

THE STUDY OF CULTURAL-and-MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF *M. PARATUBERCULOSIS* ISOLATED FROM COWS

Zavgorodnsy A.I., Pozmogova S.A., Girka M.A.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The results of a comparative study of cultural-and-morphological and biochemical properties of isolated cultures of *M. paratuberculosis* and reference strain *paratuberculosis* are presented in the paper.

УДК 619:578:616.98:578.828.11

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ, ЦИРКУЛЮЮЧОГО В РІЗНИХ РЕГІОНАХ УКРАЇНИ

Лиманська О.Ю., Герілович А.П., Солодянкін О.С., Болотін В.І., Горбатенко С.К.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Симоненко С.І.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Одним із важливих аспектів дослідження вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) – етіологічного агента лейкозу ВРХ – є вивчення його генетичної варіабельності. Це є однією з основних задач біологічного моніторингу, кінцева мета якого полягає не тільки у вивченні, але й у поясненні зазначеного явища [1]. Вивченню даного питання присвячений ряд робіт. Наприклад, R. Mamoun et al. був проведений порівняльний аналіз секвенованих нуклеотидних послідовностей гена *env* восьми ізолятів вірусу лейкозу ВРХ з різних географічних регіонів, який дозволив встановити, що дивергенція між ними складає 6 % [2]. L. Willems et al. [3], використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), продемонстрували, що *in vivo* швидкість варіації для гена *env* ВЛ ВРХ дорівнює 0,009 %/рік (або дві мутації на 14,464 пар нуклеотидів (п. н.) за 1,5 року) та відповідає заміні однієї амінокислоти при синтезі відповідного білка. Для довгих кінцевих повторів (LTR) L. Willems et al. була визначена швидкість варіації – п'яти мутацій на 9,709 п. н. за 1,5 року. При цьому регуляторні ділянки, розташовані в області LTR, є більш консервативними, ніж ділянки не регуляторні [4]. Порівняння, проведене Hemmatzadeh F., послідовностей гена, що кодує білок gp51, п'яти ізолятів ВЛ ВРХ із різних регіонів Ірану з сімома нуклеотидними послідовностями відповідного гена ВЛ ВРХ, виділеного в різних країнах світу, дозволило зробити висновок про те, що варіабельність гена, що кодує білок gp51, коливається в межах 0,003-5 %. Побудоване філогенетичне дерево показало наявність трьох кластерів, перший з яких об'єднав ізоляти ВЛ ВРХ, виділені на території Франції та Німеччини, другий – на території Ірану, а третій – на території Бельгії, Австралії, Японії, Кореї та Бразилії [5]. McGirr K.M. була вивчена варіабельність генів *tax* та *rex* для восьми ізолятів вірусу лейкозу ВРХ з різних регіонів земної кулі та показано, що варіабельність амінокислотного складу для білків *Tax* та *Rex* складає 9 % та 11 % відповідно [6].

Licursi M. та співавторами, з використанням методів ПЛР, поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) та секвенування, було проведене порівняння 42 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 вірусу лейкозу ВРХ сягає 3,5 % [7]. Samargos M.F. та співавтори провели порівняльний аналіз послідовності гена *env* трьох штамів ВЛ ВРХ, виділених у трьох різних регіонах Бразилії з сімома відповідними послідовностями штамів ВЛ ВРХ з різних країн світу та встановлено, що бразильські ізоляти мають значно більшу швидкість мутації [8]. Крім того, філогенетичний аналіз повних або часткових послідовностей гена *env* бразильських ізолятів продемонстрував наявність чотирьох або трьох кластерів відповідно [9]. Для вірусу лейкозу ВРХ ідентифіковано на цей час декілька категорій мутацій: 1) мутації, які знижують рівень патогенності вірусу [10-13]; 2) мутації, що не впливають на реплікацію вірусу [14, 15]; 3) мутації, які частково впливають на рівень патогенності та знижують навантаження провірусу на клітину [16, 17]. Але, найважливішими у генетичній варіабельності збудника лейкозу ВРХ (як і в дельтареtroвірусів взагалі) є мутації, які торкаються механізмів реплікації та є невід'ємною частиною життєвого циклу вірусу лейкозу [18]. Саме знання структури та наявності мутацій у геномі ВЛ ВРХ, з одного боку, та просторово-часова взаємодія вірусу з організмом тварини, з іншого боку, є необхідною умовою успішного здійснення контролю за розповсюдженням лейкозу.

Метою даної роботи було вивчення філогенетичних зв'язків ізолятів ВЛ ВРХ, що циркулюють у господарствах різних географічних регіонів України.

Матеріали та методи. Сумарну ДНК із периферичної крові великої рогатої худоби виділяли за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-Б» (Центральний НДІ епідеміології МОЗ РФ, Москва, Росія) або набору для універсальної пробопідготовки Gene Pak™ (ООО «Ізоген», Росія) згідно з протоколами виробників.

Для запобігання згортання крові як антикоагулянт використовували розчин 0,056 М цитрату натрію, 0,166 М глюкози, які додавали до крові тварин із периферичних судин у співвідношенні 1:5.

Для детекції провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби використовували розроблену в ННЦ «ІЕКВМ» та зареєстровану тест-систему «BLV-provirus DNA-тест».

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ому агарозному гелі, забарвленому етидієм бромистим, за напруги електричного поля $U = 75$ В, силі електричного струму $I = 50$ мА. Довжина амплікона дорівнює 241 п. н.

Секвенування фрагментів гена *env* провірусної ДНК ВЛ ВРХ здійснювали на автоматизованому секвенаторі ABI PRISM 311D.

Для побудови філогенетичних дерев використовували програму MEGA, версія 4.1.

Результати досліджень. Для встановлення первинної структури фрагментів геномного матеріалу ВЛ ВРХ шляхом секвенування до Національного ветеринарного дослідного інституту (м. Пулава, Польща) були передані зразки провірусної ДНК, екстрагованої з периферичної крові ВРХ, ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, що циркулює в господарствах Полтавської, Харківської, Рівненської областей України та АР Крим. Було проведено секвенування фрагментів гена *env* різної довжини, отриманих шляхом ампліфікації з різними наборами праймерів, для десяти ізолятів ВЛ ВРХ.

Для вивчення філогенетичних взаємовідносин між організмами та уточнення часу їхньої дивергенції використовують методи

визначення еволюційних дистанцій, які базуються на порівнянні нуклеотидних послідовностей гомологічних генів або амінокислотних послідовностей відповідних білків.

Для встановлення філогенетичних зв'язків між ізолятами вірусу лейкозу 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 дерево на основі секвенованих послідовностей гена *env* провірусної ДНК ВЛ ВРХ (рис. 1).

Побудована дендрограма ілюструє близькість ізолятів ВЛ ВРХ, що циркулюють в Україні, до ізолятів європейської та азіатської субгрупи (1, рис. 1). При цьому, ізоляти вірусу лейкозу ВРХ, провірусна ДНК якого була екстрагована 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 (2, рис. 1).

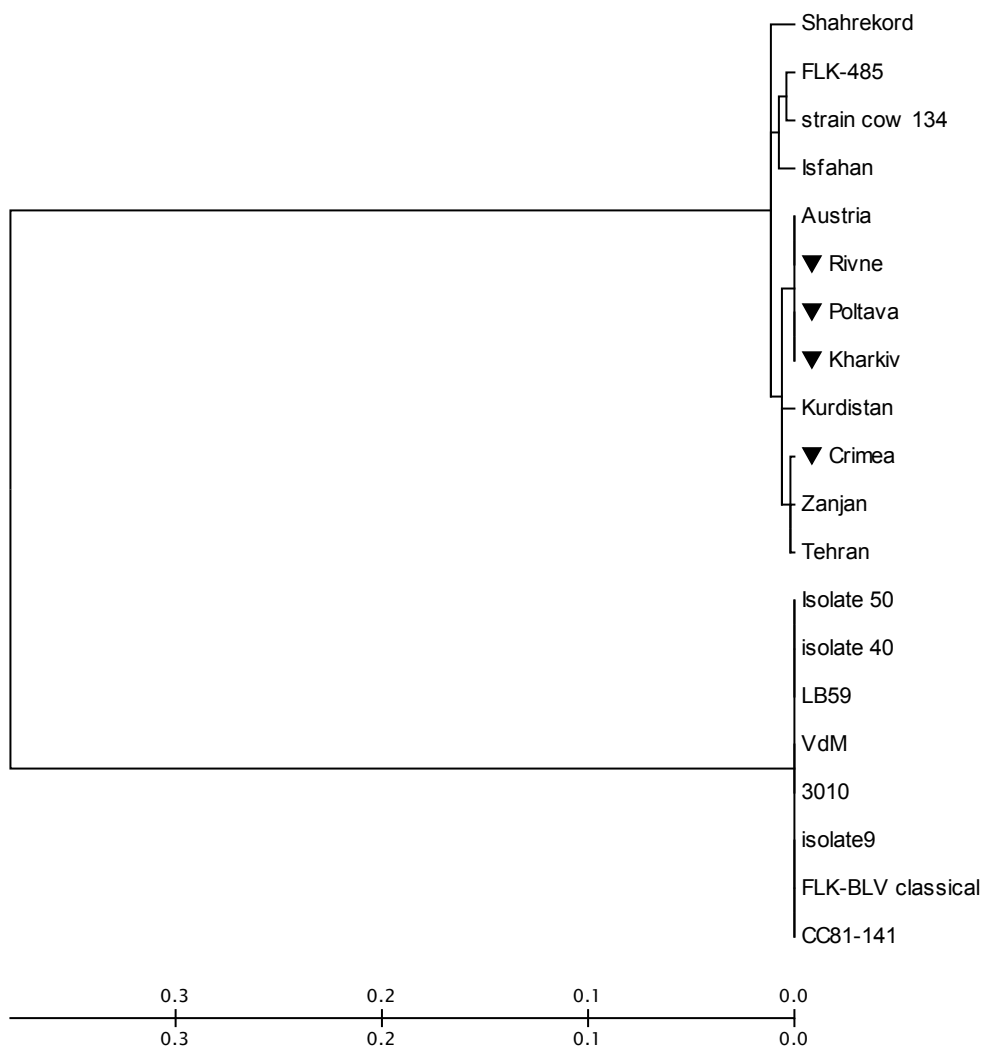


Рис. 1 Дендрограма, побудована на основі фрагментів гена *env* провірусної ДНК ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби з різних географічних регіонів світу.

Висновки.

1. Показано, що ізоляти вірусу лейкозу ВРХ, що циркулюють в господарствах різних географічних регіонів України, належать до європейсько-азіатської субгрупи.

2. Результати філогенетичних досліджень можуть бути використані для виявлення та вивчення можливих субгруп (або генотипів), створення базису для пошуку генів, що визначають високу біологічну активність вірусів.

Список літератури

1. Manini, P. Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability [Текст] / P. Manini, G. De Palma, A. Mutti // *Toxicol. Lett.* – 2007. – Vol. 168, № 3. – P. 210-218.
2. Mamoun, R. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins [Текст] / R. Mamoun, M. Morisson, N. Rebeyrotte // *J. Virol.* – 1990. – Vol. 64. – P. 4180-4188.
3. Willems, L. Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastain variability [Текст] / L. Willems, E. Thienpont, P. Kerkhops // *J. of Virology.* – 1993. – Vol. 67, № 2. – P. 1086-1089.
4. Zhao, X. Sequence polymorphisms in the long terminal repeat of bovine leukemia virus: Evidence for selection pressures in regulatory sequences [Текст] / X. Zhao, C. Jimenez, H. Sentsui, G. C. Buehring // *Virus Res.* – 2007. – Vol. 124, №1-2. – P. 113-124.
5. Hemmatzadeh, F. Sequencing and phylogenetic analysis of gp51 gene of bovine leukaemia virus in Iranian isolates [Текст] / F. Hemmatzadeh // *Vet. Res. Commun.* – 2007. – №6. – P. 783-789.
6. McGirr, K. M. tax and rex Sequences of bovine leukaemia virus from globally diverse isolates: rex amino acid sequence more variable than tax [Текст] / K. M. McGirr, G. C. Buehring // *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* – 2005. – Vol. 52, №1. – P. 8-16.
7. Licursi, M. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan [Текст] / M. Licursi, Y. Inoshima, D. Wu, T. Yokoyama, E.T. Gonzalez, H. Sentsui // *Vet. Microbiol.* – 2003. – Vol. 96, № 1. – P. 17-23.
8. Camargos, M.F. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis [Текст] / M.F. Camargos, D. Stancek, M.A. Rocha, L.M. Lessa, J.K. Reis, R.C. Leite // *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.*

– 2002. – Vol. 49, № 7. – P. 325-331. **9.** Camargos, M.F. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine leukemia virus Virus Genes [Текст] / M.F. Camargos, A. Pereda, D. Stancek, M.A. Rocha, J.K. dos Reis, I. Greiser-Wilke, R.C. Leite // Virus Genes. – 2007. – Vol. 34, № 3. – P. 343-350. **10.** Gatot, J.S. Conservative mutations in the immunosuppressive region of the bovine leukemia virus transmembrane protein affect fusion but not infectivity in vivo [Текст] / J.S. Gatot, I. Callebaut, J.P. Mornon, D. Portetelle, A. Burny, P. Kerkhofs, R. Kettmann, L. Willems // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 12870-12880. **11.** Willems, L. The YXXL signaling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads [Текст] / L. Willems, J.S. Gatot, M. Mammerickx, D. Portetelle, A. Burny, P. Kerkhofs, R. Kettmann // J. Virol. – 1995. – Vol. 69. – P. 4137-4141. **12.** Willems, L. The major homology region of bovine leukaemia virus p24gag is required for virus infectivity in vivo [Текст] / L. Willems, P. Kerkhofs, L. Attenelle, A. Burny, D. Portetelle, R. Kettmann // J. Gen. Virol. – 1997. – Vol. 78. – P. 637-640. **13.** Willems, L. In vivo infection of sheep by bovine leukemia virus mutants [Текст] / L. Willems, R. Kettmann, F. Dequiedt, D. Portetelle, V. Voneche, I. Cornil, P. Kerkhofs, A. Burny, M. Mammerickx // J. Virol. – 1993. – Vol. 67. – P. 4078-4085. **14.** Merezak, C. Suboptimal enhancer sequences are required for efficient bovine leukemia virus propagation in vivo: implications for viral latency [Текст] / C. Merezak, C. Pierreux, E. Adam, F. Lemaigre, G.G. Rousseau, C. Calomme, C. Van Lint, D. Christophe, P. Kerkhofs, A. Burny, R. Kettmann, L. Willems // J. Virol. – 2001. – Vol. 75. – P. 6977-6988. **15.** Twizere, J.C. Discordance between bovine leukemia virus tax immortalization in vitro and oncogenicity in vivo [Текст] / J.C. Twizere, P. Kerkhofs, A. Burny, D. Portetelle, R. Kettmann, L. Willems // J. Virol. – 2000. – Vol. 74. – P. 9895-9902. **16.** Kerkhofs, P. In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein [Текст] / P. Kerkhofs, H. Heremans, A. Burny, R. Kettmann, L. Willems // J. Virol. – 1998. – Vol. 72. – P. 2554-2599. **17.** Willems, L. Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames [Текст] / L. Willems, P. Kerkhofs, F. Dequiedt, D. Portetelle, M. Mammerickx, A. Burny, R. Kettmann // PNAS. – 1994. – Vol. 91. – P. 11532-11536. **18.** Gillet, N. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human [Текст] / N. Gillet, A. Florins, M. Boxus, C. Burteau, A. Nigro, F. Vandermeeers, H. Balon, A.-B. Bouzar, J. Defoiche, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann, L. Willems // Retrovirology. – 2007. – Vol. 4. – P. 1-32.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS CIRCULATING IN DIFFERENT REGIONS OF UKRAINE

Limans'ka O.Yu., Gerilovich A.P., Solodyankin A.S., Bolotin V.I., Gorbatenko S.K.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Simonenko S.I.

Kharkov State Zooveterinary Academy

The primary structure of the env gene fragments of bovine leukemia virus circulating in the farms of different geographical regions of Ukraine is determined. Phylogenetic relationships between bovine leukemia virus is studied. The affiliation of Ukrainian isolates of infectious agent to the Euro-Asian subgroup is shown.

УДК 619:616.981.553

БОТУЛІЗМ. БІОБЕЗПЕКА І БІОЗАХИСТ

Ничик С.А., Риженко В.П.

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

Риженко В.В.

Українська військово-медична академія, м. Київ

Біобезпека. Ботулізм людини і тварин є проблемою світового значення зі зростаючою актуальністю. Випадки спалахів захворювання серед людей в Україні мають тенденцію до зростання. Число потерпілих кожного року перевищує 300 осіб.

В умовах України ботулізм тварин відноситься до групи емерджентних інфекцій. Це тяжка харчова та ранова токсикоінфекція всіх видів тварин і людини, реєструється в багатьох країнах світу. Розрізняють ботулізм харчовий, рановий та новонароджених. Летальність сягає 70-100 %.

Мета роботи – здійснити аналіз системи захисту тварин і людини від можливих спалахів ботулізму на ґрунті біотерористичних актів та визначити роль вітчизняної науки у вирішенні проблем біозахисту.

За рівнем небезпечності збудник хвороби *Clostridium botulinum*, відноситься до категорії А, збудник має 7 серотипів, продукує ботулотоксин, який відноситься до найсильніших біологічних отрут, що належать до засобів біологічної зброї та терористичних актів. Відомо, що 1 см³ токсину містить 10 млн. летальних доз для мишей. Для людини масою 60 кг летальна доза становить 0,05 мкг кристалічного токсину *Cl. botulinum* типу А [1].

Біологічну загрозу становлять контаміновані спорами збудника ґрунти, корма, харчові продукти та виготовлені з них консерви, продукти забою тварин та молоко.

Так, в умовах США ґрунти на 70 % контаміновані спорами *Cl. botulinum*, які витримують кип'ятіння до 6 годин. Найбільшу небезпеку для тварин становлять контаміновані корми, а для людини – консерви бобових культур та томатний сік.

Присутність в раціоні корів 10-100 г контамінованого *Cl. botulinum* силосу здатне викликати їх захворювання з тяжким перебігом. Підвищений рівень заліза та солі у воді, наявність плісняви ускладнює перебіг ботулізму.

Велику роль в патогенезі хвороби має феномен Берінга, коли сенсibilізований до ботулізму організм гине від малих доз повторного потрапляння токсину.

В останні роки в Німеччині реєструється вісцеральний ботулізм корів. В більшості випадків тварини гинуть раптово з діагнозом «невідомо хвороба». Згодом було встановлено, що у вмісті нижніх відділів кишечника уражених тварин знаходять вільний ботулотоксин і сліди бацил. Вважається, що в організмі йде накопичення малих доз токсину, що призводить до порушення функції органів травлення, зниження продуктивності, виснаження та загибелі тварин.

В Європі, у стаді з 150 голів ВРХ у 80 спостерігали клінічні ознаки ботулізму після поїдання силосованої підстилки від птахів. З них загинуло 68 голів. З досліджених 22 проб сироватки крові у 18 виявлено токсин *Cl. botulinum* тип С. Цей тип токсину виявлено з пашиних останків і силосованої підстилки. [2]