



Тваринництво, ветеринарна медицина

УДК 619:616-006.446:632.2
© 2013

М.С. Мандигра,
член-кореспондент НААН

Н.В. Любар
Інститут сільського
господарства Західного
Полісся НААН

М.І. Гулюкін,
академік РАСГ,
іноземний член НААН

Л.О. Іванова,
кандидат
біологічних наук

Н.Г. Козирьова
ДНЗ Всеросійський
інститут експериментальної
ветеринарії ім. Я.Р. Коваленка

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСІВ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Вперше в Україні вивчено різновиди генів env та pol вірусу лейкозу великої рогатої худоби. Визначено нуклеотидну послідовність і проведено філогенетичний аналіз з метою виявлення генотипів досліджуваних ізолятів провірусу лейкозу, що циркулюють на території України.

Ключові слова: вірус лейкозу, полімеразна ланцюгова реакція, генотипи вірусу, філогенетичний аналіз, гени env, pol

Поширення у всьому світі вірусу лейкозу (ВЛ) великої рогатої худоби (ВРХ) (рід *Deltaretrovirus*, *Retroviridae*) спричинило потребу оцінки і систематизації його генетичного різновиду. Вірус лейкозу найчастіше вражає В-лімфоцити. Ознаки зараження — це продукування антитіл вірусу. Отже, про наявність інфекції можна судити на основі виявлення як вірусного геному (антигену), так і специфічних антитіл.

У ветеринарній практиці активно почали використовувати сучасні молекулярно-біологічні методи діагностики, зокрема метод ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції). Це високочутливий (виявлення поодиноких клітин вірусу) і специфічний (виявлення унікального, характерного лише для даного збудника фрагмента геному) метод прямого виявлення збудника. Високу специфічність ПЛР задає нуклеотидна послідовність праймерів. Для детекції провірусу ВРХ методом ПЛР як діагностичні мішені використовують консервативні фрагменти геному провірусу, які містяться в генах *gag*, *pol*, *env* [1].

Найчастіше для оцінки і систематизації генетичного різновиду використовують ген *env* [2–7], який кодує попередника двох глікопротеїдів оболонки *gp51* і *gp35*. Різними науковими школами встановлено, що поділ на генотипи за геном *env* збігається з географічним походженням вірусів, водночас різні генотипи мають нерівномірне географічне розташування. Розподіл у всьому світі ВЛ і формування окремих генетичних груп пов'язані з переміщенням інфікованої ВРХ. Залежно від методу дослідження різні автори виділяють різну кількість груп чи генотипів ВЛ. Найточніший та більш інформаційний метод — це секвенування з подальшим філогенетичним аналізом. Учені з Аргентини на основі аналізу 74 повнорозмірних нуклеотидних послідовностей гена *env* виділили 7 генотипів [7].

Мета досліджень — вивчити поліморфізм гена *env* ізолятів ВЛ ВРХ, виділених на території України. Провести філогенетичний аналіз на основі гена *pol* ВЛ ВРХ з метою виявлення

Генотипи провірусу лейкозу ВРХ, що циркулюють у господарствах України (за геном *env*)

Область	Господарство	Кількість досліджених проб	Генотип
Київська	ТОВ «Українська молочна компанія»	1	IV
Запорізька	ВАТ «Степной»	3	II
Донецька	АТЗТ «Екопрод А.Т.»	2	I
Волинська	СПП «Гірниківське»	2	IV

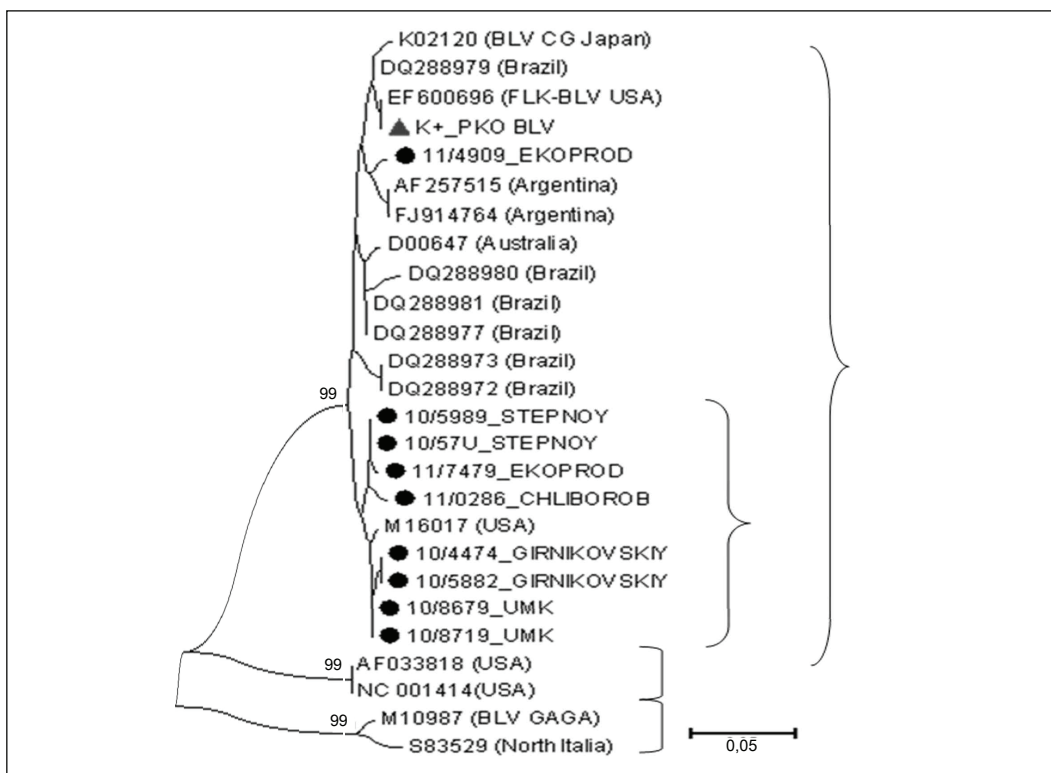
генетичного статусу дослідних ізолятів провірусу лейкозу ВРХ, що циркулюють на території України.

Матеріали та методи досліджень. Для дослідження була відібрана кров із хвостової вени тварин одноразовими стерильними системами у пробірки з відповідним антикоагулянтом. Кров відібрали від позитивних щодо РІД тварин чорно-рябої та голштинської порід з 5-ти господарств Київської, Запорізької, Донецької, Рівненської та Волинської областей (2010–2011 рр.).

Для секвенування ДНК гена *env* провірусу

лейкозу ВРХ проведено ампліфікацію фрагментів ДНК методом «nested» ПЛР за методикою, рекомендованою МЕБ (OIE Terrestrial Manual 2008). Ампліфікацію фрагментів гена *pol* провірусу лейкозу ВРХ проводили з використанням розробленої на базі ВІЕВ ім. Я.Р. Коваленка методики ПЛР-аналізу.

Філогенетичні дерева створено дистанційним методом мінімуму еволюції (МЕ) з використанням *p*-дистанцій і бутстреп-аналізу (N=1000 реплікацій). Філогенетичний аналіз створено дистанційним методом приєднання сусідів (NJ)



Філогенетичне дерево, побудоване дистанційним методом мінімуму еволюції з використанням *p*-дистанцій і бутстреп-аналізу (N=1000 реплікацій)

з використанням 2-параметричної моделі Кімура і бутстреп-аналізу (N=1000 реплікацій).

За результатами секвенування фрагментів ДНК гена *env* (розміром 234–306 нуклеотидів) провірусу лейкозу ВРХ визначено нуклеотидну послідовність і проведено філогенетичний аналіз з метою виявлення генотипів досліджуваних ізолятів провірусу лейкозу ВРХ, що циркулюють на території України. Проаналізовано такі проби: 4909,4512 (АТЗТ «Екопрод А.Т.»), 57в, 7189, 5989 (ВАТ «Степной»), 5882, 4474 (СПП «Грниківське»), 4710 (ТОВ «Українська молочна компанія»).

Топологія філогенетичного дерева (масив — 73 послідовності) свідчить про належність досліджуваних ізолятів провірусу лейкозу до різних генотипів ВЛ ВРХ. Отже, в обстежених господарствах України виявлено 3 генотипи (IG, IIG, IVG) провірусу лейкозу ВРХ [7] (таблиця).

За даними філогенетичного аналізу, у двох досліджуваних господарствах виявлено генотип 4, до якого належать віруси, що в різний час циркулювали в країнах центральної Європи (Німеччина, Франція, Бельгія). Ймовірно, їх завезено звідти в Україну разом з імпортованими тваринами. Крім цього, в Запорізькій та Донецькій областях виявлено вірусні генотипи 1 і 2. Генотип 1 об'єднує велику групу вірусів, виділених у США, Японії, Австралії.

У середині господарств і в межах одного генотипу ізоляти 10/5989_STEPNOY і 10/7189_STEPNOY, 11/4909_EKOPROD і 11/4512_EKOPROD гомологічні між собою відповідно. Можна припустити, що це пов'язано із загальним джерелом інфікування тварин усередині окремо взятого господарства. Водночас виявлено гомологію між ізолятами різних господарств 10/4474_GIRNIKOVSKIY і 10/4710_UMK, але які належать до одного генотипу.

Ступінь схожості досліджуваних ізолятів з України із наведеними в базі даних міжнародними штамми становить 98–100% залежно від референтної послідовності. Послідовності ізолятів 10/5882_GIRNIKOVSKIY, 10/4710_UMK і 10/4474_GIRNIKOVSKIY виявляють найбільшу схожість зі штамми K02251 Belgium, EF065638

Belgium, що відповідає 100%-й ідентичності. Для секвенування фрагментів ДНК гена *pol* провірусу лейкозу ВРХ відібрано проби: 4909, 7479 (АТЗТ «Екопрод А.Т.»), Донецька обл.), 0286 (СПП «Хлібороб», Рівненська обл.), 57в, 5989 (ВАТ «Степной», Запорізька обл.), 4474, 5882 (СПП «Грниківське», Волинська обл.), 8679, 8719 (ТОВ «Українська молочна компанія», Київська обл.).

За результатами секвенування ДНК (розміром 306 нуклеотидів) визначено нуклеотидну послідовність і проведено філогенетичний аналіз на основі гена *pol* ВЛ ВРХ з метою виявлення генетичного статусу досліджуваних ізолятів провірусу лейкозу ВРХ, що циркулюють на території перерахованих вище областей України.

Топологія філогенетичних дерев (масив — 22 послідовності), (масив — 26 послідовностей) (рисунок), свідчить про належність досліджуваних ізолятів провірусу лейкозу до великої групи, до якої зараховано також штами з Аргентини, Австралії, Японії, США, Бразилії. Ступінь схожості для всіх штамів з України з переліченими вище міжнародними ізолятами в середньому становить 97–99% (розбіжність у середньому в 4–8 нуклеотидів) залежно від референтної послідовності. Усі ізоляти, крім 11/4909_EKOPROD, споріднені (99% ідентичності) з американським штамом M16017. На мінімальній філогенетичній відстані від штаму M16017 перебувають ізоляти 10/4474_GIRNIKOVSKIY, 10/5882_GIRNIKOVSKIY, 10/8679_UMK, 10/8719_UMK — 99% ідентичності (розбіжність у 2 нуклеотиди). Штам 11/4909_EKOPROD має найбільшу схожість з аргентинськими штамми AF257515, FJ914764, що становить 98% ідентичності за нуклеотидною послідовністю. Ізоляти 10/4474_GIRNIKOVSKIY, 10/5882_GIRNIKOVSKIY і 10/8679_UMK, 10/8719_UMK, відповідно, гомологічні між собою.

Проте досліджувані ізоляти з перерахованими вище міжнародними штамми відрізняються від штамів зі США (M10987 BLV GAGA, NC001414, AF033818) і північної Італії (S83529), що утворюють окремі клади (див. рисунок).

Висновки

Під час проведення умовної кореляції виявлено, що за результатами аналізу на основі гена *pol* ізолят 11/4909_EKOPROD майже повністю схожий з аргентинським штамом

AF 257515 (генотип 2 відповідно до класифікації ВЛ ВРХ за геном *env* [7], а за аналізу послідовності на основі гена *env* виявлено належність його до генотипу I (ідентичність

становить 98% з послідовностями FJ808589 Argentina і EF065653 Japan). У 4-х областях України циркулює ВЛ 3-х генотипів (за геном env) — 1, 2, 4 [7].

Наявність гомогенних популяцій ВЛ у межах одного господарства свідчить про загальне постійне джерело інфікування тварин у середині цього господарства.

Бібліографія

1. Козырева Н.Г. Испытания методики ПЦР для детекции ДНК провируса лейкоза КРС/Н.Г. Козырева, Л.А. Иванова, М.И. Гулюкин//Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел: матер. Междунар. науч.-практ. конф., 26–27 апреля 2011 г. — М., 2011. — С. 51–53.
2. Ломакина Н.Ф. Полиморфизм гена env вируса лейкоза, присутствующего в Российской Федерации/Н.Ф. Ломакина, М.И. Гулюкин, В.В. Храмов, Н.А. Осипова, В.В. Разумовская //Там само. — М., 2011. — С. 48–50.
3. Fechner H. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle/H. Fechner, P. Blankenstein, AC Looman et al.//Virology. — 1997. — V. 237, № 2. — P. 261–269.
4. Hemmatzadeh F. Sequencing and phylogenetic analysis of gp51 gene of bovine leukaemia virus in Iranian isolates/F. Hemmatzadeh//Vet Res Commun. — 2007. — V. 31(6). — P. 783–789.
5. Licursi M. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan/M. Licursi, Y. Inoshima, D. Wu, T. Yokoyama, E.T. Gonzalez, H. Sentsui//Vet Microbiol. — 2003. — V. 96(1). — P. 17–23.
6. Mamoun R.Z. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins/R.Z. Mamoun, M. Morisson, N. Rebeyrotte et al.//J. Virology. — 1990. — V. 64, № 9. — P. 4180–4188.
7. Rodriguez S.M. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes evidence for the existence of two novel clades/S.M. Rodriguez, M.D. Golemba, R.H. Campos et al.//J. Gen. Virology. — 2009. — V. 90, № 11. — P. 2788–2797.

Надійшла 16.07.2012.