis and biological characteristics of a rescued clone of avian leukosis virus strain JS11C1, isolated from indigenous chickens. *J. Gen. Virol.*, 2014, 95(Pt 11): 2512-2522 (doi: 10.1099/vir.0.067264-0).
11. Shao H., Wang L., Sang J., Li T., Liu Y., Wan Z., Qian K., Qin A., Ye A. Novel avian leukosis viruses from domestic chicken breeds in mainland China. *Arch. Virol.*, 2017, 162(7): 2073-2076 (doi: 10.1007/s00705-017-3344-y).
12. Chang S.W., Hsu M.F., Wang C.H. Gene detection, virus isolation, and sequence analysis of avian leukosis viruses in Taiwan country chickens. *Avian Dis.*, 2013, 57(2): 172-177 (doi: 10.1637/10387-092612-Reg.1).
13. Plotnikov V.A., Grebennikova T.V. Dudnikova E.K., SHul'pin M.I., Lazareva S.P., Nikonova Z.B., Men'shchikova A.E., Norkina S.N., Aliper T.I. About spreading the avian leukosis viruses in poultry farms in the Russian Federation. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2013, 6: 36-42 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.6.36eng) (in Russ.).
14. Meng F., Li X., Fang J., Gao Y., Zhu L., Xing G., Tian F., Gao Y., Dong X., Chang S., Zhao P., Cui Z., Liu Z. Genomic diversity of the Avian leukosis virus subgroup J gp85 gene in different organs of an infected chicken. *J. Vet. Sci.*, 2016, 17(4): 497-503 (doi: 10.4142/jvs.2016.17.4.497).
15. Lupiani B., Hunt H., Silva R., Fadly A. Identification and characterization of recombinant subgroup J avian leukosis viruses (ALV) expressing subgroup A ALV envelope. *Virology*, 2000, 276(1): 37-43 (doi: 10.1006/viro.2000.0539).
16. Bai J., Payne L.N., Skinner M.A. HPRS-103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an *env* gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses. *J. Virol.*, 1995, 69(2): 779-84 (doi: 10.1128/JVI.75.2.726-737.2001).
17. Nakamura S., Ochiai K., Ochi A., Yabushita H., Abe A., Kishi S., Sunden Y., Umemura T. Cardiac pathology and molecular epidemiology by avian leukosis viruses in Japan. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e86546 (doi: 10.1371/journal.pone.0086546).
18. Ochi A., Ochiai K., Kobara A., Nakamura S., Hatai H., Handharyani E., Tiemann I., Tanaka I.B. 3rd, Toyoda T., Abe A., Seok S.H., Sunden Y., Torralba N.C., Park J.H., Hafez H.M., Umemura T. Epidemiological study of fowl glioma-inducing virus in chickens in Asia and Germany. *Avian Pathol.*, 2012, 41(3): 299-309 (doi: 10.1080/03079457.2012.684373).
19. Mansky L.M. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J. Gen. Virol.*, 1998, 79: 1337-1345 (doi: 10.1099/0022-1317-79-6-1337).
20. Chesters P.M., Smith L.P., Nair V. E (XSR) element contributes to the oncogenicity of Avian leukosis virus (subgroup J). *J. Gen. Virol.*, 2006, 87(9): 2685-2692 (doi: 10.1099/vir.0.81884-0).
21. Justice J. 4th, Malhotra S., Ruano M., Li Y., Zavala G., Lee N., Morgan R., Beemon K. The MET gene is a common integration target in avian leukosis virus subgroup J-induced chicken hemangiomas. *J. Virol.*, 2015, 89(9): 4712-4719 (doi: 10.1128/JVI.03225-14).

22. Hayward W.S., Neel B.G., Astrin S.M. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature*, 1981, 290(5806): 475-480 (doi: 10.1038/290475a0).
23. Laimins L.A., Tschlis P., Khoury G. Multiple enhancer domains in the 3' terminus of the Prague strain of Rous sarcoma virus. *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12(16): 6427-6442.
24. Maeda N., Fan H., Yoshikai Y. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Rev. Med. Virol.*, 2008, 18(6): 387-405 (doi: 10.1002/rmv.592).
25. Chesters P.M., Howes K., Petherbridge L., Evans S., Payne L.N., Venugopal K. The viral envelope is a major determinant for the induction of lymphoid and myeloid tumours by avian leukosis virus subgroups A and J, respectively. *J. Gen. Virol.*, 2002, 83: 2553-2561 (doi: 10.1099/0022-1317-83-10-2553).
26. Bande F., Arshad S.S., Omar A.R. Isolation and metagenomic identification of avian leukosis virus associated with mortality in broiler chicken. *Adv. Virol.*, 2016, 2016: Article ID 9058403 (doi: 10.1155/2016/9058403).
27. Bacon L.D., Fulton J.E., Kulkarni G.B. Methods for evaluating and developing commercial chicken strains free of endogenous subgroup E avian leukosis virus. *Avian Pathol.*, 2004, 33(2): 233-243 (doi: 10.1080/0307943042000195731).

Научные собрания

EMBO|EMBL SYMPOSIUM: ORGANOID: MODELLING ORGAN DEVELOPMENT AND DISEASE IN 3D CULTURE

(September 10-13, 2018, Heidelberg, Germany)

Information: <http://www.globaleventslist.elsevier.com/events>

11th INTERNATIONAL VIROLOGY SUMMIT

(July 1-2, 2019, Valencia, Spain)

Target audience:

- microbiologists, virologists, epidemiologists
- research scholars vaccinologists, immunologists
- health-care professionals
- researchers and scientist
- training institutes
- universities and colleges students
- associations and societies
- pharmaceutical and healthcare companies
- business entrepreneurs
- medical colleges
- viral diseases researchers

The conference tracks are set to cover various perceptions of researches involved with Viral Diseases and their control measures. This would help to accommodate every possible researchers working on Viruses to help build a vivid picture about this. We will have speakers, poster sessions and workshops designed to represent the talks from experts and students.

Information: <https://virology.conferenceseries.com/europe/recommended-global-conferences.php#usa>

13th WORLD CONGRESS ON VIROLOGY, INFECTIONS AND OUTBREAKS

(December 5-6, 2018, Vancouver, Canada)

The Congress aims to bring together leading academic scientists, researchers and research scholars to exchange and share their experiences and research results on all aspects of virology & Infectious Diseases. It also provides a premier interdisciplinary platform for researchers, practitioners and educators to present and discuss the most recent innovations, trends, and concerns as well as practical challenges encountered and solutions adopted in the fields of virology & Infectious Diseases.

The principle focal point of world congress is on the current advances over the range of Virology and irresistible ailments look into from fundamental sciences to general wellbeing. Gathering features will be general virology; viruses and tumors ;viral the study of disease transmission; deadly popular sicknesses; clinical and neuro virology; molecular virology; pediatric virology; viral immunology; retrovirology; agriculture and plant virology; veterinary virology; current research in virology; pharmaceutical mycology; mycotoxins and mushrooms; mycology and ecology; medical and clinical mycology; environmental and applied mycology; veterinary mycology; mycotoxicoses and mycoses; mycoscience; mycologia and mycopathologia, bacteriology, parasitology, contagious infections, vaccines and inoculation.

Information: <https://virology.conferenceseries.com/>