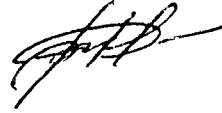


14

На правах рукописи



ДРОБОТ ЕЛЕНА ВИКТОРОВНА

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОТИПИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ  
ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА  
И ОСОБЕННОСТИ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО  
И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ ЛЕЙКОЗА**

16 00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология  
03 00 23 - биотехнология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



00306623 1

НОВОСИБИРСК - 2007

Работа выполнена в ФГОУ ВПО Новосибирский государственный аграрный университет, Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии "Вектор"

Научные руководители доктор ветеринарных наук, профессор  
**Смирнов Павел Николаевич**  
доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
**Белявская Валентина Александровна**

Официальные оппоненты доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
**Логинов Сергей Игоревич,**  
ФГОУ ВПО НГАУ  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
**Агафонов Сергей Петрович,**  
ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск

Ведущее учреждение **Государственное учреждение Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН (г. Новосибирск)**

Защита состоится "10" октября 2007 г в 13<sup>00</sup> ч на заседании Диссертационного совета Д 006 045 01 при Государственном научном учреждении Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии по адресу 630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, п. Краснообск, ГНУ ИЭВСиДВ

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНХБ СО Россельхозакадемии

Автореферат разослан «8» сентября 2007 г

Ученый секретарь  
диссертационного совета,



Г. М. Стеблева

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В структуре инфекционной патологии лейкоз крупного рогатого скота в РФ занимает лидирующее место и составляет 57% от других нозологий (М И Гулюкин, 2003, А М Смирнов, 2005)

Широкое распространение лейкоза крупного рогатого скота в сельскохозяйственных предприятиях и организациях всех форм собственности, социальная значимость данной нозологии, отсутствие средств терапии и специфической профилактики определяют актуальность фундаментальных и приоритетно-прикладных исследований по этой проблеме (П Н Смирнов, 1992, В В Разумовская, 2004, М И Гулюкин, 2003, В В Храмцов, М А Амироков, 2005 и др )

В последнее время продолжается накопление новых научных данных о влиянии социоэкономических факторов (уровень развития животноводства, ветеринарной и зоотехнической организации) и факторов внешней среды (техногенное воздействие, негативные природные влияния, резко континентальный климат) на развитие и распространение вируса лейкоза крупного рогатого скота (В М Нахмансон и др ,1975, В В Храмцов, 1987, А Г Незавитин,1995,1998, И М Донник, 2000, С И Логинов, 2006) Однако не менее важным фактором является способность организма формировать на специфический патоген адекватный иммунный ответ, что обусловлено, прежде всего, физиологической активностью систем гомеостаза, а также свойствами самого возбудителя, в частности его способностью внедрения в геном восприимчивого животного (уход от системы антивирусного надзора) и персистенции (Argyle D J, 1999, Гулюкин М И и др , 1999) Индивидуальная вариабельность геномов вируса и хозяина, по взаимодействующим генам, может частично обуславливать восприимчивость к лейкозу (Н Shin et al, 2000, С В Чичинаина, 2005 и др )

Одной из проблем в организации оздоровительной работы, является относительно низкий предел чувствительности реакции иммунодиффузии (РИД), используемой для выявления животных - носителей вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) (В Г Арутюнян, 1992, Р З Файзулин, 1996, М И Гулюкин, В В Храмцов, 2003, И М Донник, 2005, и др ) Кроме того, случаи отрицательных результатов в тест-системе РИД при тестировании инфицированных ВЛКРС могут быть связаны с индивидуальными особенностями взаимодействия в системе «вирус-хозяин» А также, с наличием в геноме хозяина генов противовирусной защиты и наличием в геноме вируса вариантов генов, способных наиболее эффективно воздействовать на клеточные системы организма хозяина, то есть для более эффективной стратегии выживания Поэтому возникает вопрос – в связи, с чем в одних случаях удается добиться эффективного оздоровления стад с помощью РИД, а в других нет

Если изучение этиологических, патогенетических и биологических аспектов (иммунологические, биохимические, цитогенетические) вируса лейкоза крупного рогатого скота достаточно подробно представлены в научных трудах, то гетерогенность вируса лейкоза крупного рогатого скота и его

возможное влияние на эпизоотическое и гематологическое проявление лейкоза изучены недостаточно. Более глубокие научные познания в этой области позволят эффективнее проводить оздоровительную работу.

**Цель исследований** - изучить генотипическое разнообразие ВЛКРС в хозяйствах Новосибирской области и оценить его влияние на отдельные гематологические показатели инфицированных животных. В соответствии с целью были сформулированы следующие **задачи исследований**:

1 Изучить возможность использования биологических жидкостей (кровь, молоко, сыворотка крови) крупного рогатого скота для постановки ПЦР и генотипирования вируса лейкоза крупного рогатого скота

2 Определить генотипическое (по генам *env* и *tax*) разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на сельскохозяйственных предприятиях Новосибирской области

3 Изучить эпизоотическую ситуацию по лейкозу крупного рогатого скота на сельскохозяйственных предприятиях Новосибирской области с учетом генотипирования ВЛКРС

4 Провести сравнительные исследования отдельных показателей крови у крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС разной генотипической принадлежности

**Научная новизна.** Изучено генотипическое разнообразие ВЛКРС в стадах Новосибирской области с разной степенью инфицированности вирусом лейкоза. Выявлена циркуляция двух известных генотипов ВЛКРС по гену *env* - первого и шестого. Выявлена ранее не описанная генотипическая гетерогенность (не менее трех генотипов) популяции вируса по гену *tax*.

Установлен факт циркуляции ВЛКРС в популяциях крупного рогатого скота как в моноварианте (6-й генотип), так и в биварианте (1-й и 6-й генотипы), причем с преобладанием в одних случаях шестого, в других – первого генотипа. Установлено, что первый генотип по гену ассоциирован с одним из генотипов *tax*, в то время как 6 ой генотип со всеми нами обнаруженными.

Экспериментально установлена возможность использования биологических жидкостей - крови, сыворотки крови и молока для постановки ПЦР с исследовательской целью в малых количествах (не более 500 мкл биологической жидкости)

В специальных исследованиях установлено, что ДНК, выделенная в нашей модификации, может храниться как минимум 3-5 лет (время наблюдения) в режиме охлаждения  $-20^{\circ}\text{C}$

По отдельным гематологическим показателям (абсолютное содержание лимфоцитов и лейкоцитов в единице объема крови) установлена связь между их повышением у животных и генотипической принадлежностью ВЛКРС

**Теоретическая и практическая значимость.** Генотипическое разнообразие ВЛКРС и результаты сравнительного исследования, в контексте их эпизоотической значимости в неблагополучных по лейкозу стадах, открывают новые методические подходы в разработке научно-обоснованных схем оздоровления неблагополучных по лейкозу стад

Установление принадлежности ВЛКРС к определенному генотипу может служить основанием для расширения исследований в данном направлении, в проведении исследований в выявлении патогенетических особенностей развития лейкозного процесса как в экспериментальном, так и в спонтанном вариантах

**Апробация работы** Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях научно-методического совета ИВМ ФГОУ ВПО Новосибирский государственный аграрный университет (2005-2006), Сибирском международном ветеринарном конгрессе (Новосибирск, 2005), Научно-практической конференции - совещании (Екатеринбург, 2005), Российской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней» (Новосибирск, 2005), Международной научно-производственной конференции «Эколого-биологические проблемы повышения продуктивного долголетия животных» (Екатеринбург, 2006)

**Публикации результатов исследований.** По теме диссертационной работы опубликовано 9 научных работ

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 107 страницах и состоит из введения, обзора литературы, заключения по обзору литературы, материалов и методов, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 18 рисунками. Список использованной литературы включает 190 источников, в том числе 101 зарубежных авторов

**Внедрение результатов исследований** Результаты исследований использованы при разработке методической рекомендации "Генотипирование ВЛКРС методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) - рассмотрены и утверждены на научно-методическом Совете ФГОУ ВПО ИВМ НГАУ (протокол № 4 от 10.11.2005г)

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1 Результаты использования сыворотки крови и молока крупного рогатого скота в ПЦР с исследовательской целью в малых количествах

2 Генотипическое разнообразие популяции вируса лейкоза крупного рогатого скота в нескольких сельскохозяйственных предприятиях Новосибирской области по генам env и tax

3 Количественные показатели лейкоцитов и лимфоцитов крупного рогатого скота инфицированного ВЛКРС разной генотипической принадлежности

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Материалы и методы исследований**

Работа выполнена на базе кафедры акушерства и патологии иммунной системы ИВМ НГАУ, лаборатории биохимии вирусов ГНЦ ВБ «Вектор» и лаборатории лейкозов ГНУ ИЭВС и ДВ СО РАСХН в 2000-2006 гг

Объект исследования - крупный рогатый скот черно-пестрой голшти-низированной породы с разной долей голштинизации, принадлежащий сель-хозпредприятиям Новосибирской области

В работе использовалась ДНК, выделенная ранее, в рамках выполнения международного гранта МНТЦ 1883, из крови животных, принадлежащих ЗАО «Благодатное», ЗАО «Калиновское» Карасукского района, ОПХ «Бор-овское» Новосибирского района

Предмет исследования - пробы крови и сыворотки крови животных, молоко, а также ДНК, гены вируса лейкоза крупного рогатого скота *env* и *tax*

В процессе работы гематологическому исследованию подвергнуто 236 проб, ПЦР диагностике - 573 пробы, из них 495 проб крови, 65-сыворотки крови и 13 проб молока РИД диагностике подвергнуто 507 проб сыворотки крови Из 65 проб сыворотки крови и 13 проб молока выделена ДНК Для ис-следования полиморфизма гена *tax*

Эпизоотическая обстановка по лейкозу крупного рогатого скота в от-дельных районах изучена на основе данных ветеринарной отчетности за 5 лет (2000-2004 гг ) Управления ветеринарии администрации Новосибирской об-ласти

Диагностические исследования крупного рогатого скота на лейкоз и инфекцию ВЛКРС проводили в соответствии с Методическими указаниями по диагностике лейкоза крупного рогатого скота, утвержденными ДВ МСХ РФ (М , 1999), в лаборатории лейкозов ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН

Препараты ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови и мо-лока в лаборатории биохимии вирусов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» по методу К Смита и соавт (1990) с небольшими модификациями

ДНК из сыворотки крови выделяли согласно методу, описанному Т Маниатис и др , (1984) с нашими модификациями

Генотипическое разнообразие ВЛКРС изучали методом генотипирова-ния генов провирусной ДНК – *env* и *tax*

Генотипирование по гену *env* проводили «nested» ПЦР по методу, опи-санному Licursi et al (2002), с последующим ПДРФ анализом с использова-нием рестриктаз *NAEIII*, *BCL I* Нуклеотидная последовательность генома провирусной ДНК была получена из GeneBank (Acc num AF033818)

Структура олигонуклеотидных праймеров для изучения области *gp51* гена *env* ВЛКРС взята из статьи М Licursi et al (2002)

Внешние праймеры (фрагмент 598 п н )

*env*<sub>5032</sub> (5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3 )

*env*<sub>5099</sub> (5'-CCCACAAGGGCGGCCCGGTTT-3 )

Внутренние праймеры (фрагмент 444 п н )

*env*<sub>5521</sub> (5 -GCGAGGCCGGTCCAGAGCTGG-3')

*env*<sub>5608</sub> (5'-AACAACAACCTCTGGGAAGGGT-3')

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакцион-ной смеси, содержащей 2,5 мкл буфера (65мМ трис- HCl (pH 8,9), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 16мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 % Твин-20 (ИЦиГ, г Новосибирск), 2,5 мкл 0,5 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов («СибЭнзим» г Новосибирск), по

0,5 мкл праймеров и 1,5 ед активности Таq-ДНК-полимеразы (ИЦиГ, г Новосибирск) Геномную ДНК использовали в различной концентрации от 0,1 мкг/мл до 0,5 мкг/мл в реакционной смеси Смесь помещали в амплификатор Eppendorf "Mastercycler Gradient"

Все ампликоны (по 5-10 мкл от пробы) анализировали с помощью электрофореза в 1,5-2 % агарозном (горизонтальный) геле (AGAROSE, ICN Biomedicals inc) с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия с концентрацией 1 мг/мл (Т Маниатис и соавт, 1984) В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp («СибЭнзим» г Новосибирск)

Генотипирование по гену *tax* проводили собственным методом ПЦР-ПДРФ с использованием рестриктазы НАЕ III Для поиска консервативных последовательностей фланкирующих ген проводили сравнительный анализ 6 вариантов последовательности гена, представленных в Gene Bank (Acc num AF033818 AF257515, AY189715, AY189716 AY189717, AY189718) Структуру праймеров оптимизировали с использованием программ Oligo ([www oligo net](http://www.oligo.net)) и Vector NTI 5 2 ([http //www invitrogen com](http://www.invitrogen.com))

Прямой праймер *tax*<sub>6985</sub> (5'-AAGCTCTTCGGGATCCATTACCTG-3')

Обратный праймер *tax*<sub>8059</sub> (5'GGATTCTAGCCACCAGCTGCCGTC-3')

Олигонуклеотидные праймеры синтезировали с помощью компьютерной программы Oligo version 3 0 ([www oligo net](http://www.oligo.net)) на автоматическом синтезаторе ASM 102 (фирма «Биосет») в лаборатории химического синтеза ФГУН ГНЦ «Вектор» (рук Ю Горбунов)

Выбор оптимального режима амплификации проводили, исходя из длины амплифицируемого фрагмента T<sup>0</sup> отж после проведения температурного градиента Стадии начальной денатурации (2 мин при 94°C) и конечной полимеризации (3 мин при 72°C) были обязательными в каждом варианте амплификации Количество циклов подбирали эмпирически для наиболее высокого выхода специфичного ампликона при минимальном содержании неспецифических фрагментов Смесь помещали в амплификатор Eppendorf "Mastercycler Gradient" ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, которую помещали в амплификатор с заданной программой температурно-временных циклов T<sub>ден</sub> 94°C – 2 мин (T<sub>ден</sub> 95°C – 0,2 мин, T<sub>отж</sub> 64°C, T<sub>элон</sub> 72°C – 0,5 мин) – 29 циклов, T<sub>элон</sub> 72°C – 3 мин

Рестрикционный анализ (для ПДРФ) проводили в стандартных условиях (Т Маниатис и соавт, 1984) Продукты рестрикции анализировали электрофоретически в 6-10% полиакриламидном или 1,5-2 % агарозном геле и тестировали в УФ-свете с помощью прибора УФ – трансиллюминатора УВТ-1 («Биокот», г Москва)

Статистическая обработка цифровых данных была проведена с использованием стандартных программ на персональном компьютере и включала подсчет средних арифметических величин (M) и ошибок средних (m) Таблицы содержат информацию в виде значения (M+m) Сравнение средних величин осуществляли с помощью параметрических критериев для независимых выборок по Г Ф Лакину (1980) с использованием t-критерия Стьюдента

Работа частично выполнена в рамках гранта МНТЦ 1883 ГНЦ ВБ "Вектор" (руководитель - д б н , профессор М И Воевода)

## 2.2. Результаты исследований

### 2.2.1. Формирование выборок для молекулярно-генетического анализа

Для молекулярно-генетических исследований формировались выборки животных из 9 районов Новосибирской области

Постановку ПЦР и генотипирование вируса лейкоза проводили с использованием наиболее информативных, по нашему мнению, биологических жидкостей. Для ранней диагностики инфицированности и возможного прогнозирования выхода животного в заболевание, от них отбирали пробы крови и сыворотки. Пробы молока отбирали, как альтернативу пробам крови, в диагностике и генотипировании вируса лейкоза крупного рогатого скота. Кроме того, отбор проб молока исключает возможность стрессирования животных.

Общее количество проб, отобранное для наших исследований, представлено в табл 1

Таблица 1 - Общее количество проб крови и сыворотки крови использованных в трех диагностических тестах

Район (сельскохозяйственное предприятие) Новосибирской обл	Общее кол-во проб	Характеристика пробы	Исследовано			Генотипировано, проб
			РИД	ПЦР	гематологические	
Новосибирский (учхоз «Туллинское»)	214	кровь	-	107	-	6
		сыворотка крови	107	6	-	6
Новосибирский (ОАО «Морские Нивы»)	63	кровь	-	25	-	21
		сыворотка крови	25	13	-	-
		молоко	-	13	-	13
Новосибирский (ОПХ «Боровское»)	60	кровь	-	30	30	11
		сыворотка крови	30	-	-	-
Кочневский (ОПХ «Кремлевское»)	154	кровь	-	127	29	60
		сыворотка крови	127	21	-	13
Каргатский (ОАО «Кубанское»)	40	кровь	-	20	-	7
		сыворотка крови	20	5	-	3
Чулымский (ЗАО «Большевикское»)	18	кровь	-	9	-	8
		сыворотка крови	9	-	-	-
Барабинский (СПК «Новоспасский»)	100	кровь	-	50	50	32
		сыворотка крови	50	-	-	-
Сузунский (ЗАО "Кирова")	12	сыворотка крови	12	12	-	7
Кольванский (ОАО "Вьюнское")	32	кровь	-	16	16	14
		сыворотка крови	16	10	-	9
Здвинский (ЗАО "Рошинское")	40	кровь	-	20	20	13
		сыворотка крови	20	-	-	-
Карасукский (ЗАО «Калиновское»)	122	кровь	-	61	61	39
		сыворотка крови	61	-	-	-
Карасукский* ЗАО «Благодатное»	60	кровь	-	30	30	10
		сыворотка крови	30	-	-	-
ИТОГО	915		507	573	236	272



Отобранные нами образцы проб (915) были исследованы в тест-системах - РИД - 507 проб, ПЦР - 573 пробы из них 13 проб молока, 495 проб крови и 65 проб сыворотки, 236 проб исследовали гематологическим методом Генотипировано 228 проб крови, 36 проб сыворотки и 13 - молока. Полученные результаты были проанализированы, данные анализа представлены ниже

### **2.2.2. Выделение ДНК из биологических жидкостей в скрининговом формате и возможность ее использования для постановки полимеразной цепной реакции**

Мониторинг вирусной инфекции предполагает массовые исследования животных. Предпочтение отдается ресурсосберегающим методам на каждой из стадий анализа. Первая стадия анализа методом ПЦР предполагает получение образцов ДНК.

#### *Постановка скрининговых методов*

1. Выделение ДНК из крови проводили из объема 500 мкл, адаптировав описанную ранее методику выделения ДНК из крови (Чичина С В, 2005), увеличив обороты на стадии промывки спиртом до 12 тыс в минуту для лучшего осаждения ДНК и прикрепления ее к стенкам пробирки.

При исследовании проб ДНК крови у РИД-отрицательных животных методом ПЦР в 35 случаях (14%) из 237 обнаружена ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота. В то же время в группе РИД-положительных животных в ПЦР получен отрицательный результат у 77 животных из 270 (27,6%).

Исследование влияния статуса животного (по показателю инфицированности) на показатели концентрации ДНК показало, что у серопозитивных животных концентрация ДНК, выделенной из крови, в 1,5 раза выше по сравнению с серонегативными животными, хотя данные статистически не достоверны, что на наш взгляд обусловлено малой выборкой.

2. Выделение ДНК из сыворотки крови проводили с использованием модифицированных нами методов, направленных на увеличение выхода ДНК и уменьшение сроков выделения. В одной из собственных модификаций был использован СТАБ (цетилтриэтиламмонийбромид) - сорбент для специфического связывания нуклеиновых кислот. Контрольное выделение проводили с помощью коммерческого набора (производство ООО «Лаборатория Меди-ген»).

ДНК оценивали по выходу мг/мл биологической жидкости (концентрация) и по «чистоте», оцениваемые по Маниатису как отношение  $A_{260} / A_{280}$  (табл 2).

Таблица 2 - Показатели концентрации и чистоты препаратов ДНК из сыворотки при различных способах выделения

Способ выделения	Концентрация ДНК, мг/мл	Чистота выделенной ДНК, A260 / A280
первый вариант, n=25	0,9889±0,1491	1,1937±0,2203
второй вариант, n=9	1,9553±0,2541*	1,0132±0,0609
контроль, n=19	1,9057±0,1208**	1,1642±0,0733

\*P<0,01, \*\*P<0,001

Показатели концентрации ДНК, приведенные в таблице 2, в 2 раза были выше при использовании способа с применением СТАБ (P<0,01) и при выделении ДНК с использованием коммерческого набора (P<0,001). При этом ее «чистота» (по показателю A260 / A280 на наличие примесей), не зависела от способа выделения и находилась на одном уровне при всех способах выделения.

Таким образом, введение предварительной стадии осаждения нуклеиновой кислоты с помощью СТАБ осаждения значительно повышает выход ДНК до показателя коммерческого набора.

Чистота (по показателю A260 / A280 на отсутствие белковых примесей) ДНК выделенной из сыворотки, тем не менее не зависела от способа выделения и находилась на одном уровне при всех способах выделения.

При исследовании проб сыворотки в реакции ПЦР в 32 пробах из 65 проб сыворотки была обнаружена провирусная ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота, в то время как из 65 проб крови провирусная ДНК обнаружена только у 29 животных. Таким образом, использование сыворотки крови позволяет выявлять около 4,6% инфицированных ВЛКРС животных.

3 Для выделения ДНК из молока использовали классический метод с нашими модификациями (уменьшение объема и времени выделения путем укорочения первой фазы выделения). Выделение ДНК проводили из молока хранившегося при температуре +4<sup>0</sup>С и -20<sup>0</sup>С. Полученные пробы ДНК использовали для постановки ПЦР (рис 1) и генотипирования вируса лейкоза. Контролем служили результаты ПЦР и генотипирования проб ДНК, выделенных ранее из крови. При проведении реакции ПЦР наблюдали совпадение результатов в 100% случаев.

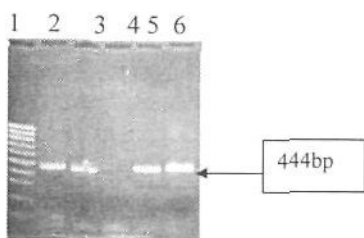


Рисунок 1 - Электрофорез в 2 % агарозном геле продуктов амплификации гена epv при использовании ДНК выделенной из молока. 1-я - дорожка - маркер. Дорожки 2-3 - пробы молока хранившиеся при температуре +4<sup>0</sup>С, 5-6 - пробы молока хранившиеся при температуре - 20<sup>0</sup>С.

Таким образом, кровь, сыворотка крови и молоко могут быть использованы для выделения ДНК, постановки реакции ПЦР и генотипирования вируса лейкоза крупного рогатого скота.

### 2.2.3. Влияние условий хранения ДНК на ее качество

Результаты исследований влияния условий хранения проб ДНК показали, что ДНК, хранящаяся при температурах: Т1 - -20<sup>0</sup>С; Т2 - +6<sup>0</sup>С (концентрированная); Т3 - (+ 6<sup>0</sup>С) - 0,1 мг/мл. сохраняет удовлетворительное качество, что подтверждается электрофоретически при нанесении нативной ДНК (рис.2).

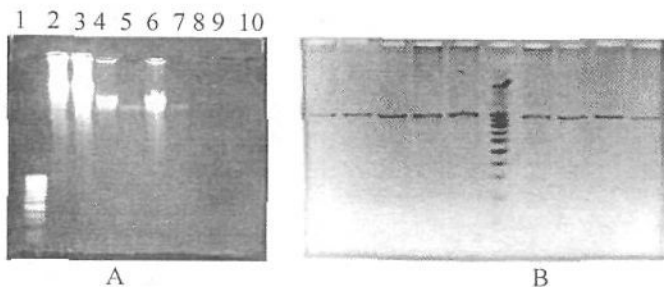


Рисунок 2 - А. - Электрофореграмма образцов ДНК в 1% геле агарозы. Дорожки 2-6 образцы ДНК ( ДНК при -20<sup>0</sup>С 16Ф, 24Ф, 125К, 148 К, 396К), 1 дорожка - маркер. В - Электрофореграмма образцов ДНК в 1 % геле агарозы. Дорожки с 1 по 5 - ДНК при +6<sup>0</sup>С (концентрированная) (16Ф, 24Ф, 125К, 148К, 396К), с 7-10 образцы ДНК при +6<sup>0</sup>С (16Ф, 24Ф, 125К, 148К).

Для того чтобы оценить качество ДНК, мы использовали ее в постановке ПЦР для получения специфического ампликона для гена в составе генома животного (IL-8R) Результаты представлены на рис 3

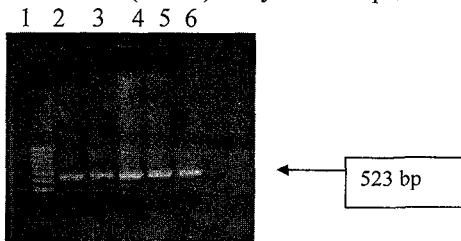


Рисунок 3 - Электрофореграмма в 1,5% агарозном геле продуктов амплификации гена IL-8R 1-я дорожка – маркер, 2-6 - пробы ДНК, хранившиеся при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$

Таким образом, можно сделать вывод о том, что ДНК, выделенная из цельной крови, может храниться длительное время, не менее 3-5 лет при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , что важно для научно-исследовательской работы

## 2.2.4. Генотипическое разнообразие популяции вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Новосибирской области

### 2.2.4.1. Генотипирование ВЛКРС по гену env

На начальном этапе образцы ДНК животных были исследованы в ПЦР При проведении «Nested» - ПЦР сегмента гена env был обнаружен провирус лейкоза крупного рогатого скота в 228 образцах крови На рисунке 4 приведена типичная картина электрофореза продуктов амплификации (фрагмент гена env, равный 444 п н), свидетельствующая о наличие провирусной ДНК в геноме животного

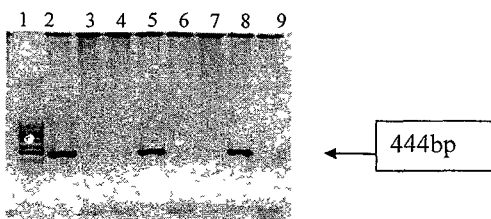


Рисунок 4 - Электрофореграмма в 2 % агарозном геле продуктов амплификации гена env ВЛКРС Дорожки 1 – маркер молекулярного веса 100 bp, 2-9 – опытные образцы ДНК

Распределение фрагментов рестриктаз, ожидаемое и полученное при проведении ПДРФ анализа, и результаты анализа представлены на рисунке 5.

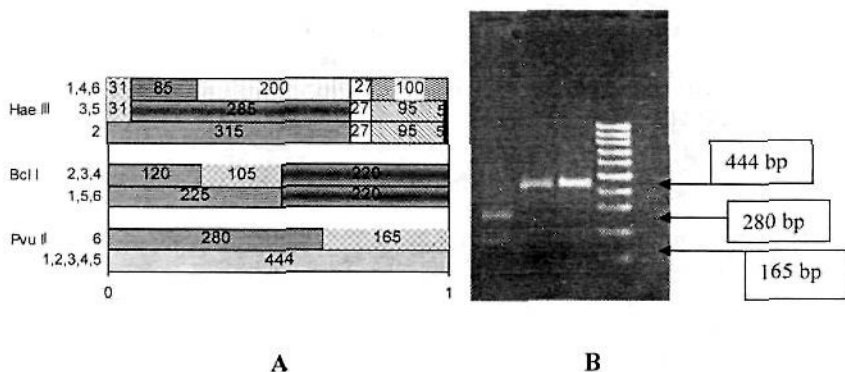


Рисунок 5 - Сайты рестрикции области gp 51 гена env. А-ожидаемые фрагменты, В - эндонуклеазы Pvu II

Сайты 225 и 220 обнаружены во всех образцах ДНК с помощью эндонуклеазы Bcl I, а фрагменты 200, 100 и 85 получены при помощи фермента HaeIII. Фермент PvuII в 1-5 генотипах образовал фрагмент 444 п.н. в 48 образцах, а у 194 животных возник рестриктный сайт, и образовались фрагменты 280 и 165 п.н.

Результаты генотипирования ВЛКРС, циркулирующего на территории Новосибирской области, представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Распределение генотипов вируса лейкоза в хозяйствах Новосибирской области

Районы	Год взятия проб	Хозяйство	Генотип ВЛКРС	
			1-ый	6-ой
Новосибирский	2002	УЧХОЗ «Тулинское»	-	6
	2003	ОАО «Морские Нивы»	-	21
	2002	ОПХ «Боровское»	1	10
Коченевский	2001	ОПХ «Кремлевское»	20	15
	2004		11	14
Каргатский	2004	ЗАО «Кубанское»	-	7
Чулымский	2004	ЗАО «Большеникольское»	-	8
Барабинский	2002	Совхоз «Новоспаский»	3	29
Сузунский	2004	ЗАО "Им. Кирова"	-	7
Колыванский	2004	ОАО "Вьюнское"	9	5
Здвинский	2004	ЗАО "Ропинское"	1	12
Карасукский	2002	ЗАО «Калиновское»	-	39
		ЗАО «Благодатное»	2	8
Итого			47	181

Распределение вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Новосибирской области в зависимости от его генотипа неоднородно (табл.3). Так доля 1-го генотипа в 9 районах Новосибирской области составляет 20 %, в то время как доля 6-го - около 80%. В отдельных хозяйствах области наблюдается циркуляция вируса в моноварианте.

У трех животных, принадлежащих ОПХ "Кремлевское" нами было обнаружено присутствие в организме животных 2-х генотипов ВЛКРС одновременно, что согласуется с данными полученными японскими учеными (Asfaw Y. et al, 2004).

#### 2.2.4.2. Изучение полиморфизма гена *tax*

Нами было проведено исследование по изучению полиморфизма вируса гена *tax*, так как он является трансактиватором вируса и играет важную роль в его репликации.

Область гена, фланкируемая праймерами, составила 1027 нп. Для генотипирования вируса лейкоза крупного рогатого скота по гену *tax* мы взяли заведомо пробы, положительно реагирующие в тест-системе ПЦР. Всего было проанализировано 54 пробы ДНК, в 32 пробах был получен нужный фрагмент. На рисунке 6 представлена типичная картина электрофореза продуктов амплификации.

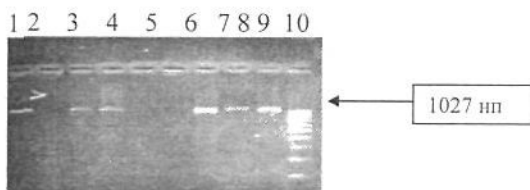


Рисунок 6 - Электрофореграмма в 2 % агарозном геле продуктов амплификации гена *tax*. Дорожки 1-9 опытные - образцы, 10- маркер молекулярного веса 100 бр.

Полученный ампликон подвергли рестрикции рестриктазой *Hae* III в условиях избытка фермента. Продукты реакций анализировали с помощью электрофореза в 10% полиакриламидном геле (рис.7).

При использовании рестриктазы было обнаружено не менее трех групп в распределении фрагментов: в первой присутствуют все ожидаемые фрагменты (А), во втором все кроме фрагмента длиной 160 н.п. (Б), третий - отсутствует фрагмент 160 н.п., но появляется фрагмент короче (между 100 нп и 160 нп) (С).

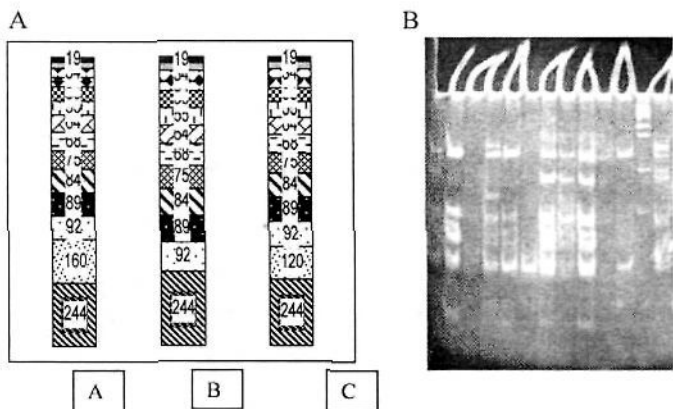


Рисунок 7 - А - ПЦР – Нае III ПДРФ анализ тах гена крупного рогатого скота. В - электрофореграмма продуктов гидролиза ампликона в 10% ПА-АГ. 1,7,8,9,13 дорожки – А; 5-В; 2,4-С; 12 –маркер bp 100.

Одновременно были соотнесены обнаруженные нами варианты полиморфизма в гене тах с генотипами вируса по гену env и результатами РИД (табл.4).

Таблица 4 - Полиморфизмы гена тах

Полиморфизм гена тах	Генотип		РИД	
	1-ый	6-ой	+	-
А	4	22	26	-
В	-	2	2	-
С		4	3	1

Полученные результаты свидетельствуют о том, что возможно 6-ой генотип более гетерогенен по гену тах, чем 1-ый, хотя утверждать однозначно пока рано из-за малочисленности группы с 1 генотипом. Тем не менее, предварительные результаты свидетельствуют о том, что вирус 6-го генотипа содержит в себе как минимум 3 варианта полиморфизмов по гену тах, в то время как 1-ый генотип вируса только один. Из всех отобранных проб лишь одно животное, будучи инфицированным, тем не менее, оказалось серонегативным, но инфицировано 6-м генотипом вируса, и отнесено нами по гену тах к полиморфизму С.

## 2.2.5. Эпизоотологический мониторинг по лейкозу крупного рогатого скота в Новосибирской области с учетом генотипирования ВЛКРС

В настоящее время в мире известно 6 генотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота. Современными исследователями изучается не только географическое распределение генотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота (J Coulston et al, 1990, D Beier et al, 2001, M Licrousi et al, 2002, Asfaw Y et al, 2005), но и их возможное влияние на результаты серологических исследований (H Fehner et al, 1997).

Мониторинг эпизоотологической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в Новосибирской области показал, что в 2004 г по сравнению с 2000 г происходит снижение уровня инфицированности (с 20 до 15,3%) и заболеваемости (с 3,4 до 1,9%) животных вирусом лейкоза крупного рогатого скота, что свидетельствует об улучшении эпизоотической ситуации по лейкозу. Вместе с тем эпизоотическая напряженность по данной нозологии в Новосибирской области все еще сохраняется.

Однако не удастся искоренить лейкоз крупного рогатого скота полностью. Так имеют место случаи выявления РИД (+) животных в уже оздоровленных стадах, в которых были получены не менее 2-х подряд отрицательных результатов, как это предусмотрено правилами (М, 2000). Периодическое выявление серопозитивных животных в оздоровленных стадах имеет место в различных сельскохозяйственных предприятиях НСО, что является проблемой для науки и практики.

В связи с этим нами были проанализированы данные серологических исследований в учхозе "Тулинское" за последние 8 лет на лейкоз крупного рогатого скота, в котором периодически регистрируются единичные случаи выявления серопозитивных животных. Хотя по данным ветеринарной отчетности хозяйство является благополучным по лейкозу крупного рогатого скота на протяжении не менее чем 15 лет.

По результатам исследований в тест системе РИД было выявлено 2 серопозитивных животных, в то время как в ПЦР реагировало 6 животных, два животных из которых реагировали в РИД. Далее нами было проведено генотипирование проб крови, реагирующих в ПЦР. Анализом было определено наличие 6-го генотипа вируса во всех пробах.

По результатам исследований в тест-системах РИД и ПЦР (табл. 6) было обнаружено 270 животных реагирующих в РИД, что составило 71,8%, а генотипы вируса лейкоза крупного рогатого скота были выявлены в 193 пробах крови. Необходимо отметить, что у серопозитивных животных в 76,8% случаях выявлен 6-й генотип ВЛКРС, а в 23,2% случаев выделен 1-й генотип ВЛКРС. Однако следует заметить, что у 77 животных, реагирующих в РИД не выделены генотипы ВЛКРС, что может указывать на присутствие в обследованных стадах неизвестного генотипа вируса лейкоза или быть причиной несовершенности метода ПЦР.



Таблица 6 – Распределение генотипов вируса по группам серонегативных и серопозитивных животных

№ п/п	Сельскохозяйственные предприятия	Исследовано животных	Реагировало в ПЦР	РИД + животные			РИД - животные		
				Всего животных	1-й генотип	6-й генотип	Всего животных	1-й генотип	6-й генотип
1	Учхоз «Тулинское»	107	6	2	-	2	105	-	4
2	ОАО «Морские Нивы»	25	21	21	-	17	4	-	4
3	ОПХ «Боровское»	30	11	8	1	5	22	-	5
4	ОПХ «Кремлевское»	127	60	86	29	24	41	2	5
5	ЗАО «Калиновское»	61	39	40	-	35	21	-	4
6	ЗАО «Кубанское»	20	7	8	-	6	12	-	1
7	ЗАО «Большевикское»	9	8	9	-	8	-	-	-
8	Совхоз «Новоспаский»	50	32	46	3	29	4	-	-
9	ЗАО «Им. Кирова»	12	7	12	-	7	-	-	-
10	ОАО «Вьюнское»	16	14	10	9	-	6	-	5
11	ЗАО «Рошинское»	20	13	14	1	9	6	-	3
12	ЗАО «Благодатное»	30	10	14	2	6	16	-	2
	ИТОГО	507	228	270	45	148	237	2	33

Среди обследованных животных нами было обнаружено 237 серонегативных животных, что составило 46,7% однако и у серонегативных животных провирусная ДНК была выделена в 35 пробках, что указывает на присутствие вируса лейкоза у серонегативных животных. При этом необходимо отметить, что у серонегативных животных в 94,1% случаях встречается 6-й генотип ВЛКРС и только в 5,9% случаях встречается 1-й генотип (рис. 8).

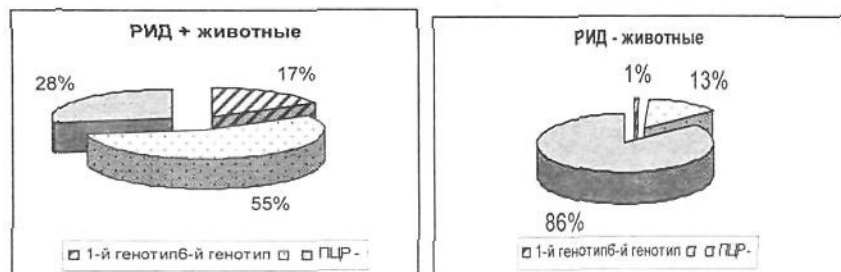


Рисунок 8 - Процентное соотношение генотипов вируса по группам серонегативных и серопозитивных животных

У РИД + животных соотношение 1-го и 6-го генотипов составляет 1:3, в то время как у РИД - животных 1:13 (рис.8). Полученные данные свиде-

тельствуют о том, что преобладающим генотипом вируса лейкоза у серонегативных животных является 6-й, что также подтверждает литературные данные о существовании генотипов вируса способных не выявляться в серологических исследованиях

Изучая генотипы вируса в различных хозяйствах области нам удалось выявить некоторую закономерность. В пробах РИД-отрицательных животных чаще всего выделяется 6-й генотип (табл. 6), что не противоречит предположениям зарубежных авторов утверждающих, что существуют генотипы вируса при инфицировании которыми животные остаются серонегативными в течение всего периода инфицирования, и даже в случае прогрессии заболевания (Asfay Y et al 2004)

Таким образом ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Новосибирской области остается сложной. Появление в оздоровленных хозяйствах серопозитивных животных по нашему мнению связана не только с низкой чувствительностью РИД, но и с разнообразием генотипов вируса лейкоза

## 2.2.6. Характеристика гематологических показателей у животных инфицированных разными генотипами ВЛКРС

При оценке гематологических показателей коров с разной степенью компроментации к лейкозу принадлежащих ОПХ "Боровское" (табл. 7) установлено, что количественные показатели лейкоцитов и лимфоцитов у животных, реагирующих в тест-системе РИД, достоверно выше в 1,4 ( $P < 0,05$ ) и 2,1 ( $P < 0,05$ ) раза соответственно

Таблица 7 - Гематологические показатели коров ОПХ "Боровское" в разрезе использования различных тест-систем

Результаты тест-системы при исследовании животных	Содержание лейкоцитов, ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови животных	Содержание лимфоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови животных
РИД(-)	n=2 2 5,33±0,39	n=2 2 1,9±0,21
РИД(+)	n=8 8 7,5±0,91*	n=8 8 4,05±0,84*

Примечание \* $P < 0,05$

При исследовании количественных показателей лейкоцитов и лимфоцитов у инфицированных коров (табл. 8) установлено, что исследуемые показатели крови были выше у животных, инфицированных вирусом лейкоза 1-го генотипа. При этом достоверные отличия в содержании лимфоцитов и лейкоцитов в 1 л крови животных, инфицированных ВЛКРС разных генотипов, были выявлены у животных ОПХ "Кремлевское" и ОАО "Вьюны". Количество лейкоцитов и лимфоцитов у животных ОПХ "Кремлевское", инфициро-

ванных 1-м генотипом вируса, составляло  $19,31 \pm 2,1 \times 10^9$  и  $14,95 \pm 2,0 \times 10^9$  соответственно, что в 1,4 ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ) раза выше, по сравнению с таковыми животных-носителей 6-го генотипа В ОАО "Вьюны" концентрация лейкоцитов в периферической крови коров с ВЛКРС 1-го генотипа составляло  $15,42 \pm 1,55 \times 10^9$ , лимфоцитов -  $12,14 \pm 1,38 \times 10^9$ , что в 1,9 и 2,5 раза выше, чем у коров, инфицированных ВЛКРС 6-го генотипа По совхозу "Новоспасский" можно говорить лишь о тенденции лейкоцитоза и лимфоцитоза у животных, инфицированных 1-м генотипом вируса

Таблица 8 - Некоторые показатели крови коров, инфицированных ВЛКРС, в связи с генотипом вируса (в разрезе отдельных хозяйств области)

Хозяйства Новосибирской области	1 генотип		6 генотип	
	Лейкоциты, $\times 10^9$	Лимфоциты, $\times 10^9$	Лейкоциты, $\times 10^9$	Лимфоциты, $\times 10^9$
ОПХ "Кремлевское"	n=11 $19,31 \pm 2,1$	n=11 $14,95 \pm 2,0$	n=14 $13,62 \pm 1,3^*$	n=14 $10,4 \pm 1,25^{**}$
ОАО "Вьюны"	n=9 $15,42 \pm 1,55$	n=9 $12,14 \pm 1,38$	n=4 $7,85 \pm 2,12^*$	n=4 $4,82 \pm 1,61^{**}$
ОПХ "Боровское"	-	-	n=9 $6,68 \pm 1,11$	n=9 $3,26 \pm 0,87$
ЗАО "Калиновское"	-	-	n=29 $6,5 \pm 0,56$	n=29 $3,8 \pm 0,56$
С/з "Новоспасский"	n=3 $17,86 \pm 1,92$	n=3 $13,6 \pm 2,3$	n=14 $14,2 \pm 1,59$	n=14 $10,16 \pm 1,6$

Примечание \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$

Таким образом, показатели абсолютного количества лейкоцитов и лимфоцитов выше у животных инфицированных 1-м генотипом вируса лейкоза, чем у животных с 6-м генотипом вируса

### 3. ВЫВОДЫ

1 Для диагностики инфекции ВЛКРС в тест-системе ПЦР и генотипировании вируса лейкоза у крупного рогатого скота могут использоваться разные биологические жидкости – цельная кровь, сыворотка крови, молоко в объемах от 500 мкл до 50 мл

2 ДНК выделенная по предложенной нами модификации, может храниться как минимум 3-5 лет в режиме охлаждения  $-20^0$  С

3 В 9 районах Новосибирской области циркулирует ВЛКРС двух генотипов (по гену env) – первого и шестого, причем как в моно-, так и в ассоциированном вариантах Доминирующим является 6-й генотип вируса (80%)

4 Вирус лейкоза крупного рогатого скота 6-го генотипа имеет 3 варианта полиморфизмов по гену tax в то время как 1-ый генотип вируса только один

5 Развитие инфекционного и эпизоотического процессов лейкоза крупного рогатого скота в связи с популяцией ВЛКРС определенного генотипа, может служить методологической основой дифференцированного подхода в разработке программы оздоровления неблагополучных по лейкозу стад с использованием тест-систем РИД в агаровом геле с gp 51 антигеном ВЛКРС, ИФА и ПЦР

б У серопозитивных животных показатели концентрации лейкоцитов и лимфоцитов выше ( $P < 0,05$ ), чем у серонегативных животных

Абсолютное содержание лейкоцитов и лимфоцитов выше у животных инфицированных 1-м генотипом вируса лейкоза крупного рогатого скота

#### **4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Методические рекомендации "Генотипирование ВЛКРС методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)" рассмотрены и утверждены на научно-методическом Совете ФГОУ ВПО ИВМ НГАУ (протокол № 4 от 10.11.2005г) могут быть использованы в исследовательских и лабораторно-диагностических целях при решении проблемы лейкоза крупного рогатого скота

#### **5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1 Генетическая гетерогенность хозяина и генотипы онковируса при лейкозе крупного рогатого скота /Соавт В А Белявская, И В Савкин и др // Биотехнология и онкология Сборник тезисов российско-американской конференции (Санкт-Петербург, 29-31 мая 2005года) – Санкт-Петербург, 2005 -С 89-90

2 Особенности патогенеза гемобластозов крупного рогатого скота и перспективы научных исследований в области вирусного лейкоза / Соавт П Н Смирнов, В А Белявская // Научные основы профилактики и лечения болезней животных Сборник научных трудов ведущих ученых России, СНГ и др стран – Екатеринбург, 2005 - С 197-204

3 Распространенность и генетическая гетерогенность популяции ВЛКРС в Новосибирской области /Соавт С В Чичинаина, К А Дурыманова и др // Материалы Российской научно-практической конф "Сосновка" (Новосибирск, 25-27 октября 2005) - Новосибирск, 2005 - С 110-112

4 Генотипическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) /Соавт С В Чичинаина / Материалы Сибирского международного ветеринарного конгресса (Новосибирск, 3-4 марта 2005) - Новосибирск, 2005 - С 130-131

5 Анализ полиморфизма гена IL8R в связи с предрасположенностью к лейкозу крупного рогатого скота / Соавт С В Чичинаина / Материалы Сибирского международного ветеринарного конгресса (Новосибирск, 3-4 марта 2005) - Новосибирск, 2005 - С 168-170

6 Возможности определения ДНК-аддуктов в периферической крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для ранней диагностики вирусных лейкозов /Соавт В А Белявская, С Е Олькин и др //Вопросы онкологии 1 (Приложение)-2006 - Т 52 – С 4-5

7 Возможности и ограничения использования полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике вируса лейкоза крупного рогатого скота // Соавт С В Чичинаина, В В Храмцов и др / Вестник РАСХН, Москва, 2006, №6 – С 71-73

8 Генетические исследования взаимообусловленных изменений в системе патоген-хозяин при ретровирусной инфекции (на модели вирусного лейкоза крупного рогатого скота) / Соавт В А Белявская, И В Савкин и др //Материалы 3-ей российской научной конференции с международным участием (Новосибирск 27-29 сентября 2006) – Новосибирск,2006 – С 246-247

9 Гетерогенность популяции ВЛКРС в Новосибирской области / Соавт П Н Смирнов, Е А Дурьманова и др // Вестник РАСХН, Москва, 2007, №1 - С 82-84

Подписано в печать 04 09 2007 г. Формат 60×84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>  
Печ л 1,0 Тираж 100 экз Заказ № 315

---

ООО ИПФ «Агрос»  
630501, Новосибирская область, пос. Краснообск