

УДК 619:578:616.98:578.828.11

© 2015

*М.І. Бащенко,
академік НААН, доктор
сільськогосподарських наук
Національна
академія аграрних
наук України*

*Б.Т. Стегній,
академік НААН, доктор
ветеринарних наук*

*А.П. Герілович,
доктор ветеринарних наук*

*О.Ю. Лиманська,
доктор біологічних наук*

І.О. Гема

*С.К. Горбатенко,
кандидат ветеринарних наук
Національний науковий
центр «Інститут
експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини»*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА ФІЛОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ, ЩО ЦИРКУЛЮЄ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Мета. Порівняти ефективність застосування молекулярно-генетичних методів та РІД за діагностики лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) і дослідити філогенетичні зв'язки між ізолятами вірусу лейкозу (ВЛ) ВРХ. **Методи.** Детекцію провірусної ДНК ВЛ ВРХ здійснювали за допомогою вітчизняної ПЛР тест-системи «BLV-provirus DNA-тест», розробленої в ННЦ «ІЕКВМ». **Результати.** Досліджено молекулярно-генетичні особливості та філогенетичні зв'язки у популяції ВЛ, що циркулює у різних регіонах України. Підтверджено вищу специфічність ПЛР-аналізу порівняно з РІД щодо детекції ВЛ ВРХ. **Висновки.** Установлено, що результати філогенетичних досліджень можуть бути використані для виявлення та вивчення можливих субгруп (або генотипів), створення бази даних для пошуку генів, що визначають високу біологічну активність вірусів.

Ключові слова: вірус, лейкоз великої рогатої худоби, молекулярно-генетичні методи, філогенетичний аналіз.

Віруси, геном яких представлено РНК, характеризуються високою швидкістю мутацій нуклеотидних послідовностей та пов'язаною з цим значною лабільністю структури генетичного матеріалу [2, 6, 12–15]. Геноми ретровірусів, подібно до інших РНК-вміщувальних вірусів, є високоваріабельними через відсутність механізму виправлення помилок, що виникають під час копіювання матриці у процесі реплікації, та можливі генетичні рекомбінації. Водночас нуклеотидні модифікації можуть призвести до зміни амінокислотного складу синтезованих білків. Наслідком генетичної варіабельності є відмінності у біологічних властивостях ізолятів ретровірусу — клітинному тропізмі, цитопатичній дії, поверхневих антигенних характеристиках. З огляду на це дослідження генетичної варіабельності інфекційних агентів є одним з основних завдань біологічного моніторингу, кінцева мета якого полягає не стільки у вивченні, скільки

у поясненні цього явища [10].

Одним із представників ретровірусів є вірус лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) — етіологічний агент лейкозу ВРХ. Вірус лейкозу ВРХ структурно, генетично та функціонально пов'язаний з вірусами Т-клітинного лейкозу людини, HTLV-1 і HTLV-2, розвиток захворювань, викликаних цими вірусами, має багато спільного [3, 17]. Саме тому ВЛ ВРХ є дуже зручною моделлю для вивчення лейкемії. Важливим аспектом таких досліджень є проблема генетичної варіабельності ВЛ ВРХ [4, 9, 11, 18]. М. Licursi зі співавторами з використанням методів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) та секвенування було проведено порівняння 42-х зразків провірусу ВЛ ВРХ, отриманих в Японії та Аргентині, з варіантами провірусу ВЛ з різних географічних регіонів (Франції, Бельгії, Італії, Північної Америки, Австралії) та показано, що

варіабельність геномного матеріалу ВЛ ВРХ сягає 3,5% [8]. М.Ф. Samargos зі співавторами проведено порівняльний аналіз послідовності гена *env* 3-х штамів ВЛ ВРХ, виділених у 3-х різних регіонах Бразилії, з 7-ма відповідними послідовностями штамів ВЛ ВРХ з різних країн світу та встановлено, що бразильські ізоляти мають значно більшу швидкість мутації [1]. Знання особливостей структури геному ВЛ ВРХ, з одного боку, та просторово-часової взаємодії вірусу з організмом тварини, з другого боку, є необхідною умовою успішного здійснення контролю за поширенням лейкозу.

Мета досліджень — порівняння ефективності застосування молекулярно-генетичних методів та РІД за детекції ВЛ ВРХ й дослідження філогенетичних зв'язків між ізолятами ВЛ ВРХ.

Матеріали та методи досліджень. Детекцію провірусної ДНК ВЛ ВРХ у клінічних зразках здійснювали за допомогою вітчизняної тест-системи для детекції провірусної ДНК ВЛ ВРХ методом стандартної ПЛР «BLV-provirus DNA-тест» розробки ННЦ «ІЕКВМ» згідно з настановою виробника.

Для запобігання згортанню крові як антикоагулянт використовували розчин 0,056 М цитрату натрію, 0,166 М глюкози у співвідношенні 1:5.

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі, забарвленому етидієм бромистим.

Для побудови філогенетичних дерев використовували програму MEGA, версія 4.1.

Результати досліджень. Як клінічний матеріал для проведення ПЛР використовували периферичну кров РІД-позитивних та РІД-негативних тварин з господарств Харківської, Рівненської, Полтавської областей України, АР Крим. На рис. 1 наведено фрагмент електрофоретичного аналізу ампліконів, що утворилися в результаті проведення ПЛР із застосуванням тест-системи «BLV-provirus DNA-тест». Потрібно зазначити, що за результатами ПЛР-аналізу у клінічному матеріалі, отриманому від двох РІД-позитивних тварин, не було виявлено генетичного матеріалу ВЛ ВРХ, у клінічному матеріалі, отриманому від однієї РІД-негативної тварини, навпаки, його було встановлено.

Визначені розбіжності пов'язані не тільки з недостатньою специфічністю РІД, а й з низькою чутливістю цієї реакції. Це підтверджено, наприклад, J. Kohara et al. [7], які за допомогою ПЛР детектували провірусну ДНК ВЛ ВРХ

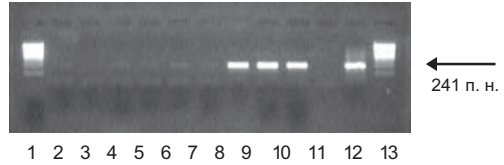


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР-детекції фрагмента гена *env* ВЛ ВРХ за допомогою тест-системи «BLV-provirus DNA-тест» після фарбування 1,5%-го агарозного гелю бромистим етидієм. 1, 13 — маркер молекулярної маси; 2–10 — клінічний матеріал від ВРХ; 11 — негативний контроль; 12 — культура клітин FLK, інфікована ВЛ ВРХ. Довжина отриманого амплікону — 241 п. н.

у ВЛВ-інфікованих тварин на 5 тижнів раніше, ніж антитіла до ВЛ методом РІД, а також К.Г. Тропо та ін. [16], які на великій вибірці ВРХ із 363-х різних черід продемонстрували, що специфічність РІД порівняно з ПЛР-аналізом становить 79,7%. Ефективність ПЛР за виявлення інфікованих ВЛ ВРХ тварин (особливо у разі відсутності gp24-антитіл) було підтверджено М.А. Juliarena et al. [5] під час проведення контрольних, з інтервалом 6 міс., досліджень кількох черід з різних провінцій Аргентини за допомогою серологічних, гематологічних методів та ПЛР. Результати проведених нами молекулярно-генетичних досліджень свідчать про безперечну необхідність принаймні вибіркового тестування РІД-позитивних тварин за допомогою

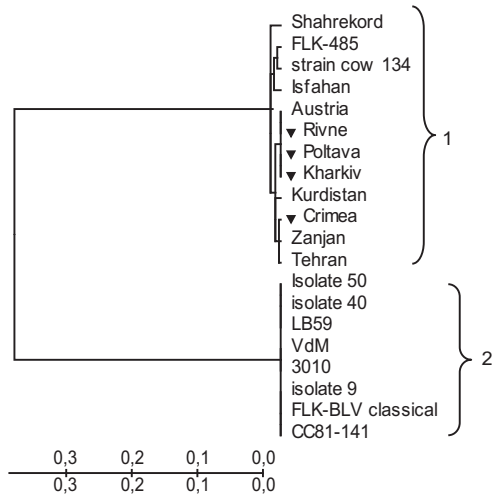


Рис. 2. Дендрограма, побудована на основі фрагментів гена *env* провірусної ДНК ізолятів ВЛ ВРХ з різних географічних регіонів світу

ПЛР щодо наявності провірусної ДНК ВЛ ВРХ на початковому етапі та РІД-негативних тварин на завершальному етапі оздоровлення господарств різної форми власності від лейкозу. Це, вважаємо, сприятиме успішному виконанню національної програми стосовно оздоровлення тваринницьких господарств від лейкозу.

Зразки провірусної ДНК ВЛ ВРХ було в подальшому секвеновано з метою визначення послідовності гена *env*-збудника та проведення філогенетичного аналізу.

Для вивчення філогенетичних взаємовідносин між організмами та уточнення часу їх дивергенції використовують методи визначення еволюційних дистанцій, які базуються на порівнянні нуклеотидних послідовностей гомологічних генів або амінокислотних послідовностей відповідних білків.

З метою встановлення філогенетичних зв'язків між ізолятами ВЛ ВРХ, що циркулює в Україні,

та їх філогенетичних відносин з ізолятами цього вірусу, виділеними в інших регіонах світу (країнах Європи, Азії, Південної та Північної Америки), було побудовано філогенетичне древо на основі секвенованих послідовностей гена *env* провірусної ДНК ВЛ ВРХ (рис. 2).

Побудована дендрограма свідчить про близькість ізолятів ВЛ ВРХ, що циркулюють в Україні, до ізолятів європейської та азіатської субгрупи (1, рис. 2). При цьому ізоляти ВЛ ВРХ, провірусну ДНК якого було екстраговано з периферичної крові тварин з господарств Рівненської, Полтавської та Харківської областей, є ближчими до європейської субгрупи (ізолят Austria), а вірус лейкозу, що циркулює в господарствах АР Крим, є близьким до ВЛ ВРХ азіатської субгрупи (ізоляти Zanjan, Tehran). Ізоляти ВЛ ВРХ, виділені в країнах американського континенту, утворюють окрему, американську, субгрупу (див. рис. 2).

Висновки

Підтверджено вищу специфічність ПЛР-анализу порівняно з РІД щодо детекції ВЛ ВРХ, а також продемонстровано, що результати філогенетичних досліджень можуть

бути використані для виявлення та вивчення можливих субгруп (або генотипів), створення бази даних для пошуку генів, що визначають високу біологічну активність вірусів.

Бібліографія

1. Camargos M.F. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis/M.F. Camargos, D. Stancek, M.A. Rocha //J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. — 2002. — V. 49, № 7. — P. 325–331.
2. Darlix J. High spontaneous mutation rate of Rous sarcoma virus demonstrated by direct sequencing of the RNA genome/J. Darlix, P.F. Spahr//Nucleic Acids Res. — 1983. — V. 11. — P. 5953–5967.
3. Dube S. Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world/S. Dube, S. Bachman, T. Spicer//J. of General Virology. — 1997. — V. 78. — P. 1389–1398.
4. Hemmatzadeh F. Sequencing and phylogenetic analysis of gp51 gene of bovine leukaemia virus in Iranian isolates/F. Hemmatzadeh//Vet. Res. Commun. — 2007. — № 6. — P. 783–789.
5. Juliarena M.A. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis/M.A. Juliarena, S.E. Gutierrez, C. Ceriani//Am. J. Vet Res. — 2007. — V. 68, № 11. — P. 1220–1225.
6. Katz R. Generation of diversity in retroviruses/R. Katz, A. Skalka//Annu. Rev. Genet. — 1990. — V. 24. — P. 409–415.
7. Kohara J. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation/J. Kohara, S. Konnai, M. Onuma//Jpn. J. Vet. Res. — 2006. — V. 54, № 1. — P. 25–30.
8. Licursi M. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan/M. Licursi, Y. Inoshima, D.Wu //Vet. Microbiol. — 2003. — V. 96, № 1. — P. 17–23.
9. Mamoun R. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins/R. Mamoun, M. Morisson, N. Rebeyrotte//J. Virol. — 1990. — V. 64. — P. 4180–4188.
10. Manini P. Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability/P. Manini, G. De Palma, A. Mutti//Toxicol. Lett. — 2007. — V. 168, № 3. — P. 210–218.
11. McGirr K.M. Tax and rex Sequences of bovine leukaemia virus from globally diverse isolates: rex amino acid sequence more variable than tax/K. M. McGirr, G. C. Buehring//J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. — 2005. — V. 52, № 1. — P. 8–16.

12. Meyerhens A. Temporal fluctuation in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolates/A. Meyerhens, R. Cheyner, J. Albert//Cell. — 1989. — V. 58. — P. 901–910.

13. Parvin J. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1/ J. Parvin, A. Moscona, W. Pan//J. Virol. — 1985. — V. 59. — P. 377–383.

14. Steinhauer D. Extreme heterogeneity in a population of vesicular stomatitis virus/D. Steinhauer, J. de la Torre, E. Meier //J. Virol. — 1989. — V. 63. — P. 2072–2080.

15. Steinhauer D. Rapid evolution of RNA viruses/ D. Steinhauer, J.J. Holland//Annu. Rev. Microbiol. —

1987. — V. 41. — P. 409–433.

16. Trono K.G. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods/K.G. Trono// Vet. Microbiol. — 2001. — V. 83, № 3. — P. 235–248.

17. Willems L. Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability/L. Willems, E. Thienpont, P. Kerkhops//J. of Virology. — 1993. — V. 67, № 2. — P. 1086–1089.

18. Zhao X. Sequence polymorphisms in the long terminal repeat of bovine leukemia virus: Evidence for selection pressures in regulatory sequences/X. Zhao, C. Jimenez, H. Sentsui //Virus Res. — 2007. — V. 124, № 1–2. — P. 113–124.

Надійшла 3.03.2015.