

УДК 619:57.065:578.828

## ВЫЯВЛЕНИЕ НОВОГО (8-ГО) ГЕНОТИПА ВЛКРС В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ МИРА

<sup>1,2</sup>Вафин Р.Р., <sup>1</sup>Хазипов Н.З., <sup>1</sup>Шаева А.Ю., <sup>1</sup>Закирова З.Р., <sup>2</sup>Зайнуллин Л.И.,  
<sup>3</sup>Тюлькин С.В., <sup>2,3</sup>Абдулина И.Р., <sup>1</sup>Алимов А.М.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины  
имени Н.Э. Баумана», Казань, e-mail: vafin-ramil@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГАУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань;

<sup>3</sup>ФГБУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория», Казань

Целью настоящей работы являлась систематизация информационных данных о случаях выявления в различных регионах мира изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота, относящихся согласно современной филогенетической классификации данного возбудителя к новому 8-му генотипу ВЛКРС, факт существования которого обоснован отечественными и зарубежными исследователями. По результатам использования поисковой программы основного локального выравнивания (BLAST), установлено наличие 20 нуклеотидных последовательностей изолятов 8-го генотипа BLV, депонированных в GenBank NCBI. Изоляты 8-го генотипа ВЛКРС выявлены у крупного рогатого скота в различных регионах мира: Хорватии, Украине, России и в Иордании. В настоящей работе представлены результаты расширенного филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена изолятов 8-го генотипа BLV, депонированных в GenBank NCBI на данный момент времени.

**Ключевые слова:** ВЛКРС, генотип, ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ, классификация

## FINDING A NEW (8TH) GENOTYPE OF BLV IN VARIOUS REGIONS OF THE WORLD

<sup>1,2</sup>Vafin R.R., <sup>1</sup>Khazipov N.Z., <sup>1</sup>Shaeva A.Y., <sup>1</sup>Zakirova Z.R., <sup>2</sup>Zaynullin L.I.,  
<sup>3</sup>Tyulkin S.V., <sup>2,3</sup>Abdulina I.R., <sup>1</sup>Alimov A.M.

<sup>1</sup>Kazan state academy of veterinary medicine, Kazan, e-mail: vafin-ramil@mail.ru;

<sup>2</sup>Kazan (Volga region) federal university, Kazan;

<sup>3</sup>Tatar trans-regional veterinarian laboratory, Kazan

The aim of this study was to systematize data about bovine leukemia virus isolates (BLV) case detection in different regions of the world, belonging to new 8th BLV genotype according modern phylogenetic classification of this pathogen, the existence of which is justified by domestic and foreign researchers. According to the results of the use of the basic local alignment search tool (BLAST) was found the presence of nucleotide sequences of 20 isolates of the 8th BLV genotype, deposited in GenBank NCBI. The BLV isolates of 8th genotype were detected in cattle from different regions of the world: Croatia, Ukraine, Russia and Jordan. This paper presents the results of an extended phylogenetic analysis of *env*-gene locus nucleotide sequences of 8th BLV genotype isolates, deposited in GenBank NCBI at a given time.

**Keywords:** BLV, genotype, PCR, sequencing, phylogenetic analysis, classification

Лейкоз крупного рогатого скота – хроническое вирусное заболевание опухолевой природы, возбудителем которого является РНК-содержащий онкогенный вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС, англ. Bovine leukemia virus – BLV), относящийся к роду *Deltaretrovirus* семейства *Retroviridae*.

Подходы к таксономической классификации ВЛКРС, выстраиваемые исключительно на молекулярно-генетических принципах идентификации возбудителя, за последние два десятилетия претерпели значительные изменения, начиная от различных стратегий типизации, основанных на интерпретации генерируемых ПЦР-ПДРФ-профилей [5, 6, 7], заканчивая современной оценкой генотипического разнообразия BLV на основе филогенетического анализа локуса *env*-гена данного вирусного патогена [9, 10, 11].

**Цель настоящей работы** – систематизация информационных данных о фактах выявления в различных регионах мира изолятов ВЛКРС, относящихся согласно современной филогенетической классификации данного возбудителя к новому (8-му) генотипу BLV.

### Материалы и методы исследования

Экстракция общей ДНК из цельной (консервированной ЭДТА) крови крупного рогатого скота проводилась с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб Б», согласно инструкции производителя («ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора МЗ РФ).

При постановке ПЦР с выделенными образцами провирусной ДНК BLV применялась модификация «nested» ПЦР с использованием набора внешних (*env*5032 + *env*5608) и внутренних (*env*5099 + *env*5521) праймеров, иницирующих на заключительном этапе реакции амплификацию локуса *env*-гена ВЛКРС длиной 444 п.н. [1, 2, 5, 6, 7].

Секвенирование продукта амплификации локуса *env*-гена выявленного изолята провируса BLV

«N174» выполнено на приборе «ABI-300» ((Applied Biosystems, США) в лабораториях НПО «СибЭнзим» (Россия, г. Новосибирск), остальных пяти изолятов 8-го генотипа ВЛКРС («N006», «N063», «N089», «N121» и «N142») – на генетическом анализаторе «ABI PRISM 3100» (Applied Biosystems, США) в НИИ «Синтол» (Россия, г. Москва) с использованием олигонуклеотидов «env5099» и «env5521» в качестве сиквенсных праймеров.

Секвенированные последовательности локуса *env*-гена выявленных нами изолятов 8-го генотипа ВЛКРС: «N174» (JF713455), «N006» (KC867140), «N063» (KC886616), «N089» (KC886624), «N121» (KC886631), «N142» (KC886634) выравнены по длине 400 нуклеотидов с соответствующими последовательностями типовых представителей известных генотипов BLV, используя программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и MEGA-4, с последующим филогенетическим анализом.

### Результаты исследования и их обсуждение

По результатам использования поисковой программы основного локального выравнивания (BLAST), установлено наличие 20 депонированных в GenBank NCBI нуклеотидных последовательностей изолятов нового (8-го) генотипа ВЛКРС.

Перечень этих изолятов BLV с указанием идентификационных номеров доступа (GenBank A/N), начальной даты отправки информации для депонирования в GenBank нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена провируса, включая регион выявления возбудителя, отражен в табл. 1.

**Таблица 1**

Перечень изолятов 8-го генотипа ВЛКРС, чьи нуклеотидные последовательности локуса *env*-гена депонированы в GenBank NCBI

№ п/п	Генотип	Изолят	GenBank A/N	Дата отправки в GenBank	Регион выявления	Ссылка
1	8-й	M1/ELG_Cro/08	GU724606	08-FEB-2010	Хорватия	[4]
2	8-й	4-6	HM563764	17-JUN-2010	Украина	[11]
3	8-й	4-1	HM563766	17-JUN-2010	Украина	[11]
4	8-й	3-43	HM563767	17-JUN-2010	Украина	[11]
5	8-й	2-48	HM563768	17-JUN-2010	Украина	[11]
6	8-й	N174	JF713455	19-MAR-2011	Россия (Татарстан)	[1, 2]
7	8-й	ELG_Cro/BEM/08	JN990069	03-NOV-2011	Хорватия	[4]
8	8-й	ELG_Cro/OSA/08	JN990070	03-NOV-2011	Хорватия	[4]
9	8-й	ELG_Cro/ORA/09	JN990071	03-NOV-2011	Хорватия	[4]
10	8-й	ELG_Cro/VRA/09	JN990072	03-NOV-2011	Хорватия	[4]
11	8-ой	ELG_Cro/MIT/09	JN990073	03-NOV-2011	Хорватия	[4]
12	8-й	ELG_Cro/BIO/10	JN990074	03-NOV-2011	Хорватия	[4]
13	8-й	MKC2137	JQ675759	15-FEB-2012	Россия (Московская обл.)	
14	8-й	MKC3511	JQ675760	15-FEB-2012	Россия (Московская обл.)	
15	8-й	BLV-Jor-10	JX120612	24-APR-2012	Иордания	[3]
16	8-й	N006	KC867140	06-APR-2013	Россия (Татарстан)	Данная статья
17	8-й	N063	KC886616	10-APR-2013	Россия (Татарстан)	Данная статья
18	8-й	N089	KC886624	11-APR-2013	Россия (Татарстан)	Данная статья
19	8-й	N121	KC886631	11-APR-2013	Россия (Татарстан)	Данная статья
20	8-й	N142	KC886634	11-APR-2013	Россия (Татарстан)	Данная статья

Построенная на основании филогенетического анализа локуса *env*-гена дендрограмма типовых представителей известных генотипов ВЛКРС представлена на рисунке.

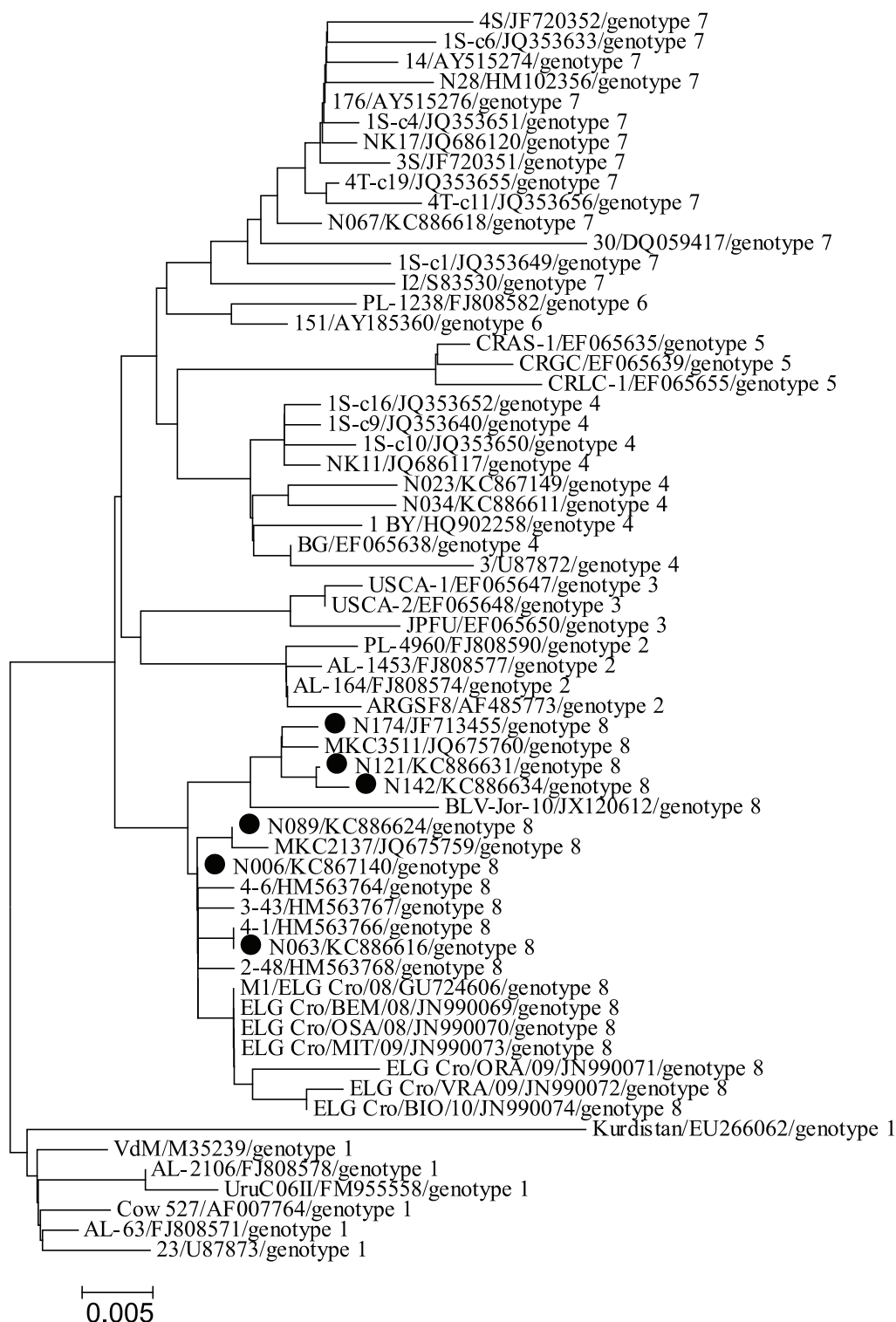
В хронологическом порядке самым первым представителем 8-го генотипа ВЛКРС, депонированным в GenBank NCBI, является изолят «M1/ELG\_Cro/08» (GU724606), выявленный в Хорватии. Информация о его генотипической принадлежности, включая еще шесть депонированных

хорватскими исследователями изолятов («ELG\_Cro/BEM/08», «ELG\_Cro/OSA/08», «ELG\_Cro/ORA/09», «ELG\_Cro/VRA/09», «ELG\_Cro/MIT/09», «ELG\_Cro/BIO/10») нового генотипа BLV, опубликована в работе D. Balic et al. (2012) [4].

Примечательно, что в том же томе (Vol. 157) журнала Archives of Virology, где публиковались хорватские исследователи [4], но в более позднем его номере (№ 12) вышла статья ученых из Иордании и Саудовской Аравии [3], посвященная детекции

и молекулярной характеристике вируса лейкоза крупного рогатого скота, обнаруженного в Иордании. *M.M. Ababneh et al. (2012)* [3] тогда в своей работе охарактеризовали

выявленный ими иорданский изолят «BLV-Jor-10» (JX120612) как принадлежащий новому, ранее не классифицированному генотипу BLV.



Дендрограмма типовых представителей известных генотипов ВЛКРС, построенная на основании филогенетического анализа локуса *env*-гена [MEGA-4: алгоритм NJ, 400 nt, 62 seq.]. Обозначения: черный круг – изоляты 8-го генотипа BLV, выявленные у крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Республики Татарстан РФ

Следует отметить, что в вышеперечисленных работах [3, 4] авторы обосновывали существование нового генотипа ВЛКРС только на примере своих выделенных изолятов, без сравнительного анализа с другими представителями ВЛКРС, также входящими в филогенетический кластер данного нового генотипа, среди которых к тому времени уже были депонированные в GenBank NCBI нуклеотидные последовательности локуса *env*-гена изолятов, выявленных в Украине («3-43», «4-1», «2-48», «4-6») и России («N174»).

В 2013 г. *M. Rola-Luszczak et al.* [11] в своей статье подтвердили факт существования нового генотипа BLV, проведя филогенетический анализ хорватских, украинских и российского («N174», GenBank A/N: JF713455) изолятов, за исключением иорданского. Также этим коллективом авторов [11] было предложено именовать данный новый генотип BLV «8-ым» генотипом, уточняя при этом, что филогенетическая классификация на основе UPGMA-метода, предложенная ранее японскими исследователями [8] и уже предусматривавшая существование 8-го генотипа возбудителя, является некорректной.

В настоящей же работе представлены результаты расширенного филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена изолятов 8-го генотипа ВЛКРС (рисунок), депонированных в GenBank NCBI на данный момент времени, включая анализ соответствующих последовательностей пяти новых изолятов провируса, обнаруженных нами у крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Республики Татарстан РФ («N006», «N063», «N089», «N121», «N142»); депонированы в GenBank в 2013 г.), а также двух изолятов BLV («MКС2137» и «MКС3511»); депонированы в GenBank в 2012 г.), выявленных на территории Московской области РФ отечественными учеными из Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко.

Следует подчеркнуть, что все же первое упоминание обоснования факта существования нового 8-го генотипа BLV было изложено в нашей ранней публикации 2011 года [1] с содержащейся в ней информацией, что «...изолят «N174», выявленный также в Дрожжановском районе РТ, характеризуется признаком нового, ранее не изученного генотипа ВЛКРС, обозначенного нами «8-й генотип», ввиду формирования на выстраиваемой дендрограмме автономного генотипического кластера, в который также входят изученные другими исследова-

телями близкородственные изоляты, выявленные в Украине [«4-1» (GenBank A/N: HM563766); «3-41» (GenBank A/N: HM563767)] и Хорватии [«M1/ELG\_Cro/08» (GenBank A/N: GU724606)] соответственно» [1].

### Заключение

Изоляты нового 8-го генотипа ВЛКРС выявлены в различных регионах мира: Хорватии, Украине, России, Иордании; их нуклеотидные последовательности локуса *env*-гена депонированы в GenBank NCBI в период с 2010 по 2013 год (GU724606, HM563764, HM563766, HM563767, HM563768, JF713455, JN990069, JN990070, JN990071, JN990072, JN990073, JN990074, JQ675759, JQ675760, JX120612, KC867140, KC886616, KC886624, KC886631, KC886634).

Первая информация об обосновании 8-го генотипа BLV описана в нашей ранней статье 2011 года выпуска [1], с независимым подтверждением факта существования нового (8-го) генотипа ВЛКРС в чуть более поздних публикациях зарубежных и отечественных ученых, вышедших в свет в 2012–2013 годах [3, 4, 11].

### Список литературы

1. Генотипическая идентификация изолятов ВЛКРС, выявленных в хозяйствах Республики Татарстан / А.Ю. Шаева, Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, Б.В. Камалов, А.М. Алимов, М.Ш. Тагиров // Ученые записки КГАВМ. – 2011. – Т. 208. – С. 330–337.
2. Шаева А.Ю. Идентификация нового генотипа ВЛКРС / А.Ю. Шаева, З.Р. Гараева, Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, А.М. Алимов // Ученые записки КГАВМ. – 2012. – Т. 211. – С. 192–197.
3. Detection and molecular characterization of bovine leukemia viruses from Jordan / M.M. Ababneh, R.K. Al-Rukibat, W.M. Hananeh, A.T. Nasar, M.B. Al-Zghoul // Arch. Virol. – 2012. – Vol. 157. – № 12. – P. 2343–2348.
4. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus / D. Balic, I. Lojkić, M. Periskić, T. Bedeković, A. Jungić, N. Lemo, B. Roic, Z. Cac, L. Barbic, J. Madić // Arch. Virol. – 2012. – Vol. 157. – № 7. – P. 1281–1290.
5. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing / D. Beier, P. Blankenstein, O. Marquardt, J. Kuzmak // Berl Munch Tierarztl Wochenschr – 2001. – Vol. 114. – № 7–8. – P. 252–256.
6. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle / H. Fechner, P. Blankenstein, A.C. Looman, J. Elwert, L. Geue, C. Albrecht, A. Kurg, D. Beier, O. Marquardt, D. Ebner // Virology – 1997. – Vol. 237. – № 2. – P. 261–269.
7. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts / M. Licursi, Y. Inoshima, D. Wu, T. Yokoyama, E.T. González, H. Sentsui // Virus Res. – 2002. – Vol. 86. – № 1–2. – P. 101–110.
8. Matsumura K. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan / K. Matsumura, E. Inoue, Y. Osawa, K. Okazaki // Virus Res. – 2011. – Vol. 155. – № 1. – P. 343–348.
9. Moratorio G. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven



distinct genotypes / G. Moratorio, G. Obal, A. Dubra, A. Correa, S. Bianchi, A. Buschiazzo, J. Cristina, O. Pritsch // *Arch. Virol.* – 2010. – Vol. 155. – № 4. – P. 481–489.

10. 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, K. Trono, L.R. Jones // *J Gen Virol.* – 2009. – Vol. 90. – № 11. – P. 2788–2797.

11. Rola-Luszczak M. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny / M. Rola-Luszczak, A. Pluta, M. Olech, I. Donnik, M. Petropavlovskiy, A. Gerilovych, I. Vinogradova, B. Choudhury, J. Kuzmak // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 3. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058705>.

### References

1. Shaeva A.Y., Vafin R.R., Khazipov N.Z., Kamalov B.V., Alimov A.M., Tagirov M.Sh., *Uchenye zapiski KGAVM*, 2011, Vol. 208, pp. 330–337.

2. Shaeva A.Y., Garaeva Z.R., Vafin R.R., Khazipov N.Z., Alimov A.M., *Uchenye zapiski KGAVM*, 2012, Vol. 211, pp. 192–197.

3. Ababneh M.M., Al-Rukibat R.K., Hananeh W.M., Nasser A.T., Al-Zghoul M.B., *Arch. Virol.*, 2012, Vol. 157, no. 12, pp. 2343–2348.

4. Balic D., Lojkic I., Periskic M., Bedekovic T., Jungic A., Lemo N., Roic B., Cac Z., Barbic L., Madic J., *Arch. Virol.*, 2012, Vol. 157, no. 7, pp. 1281–1290.

5. Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuzmak J., *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*, 2001, Vol. 114, no. 7–8, pp. 252–256.

6. Fechner H., Blankenstein P., Looman A.C., Elwert J., Geue L., Albrecht C., Kurg A., Beier D., Marquardt O., Ebner D., *Virology*, 1997, Vol. 237, no. 2, pp. 261–269.

7. Licursi M., Inoshima Y., Wu D., Yokoyama T., González E.T., Sentsui H., *Virus Res.*, 2002, Vol. 86, no. 1–2, pp. 101–110.

8. Matsumura K., Inoue E., Osawa Y., Okazaki K. *Virus Res.*, 2011, Vol. 155, no. 1, pp. 343–348.

9. Moratorio G., Obal G., Dubra A., Correa A., Bianchi S., Buschiazzo A., Cristina J., Pritsch O., *Arch. Virol.*, 2010, Vol. 155, no. 4, pp. 481–489.

10. Rodriguez S.M., Golemba M.D., Campos R.H., Trono K., Jones L.R., *J. Gen. Virol.*, 2009, Vol. 90, no. 11, pp. 2788–2797.

11. Rola-Luszczak M., Pluta A., Olech M., Donnik I., Petropavlovskiy M., Gerilovych A., Vinogradova I., Choudhury B., Kuzmak J., *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 3, available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058705>.

### Рецензенты:

Госманов Р.Г., д.в.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, г. Казань;

Ахметов Т.М., д.б.н., доцент кафедры технологии животноводства Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, г. Казань.

Работа поступила в редакцию 09.10.2013.