

## Связь гаплотипов SNP LTR-области *BLV* с гематологическими показателями крови крупного рогатого скота

Н.В. Блажко<sup>1</sup>, С.Х. Вышегуров<sup>1</sup>, А.С. Донченко<sup>1, 2</sup>, К.С. Шатохин<sup>1</sup> ✉, Т.И. Крыцына<sup>1</sup>, В.А. Рябина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

✉ e-mail: true\_genetic@mail.ru

Проведено молекулярно-генетическое типирование образцов вируса лейкоза крупного рогатого скота (*BLV*), выделенного из образцов крови черно-пестрых голштинизированных коров, у которых были исследованы различные цитофлюорометрические и морфологические показатели крови. Оценивали общее содержание лейкоцитов (WBC), содержание лимфоцитов (lymf), гранулоцитов (gran), моноцитов (mon), эритроцитов (RBC), гемоглобина (HGB), гематокрит (HTC), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в одном эритроците (MCH), концентрацию гемоглобина в эритроцитарной массе (MCHC), индекс распределения эритроцитов (RDW), количество тромбоцитов (PLT), средний объем тромбоцитов (MPV), индекс распределения тромбоцитов (PDW) и тромбоцитрит (PCT). Определены гаплотипы SNP LTR-области *BLV*. Из восьми возможных были обнаружены только вирусы гаплотипов I ( $0.33 \pm 0.03$ ) и III ( $0.67 \pm 0.03$ ). Соотношение гематологически больных, здоровых и подозрительных носителей вируса лейкоза крупного рогатого скота I и III гаплотипов было сопоставимо с результатами других исследователей. Количество лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в крови носителей III гаплотипа превышало аналогичные параметры крупного рогатого скота, пораженного вирусом I гаплотипа. Интересно отметить, что разница гематологического статуса животных проявилась не только в концентрации лейкоцитов, непосредственных иммунных агентов, но и в содержании эритроцитов и тромбоцитов, не имеющих к иммунному ответу непосредственного отношения. Количество частиц III гаплотипа *BLV*, циркулирующих в крови зараженных особей, превышала таковое значение носителей I гаплотипа. В связи с этим выдвинуто предположение об эволюционном преимуществе III гаплотипа как более вирулентного. Впрочем, результаты настоящего исследования в совокупности с данными других ученых показывают, что высокая вирулентность отдельных штаммов вируса есть следствие стремления к реализации максимально возможной интенсивности синтеза вирусных частиц, а не достижения высокого поражающего эффекта как такового. Показано, что высокая смертоносность эволюционно невыгодна вирусам, так как вымирание носителя как биологического вида чревато исчезновением и самого вируса.

Ключевые слова: *BLV*; LTR-область; гаплотипы; гематологические показатели крови; лейкоциты; крупный рогатый скот.

**Для цитирования:** Блажко Н.В., Вышегуров С.Х., Донченко А.С., Шатохин К.С., Крыцына Т.И., Рябина В.А. Связь гаплотипов SNP LTR-области *BLV* с гематологическими показателями крови крупного рогатого скота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):262-269. DOI 10.18699/VJ19.491

## Association of haplotypes for SNPs in the LTR regions of bovine leukemia virus with hematological indices of cattle

N.V. Blazhko<sup>1</sup>, S.Kh. Vyshegurov<sup>1</sup>, A.S. Donchenko<sup>1, 2</sup>, K.S. Shatokhin<sup>1</sup> ✉, T.I. Krytsyna<sup>1</sup>, V.A. Ryabinina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Siberian Federal Research Centre for AgroBiotechnology, RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

✉ e-mail: true\_genetic@mail.ru

Molecular typing of *BLV* samples isolated from Holsteinized Russian Black Pied cattle was carried out, and various cytofluorometric and morphological blood indices were examined. We performed the total count of white blood cells (WBC), lymphocyte (lymf), granulocyte (gran), monocyte (mon), red blood cell (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HTC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red blood cell distribution width (RDW), platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW), and platelet crit count (PCT). The LTR-region of *BLV* was haplotyped. Only viruses of haplotypes I ( $0.33 \pm 0.03$ ) and III ( $0.67 \pm 0.03$ ) of the eight possible were detected. The ratio of hematologically sick, healthy, and suspected carriers of *BLV* of haplotypes I and II was comparable with the results of other researchers. The numbers of leukocytes, erythrocytes and platelets in the blood of carriers of haplotype III exceeded the corresponding parameters of cattle affected by the virus of haplotype I. It is interesting to note that the difference in the hemolytic status of animals was manifested not only by the concentration of leukocytes as direct immune agents

but also by the count of erythrocytes and platelets, which are not directly involved in the immune response. The number of particles of haplotype III of the *BLV* circulating in the blood of infected individuals exceeded that of the carriers of haplotype I. In this connection, an assumption was made about the evolutionary advantage of the more virulent haplotype III. However, the results of our own research in conjunction with the data of other scientists indicate that the high virulence of individual virus strains is a consequence of the tendency to implement the maximum possible intensity of the synthesis of virus particles but not of the high damaging effect alone. It is shown that high lethality is evolutionarily disadvantageous for viruses, since the extinction of the carrier as a biological species is fraught with the disappearance of the virus itself.

Key words: *BLV*; LTR-region; haplotypes; hematological indices; leukocytes; cattle.

**For citation:** Blazhko N.V., Vyshegurov S.Kh., Donchenko A.S., Shatokhin K.S., Krytsyna T.I., Ryabinina V.A. Association of haplotypes for SNPs in the LTR regions of bovine leukemia virus with hematological indices of cattle. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(3):262-269. DOI 10.18699/VJ19.491 (in Russian)

## Введение

Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота способствует активной разработке профилактических стратегий, направленных на предотвращение распространения заболевания. Сущность их сводится к изоляции больных животных от здоровых или же к убою зараженных особей (Knapen et al., 1993; Nuotio et al., 2003; Acaite et al., 2007). Последний метод оказался весьма эффективным в странах Западной Европы, Новой Зеландии и Австралии, где наблюдается полное или практически полное очищение стад от возбудителя – вируса лейкоза крупного рогатого скота (*BLV*) (Polat et al., 2017).

Несмотря на предпринимаемые меры, лейкоз крупного рогатого скота на сегодняшний день является наиболее распространенным эпизоотическим заболеванием в России и некоторых зарубежных странах (Juliarena et al., 2017). В 2017 г. он был выявлен в 28 субъектах Российской Федерации (175 неблагополучных пунктов). Наибольшее количество очагов лейкоза крупного рогатого скота выявлено в Калужской области – 45, Республике Крым – 32, Новосибирской области – 27, Московской области – 20 (Новикова и др., 2018). По некоторым данным (Козырева, Гулюкин, 2017), в 2015 г. лейкоз был причиной около 65–66 % случаев инфекционной патологии.

Одна из вероятных причин низкой эффективности борьбы с лейкозом крупного рогатого скота – высокая доля (от 70 до 90 %) животных с бессимптомной стадией (Эрнст и др., 1997; Смирнов Ю.П. и др., 2015; Gyles, 2016; Juliarena et al., 2017), характеризующейся, помимо прочего, нормальным не патологическим числом лейкоцитов, в частности лимфоцитов. Клиническая стадия, как правило, характерна для 4–5-летних животных, когда (в подавляющем большинстве случаев) близится к завершению период хозяйственного использования молочных коров (Смирнов П.Н. и др., 2015). Иногда латентный период может затягиваться и до 8-летнего возраста животных (Kettmann et al., 1994). В некоторых случаях фиксировался убой зараженных *BLV* животных, выбракованных по другим, не связанным с клиническими проявлениями лейкоза, причинам (Мищенко и др., 2018).

Эффективные методы идентификации *BLV*-носителей – ПЦР-диагностика (Смирнов П.Н. и др., 2015) и иммуноферментный анализ (Сюрин и др., 2001), однако их дороговизна существенно препятствует широкому практическому использованию.

Другая причина, осложняющая борьбу с *BLV*, – прищип вирусам высокий уровень мутационной изменчи-

вости (Lewin, 2008). В частности, выдвигалась гипотеза о накоплении *BLV* мутаций, позволяющих вирусу избежать иммунного ответа хозяина (Blood et al., 1979; Сюрин и др., 2001; Buehring et al., 2003; Смирнов, 2007; Смирнов и др., 2011; Батенёва, 2015). Непосредственно для самого вируса подобные мутации, вне сомнения, являются выгодными и потому с высокой вероятностью должны поддерживаться естественным отбором.

LTR-область *BLV* содержит в себе так называемые гены домашнего хозяйства, среди которых присутствуют регуляторы активности транскрипции и трансляции мРНК, коллинеарных нуклеотидной последовательности вируса. Проведенные исследования показывают, что, по крайней мере, некоторые из эволюционных фенотипических «приобретений» обязаны мутациям не в белок-кодирующих генах, а именно в генах домашнего хозяйства, благодаря которым происходит ускорение мутагенеза (Barrick et al., 2009). Мутации нуклеотидной последовательности LTR-области действительно могут активизировать мутагенез *BLV* (Merezak et al., 2001). Изучение LTR-области других вирусов дало схожие результаты (Moelling, 2016). Логично предполагать, что именно мутации в LTR-области *BLV* могли способствовать эволюционной пластичности вируса и спровоцировать его способность избегать иммунного ответа «хозяина». Вероятно, что максимальным преимуществом будут обладать более вирулентные штаммы вируса, активно транслирующие мРНК, тем самым причиняя наибольший ущерб крупному рогатому скоту как носителю. Цель наших исследований – оценка гипотезы об эволюционном преимуществе мутантных штаммов *BLV* за счет повышения вирулентности.

## Материалы и методы

В работе использовали образцы тотальной ДНК, выделенной из цельной крови 780 коров черно-пестрой голштинизированной породы. Пробы крови были отобраны в 2015–2016 гг. из хвостовой вены стерильными катетерами с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта. ДНК выделяли с помощью набора «ДНК-Сорб-В» (ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии, Россия).

Цитофлюорометрические и морфологические показатели крови определяли при помощи автоматического ветеринарного гематологического анализатора PCE-90 Vet.

Праймеры были сконструированы при помощи автоматического синтезатора олигонуклеотидов с учетом мутационного статуса изолятов. Нуклеотиды для их синтеза были приобретены в компании «Сибэнзим». Температура

**Таблица 1.** Характеристика олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих LTR область BLV, 443 п. н.

| Критерий                            | Прямой праймер       | Обратный праймер     |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Последовательность олигонуклеотидов | CCCCATRCGACCGGTTACAC | AGAGRRCTCRGGACCGAGAG |
| Сайт начала фланкирования           | 8021                 | 8444                 |
| Сайт окончания фланкирования        | 8040                 | 8463                 |
| Температура отжига, °C              | 60.18                | 60.11                |
| Доля гуанина (G) и цитозина (C), %  | 60.00                | 60.00                |

**Таблица 2.** Режим амплификации, LTR 443 п. н.

| Кол-во циклов | Температура, °C | Время, мин |
|---------------|-----------------|------------|
| 1             | 95              | 3.0        |
|               | 95              | 0.5        |
| 35            | 61              | 0.5        |
|               | 72              | 0.5        |
| 1             | 72              | 3.0        |

**Таблица 3.** Состав ПЦР смеси (из расчета на одну реакцию)

| Компоненты смеси        | Необходимый объем, мкл |
|-------------------------|------------------------|
| ПЦР буфер               | 2.5                    |
| MgCl <sub>2</sub>       | 1.0                    |
| dNTP                    | 1.0                    |
| Прямой праймер, 50 нг   | 1.0                    |
| Обратный праймер, 50 нг | 1.0                    |
| Taq-полимераза          | 1.5                    |
| Вода                    | 15.0                   |
| ДНК, 50 нг              | 2                      |

отжига праймеров рассчитана с учетом процентного состава нуклеотидов (табл. 1). Чистота праймеров (не менее 95 %) контролировалась методом высокоточной жидкостной хроматографии. Праймеры хранили при -20 °C не более 6 мес. Режим амплификации был задан исходя из рассчитанной температуры отжига (табл. 2).

Для приготовления ПЦР-смеси предварительно производили расчет необходимого количества компонентов реакции на нужное количество проб. Для этого сначала определяли общее количество реакций по следующей формуле:  $n + 3 + 1$ , где  $n$  – количество проб ДНК, для которых необходимо произвести диагностику вирусоносительства, 3 – количество используемых контролей в реакции (БК – внутренний контроль постановки ПЦР, ОК – отрицательный контроль реакции, ПК – положительный контроль реакции), 1 – расчет ПЦР-смеси на дополнительную расчетную пробу.

Расчет объема каждого компонента смеси производили в соответствии с табл. 3.

В контрольные пробирки вносили следующие реагенты: положительный контроль (ПК), внутренний контроль (БК) и отрицательный контроль (ОК). В качестве ПК использовали стандартный контроль ПЦР BLV FLK, в качестве БК – пару видоспецифических праймеров к ДНК коровы, в качестве ОК – ДНК-буфер.

Поверх смеси наслаивали 20 мкл минерального масла (в случае использования амплификаторов с непогреваемой крышкой). Результаты амплификации визуализировали – наносили продукты амплификации в лунки агарозного геля и проводили электрофорез, после чего просматривали на трансиллюминаторе.

Для очистки продуктов амплификации от неспецифических фрагментов светящиеся полоски вырезали из геля на трансиллюминаторе, затем выделяли ампликоны методом спин-колонок.

Составлены рестрикционные карты предположительных сайтов рестрикции LTR-области. Сайты рестрикции были следующими: *BstMAI* I (237 п. н.), *BseI* (378, 370 п. н.), *BspACI* I (262 п. н.). Для анализа возможных комбинаций

**Таблица 4.** Схема образования гаплотипов

| Гаплотип | Фрагменты продуктов рестрикции                   |                              |                               |
|----------|--|------------------------------|-------------------------------|
|          | <i>BstMAI</i> I – GTCTCN↑CAGAG(N) <sub>5</sub> ↓ | <i>BseI</i> – ACTGGN↑TGAC↓CN | <i>BspACI</i> I – C↑CGC GGC↓G |
| I        | 237 (A)  | 378 (GC)                     | 262 (CG)                      |
| II       | 237 (A)  | 378 (GC)                     | 262 (AG)                      |
| III      | 237 (A)  | 370 (CN)                     | 262 (CG)                      |
| IV       | 237 (A)  | 370 (CN)                     | 262 (AG)                      |
| V        | – (N)  | 378 (GC)                     | 262 (CG)                      |
| VI       | – (N)  | 378 (GC)                     | 262 (AG)                      |
| VII      | – (N)  | 370 (CN)                     | 262 (CG)                      |
| VIII     | – (N)  | 370 (CN)                     | 262 (AG)                      |

замен на выбранной последовательности участка генома *BLV* был разработан способ типирования. Замены на сайтах генома 8034 и 8139 п. н. анализировали методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. По результатам ПЦР было выявлено два вирусных гаплотипа: I и III (табл. 4).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась общепринятыми методами (Лакин, 1973; Животовский, 1991) при помощи пакета программ STATISTICA 10.

### Результаты

Из возможных восьми гаплотипов вируса *BLV* инфицированные животные изученной популяции ( $n = 780$ ) были представлены носителями I ( $0.33 \pm 0.03$ ) и III ( $0.67 \pm 0.03$ ) гаплотипов. При анализе показателей крови животных, инфицированных лейкозом разных гаплотипов, обнаружилось, что животные-носители III гаплотипа отличались более высоким ( $p < 0.001$ ) абсолютным содержанием всех типов лейкоцитов, однако процентное соотношение моноцитов у животных сравниваемых выборок не имело достоверных различий (табл. 5). Оценивали гематологические показатели крови: общее содержание лейкоцитов (WBC), содержание лимфоцитов (lymf), гранулоцитов (gran), моноцитов (mon), эритроцитов (RBC), гемоглобина (HGB), гематокрит (HTC), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в одном эритроците (MCH), концентрацию гемоглобина в эритроцитарной массе (MCHC), индекс распределения эритроцитов

(RDW), количество тромбоцитов (PLT), средний объем тромбоцитов (MPV), индекс распределения тромбоцитов (PDW) и тромбокрит (PCT) (см. табл. 5).

Примечательно, что разница была замечена не только в концентрации лейкоцитов, иммунных клеток крупного рогатого скота, но также в количестве эритроцитов и тромбоцитов, не имеющих к иммунитету животных непосредственного отношения (см. табл. 5).

Факты указывают на то, что распознавание конкретного штамма вируса лейкоза иммунной системой крупного рогатого скота начинается еще до перехода болезни в клиническую стадию. Уровень лейкоцитов в крови животных, пораженных вирусом III гаплотипа, был выше ( $p < 0.001$ ) вне зависимости от того, отмечались ли у животных клинические симптомы лейкоза, была ли зафиксирована латентная стадия или же животное относилось к группе подозрительных, с указанием на лейкоз (табл. 6). У животных с повышенным содержанием лейкоцитов в крови, которых относят к группе подозрительных на лейкоз, уровень лейкоцитов у носителей разных гаплотипов *BLV* различался достоверно, однако за счет четкого ограничения уровня показателя в данной группе разница между группами составляла более  $2 \times 10^9/\text{л}$  (см. табл. 6).

Разница содержания лейкоцитов в крови больных и подозрительных животных в среднем превышала таковую между подозрительными и здоровыми особями (см. табл. 6). Особенно наглядно это отражается при визуализации сравнения, где кластер больных особей располагался обособленно, а выборки подозрительных и

**Таблица 5.** Цитометрические и морфологические показатели крови животных-носителей разных гаплотипов *BLV*

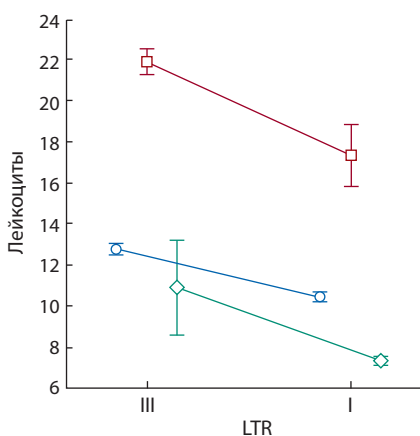
| Показатель              | Гаплотип I |               |              |       | Гаплотип III |               |              |       | $t_{\phi}$  |
|-------------------------|------------|---------------|--------------|-------|--------------|---------------|--------------|-------|-------------|
|                         | $\bar{X}$  | $S_{\bar{X}}$ | $D[\bar{X}]$ | 95 %  | $\bar{X}$    | $S_{\bar{X}}$ | $D[\bar{X}]$ | 95 %  |             |
| WBC, $10^9/\text{л}$    | 8.87       | 0.10          | 5.47         | 0.26  | 14.12        | 0.27          | 18.65        | 0.54  | $p < 0.001$ |
| lymf, $10^9/\text{л}$   | 5.98       | 0.07          | 2.25         | 0.17  | 9.85         | 0.21          | 11.50        | 0.42  | $p < 0.001$ |
| mon, $10^9/\text{л}$    | 0.73       | 0.01          | 0.06         | 0.03  | 1.15         | 0.03          | 0.17         | 0.05  | $p < 0.001$ |
| gran, $10^9/\text{л}$   | 4.16       | 0.06          | 1.71         | 0.15  | 5.89         | 0.10          | 2.66         | 0.20  | $p < 0.001$ |
| lymf, %                 | 54.33      | 0.42          | 93.28        | 1.09  | 67.72        | 0.76          | 147.13       | 1.50  | $p < 0.001$ |
| mon, %                  | 8.43       | 0.08          | 3.55         | 0.21  | 8.55         | 0.19          | 9.11         | 0.37  | нд          |
| gran, %                 | 43.24      | 0.42          | 92.25        | 1.09  | 33.56        | 0.73          | 132.16       | 1.43  | $p < 0.001$ |
| RBC, $10^{12}/\text{л}$ | 5.10       | 0.04          | 0.78         | 0.10  | 5.39         | 0.07          | 1.15         | 0.13  | $p < 0.001$ |
| HGB, г/л                | 90.23      | 0.75          | 293.64       | 1.93  | 93.20        | 1.21          | 365.85       | 2.38  | $p < 0.05$  |
| HTC, %                  | 26.50      | 0.20          | 20.67        | 0.51  | 27.55        | 0.32          | 25.45        | 0.63  | $p < 0.01$  |
| MCV, фл                 | 52.26      | 0.18          | 17.49        | 0.47  | 51.65        | 0.35          | 30.85        | 0.69  | нд          |
| MCH, пкг                | 17.78      | 0.13          | 9.50         | 0.35  | 17.57        | 0.23          | 13.75        | 0.46  | нд          |
| MCHC, г/л               | 341.58     | 2.30          | 2772.97      | 5.94  | 337.98       | 3.92          | 3875.45      | 7.72  | нд          |
| RDW, %                  | 15.43      | 0.05          | 1.29         | 0.13  | 15.93        | 0.07          | 1.24         | 0.14  | $p < 0.001$ |
| PLT, $10^9/\text{л}$    | 236.78     | 4.52          | 10725.82     | 11.69 | 214.60       | 5.22          | 6854.52      | 10.27 | $p < 0.001$ |
| MPV, фл                 | 6.93       | 0.03          | 0.47         | 0.08  | 6.78         | 0.04          | 0.44         | 0.08  | нд          |
| PDW                     | 16.99      | 0.02          | 0.30         | 0.06  | 16.85        | 0.03          | 0.28         | 0.07  | нд          |
| PCT, %                  | 1.26       | 0.64          | 211.71       | 1.64  | 0.13         | 0.00          | 0.00         | 0.01  | нд          |

Примечание.  $t_{\phi}$  – степень достоверности различий, определенная при помощи критерия Стьюдента; нд – различия недостоверны.

**Таблица 6.** Декомпозиция гипотезы влияния гаплотипа *LTR* на тип течения инфекции

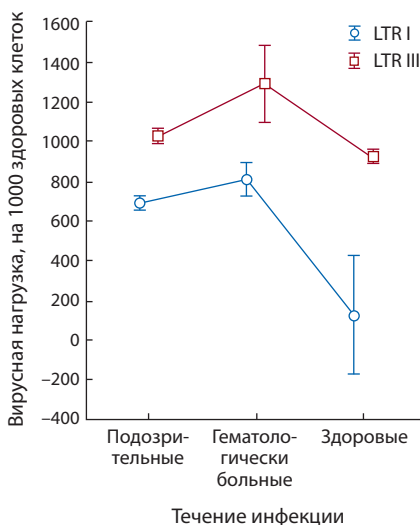
| Гаплотип | ГС | Содержание лейкоцитов, 10 <sup>9</sup> /л |               |          |          | Содержание лимфоцитов, 10 <sup>9</sup> /л |               |          |          | n   |
|----------|----|---|---------------|----------|----------|---|---------------|----------|----------|-----|
|          |    | $\bar{X}$                                 | $S_{\bar{X}}$ | -99.90 % | +99.90 % | $\bar{X}$                                 | $S_{\bar{X}}$ | -99.90 % | +99.90 % |     |
| III      | П  | 12.762                                    | 0.128         | 12.333   | 13.190   | 5.788                                     | 0.107         | 5.431    | 6.145    | 240 |
| III      | Г  | 21.889                                    | 0.938         | 18.536   | 25.243   | 12.982                                    | 0.697         | 10.490   | 15.473   | 7   |
| III      | З  | 10.900                                    | 0.125         | 10.711   | 11.240   | 3.700                                     | 0.105         | 3.500    | 4.000    | 281 |
| I        | П  | 10.423                                    | 0.104         | 10.077   | 10.769   | 4.682                                     | 0.086         | 4.396    | 4.969    | 211 |
| I        | Г  | 17.314                                    | 0.040         | 17.074   | 17.555   | 10.014                                    | 0.571         | 6.612    | 13.416   | 38  |
| I        | З  | 7.339                                     | 0.082         | 7.066    | 7.612    | 3.222                                     | 0.052         | 3.049    | 3.396    | 3   |

Примечание. ГС – гематологический статус; З – здоровые животные; Г – гематологически больные; П – подозрительные;  $\lambda = 0.982$  при  $p < 0.001$ ,  $F(4.1546) = 3.3451$ .



**Рис. 1.** Влияние гаплотипа на содержание лейкоцитов в крови у здоровых, подозрительных и гематологически больных лейкозом животных ( $\lambda = 0.982$ ;  $F(4.154) = 3.345$ ;  $p = 0.0098$ ).

Количество лейкоцитов обозначено красной линией – у животных с клиническими симптомами лейкоза, синей – у особей с подозрением на лейкоз, зеленой – у здоровых животных.



**Рис. 2.** Вирусная нагрузка у животных с разными гаплотипами *BLV*.

здоровых животных практически сливаются вне зависимости от того, каким гаплотипом *BLV* был поражен изучаемый крупный рогатый скот (рис. 1). Различия содержания лейкоцитов между животными разного гематолитического статуса, за исключением разницы здоровые – подозрительные III гаплотипа, оказались достоверными ( $p < 0.001$ ). Доля гематолитически больных животных составляла 15.08 % у крупного рогатого скота, пораженного вирусом I гаплотипа вируса, и 1.33 % – у носителей III гаплотипа.

Схожая картина наблюдалась и по отношению содержания лимфоцитов в крови животных. Гаплотип, безусловно, оказывает влияние на изменение уровня лимфоцитов в крови животных, хотя группы и имели низкий уровень дискриминации (см. табл. 6).

Уровень вирусной нагрузки находился в прямой зависимости от статуса животных. Наибольшее количество вирусных частиц обнаружено в крови гематолитически больных животных, наименьшее – у животных без проявления клинических признаков инфекции. Интересно отметить, что в целом вирусная нагрузка оказалась выше у крупного рогатого скота, инфицированного вирусом III гаплотипа (рис. 2).

Для всесторонней оценки гипотезы влияния категориальных признаков на непрерывные переменные применяли многомерные критерии (табл. 7). Значения критериев Уилкса (Wilks' Lambda, WL), Пилая (Pillai's Trace, PT), Хотелла (Hotelling's Trace, HT) и Роя (Roy's Largest Root, RLR) указывают на значительную связь LTR-гаплотипов вируса *BLV* с типом течения инфекции, выражающемся, в том числе, и в количестве лейкоцитов.

### Обсуждение

Большее количество различных типов лейкоцитов, обнаруженных у животных, зараженных *BLV* III гаплотипа, по сравнению с носителями I гаплотипа (см. табл. 5), свидетельствует о более сильном иммунном ответе организма крупного рогатого скота именно на эту разновидность вируса. Соответственно, есть основания утверждать, что вирус III гаплотипа более вирулентен, что также подтверждается большим количеством вирусных частиц по сравнению с вирусом I гаплотипа (см. рис. 2). Этот же гаплотип является более распространенным, что указывает на эволюционное преимущество более вирулентных штаммов над менее вирулентными. Схожие результаты были неоднократно получены в опытах с РНК-вирусами мышей, крыс и кроликов (Furió et al., 2012; Elsworth et al., 2014; Korboukh et al., 2014; Fitzsimmons et al., 2018). Причем в некоторых случаях имело место повышение эволюционной пластичности вирусов, например *H273R*, за счет изменения нуклеотидной последовательности генов-мутаторов, ускоряющих мутагенез (Korboukh et al., 2014).

Предположение об эволюционном преимуществе более вирулентных штаммов вируса *BLV* выглядит довольно убедительным. Главная задача вирусов, в том числе и *BLV*, – не уничтожение клеток организма хозяина, а продуцирование максимально возможного количества собственных частиц, что вполне логично (Агол, 2015). Доказано, что эволюционное преимущество любых му-

**Таблица 7.** Проверка нулевой гипотезы об отсутствии влияния гаплотипов на тип течения инфекции

| Показатель                    | Критерий | Значение | F        | dfEffect | dfError | p        |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|---------|----------|
| Свободный член                | WL       | 0.197743 | 1568.054 | 2        | 773     | 0.000000 |
|                               | PT       | 0.802257 | 1568.054 | 2        | 773     | 0.000000 |
|                               | HT       | 4.057061 | 1568.054 | 2        | 773     | 0.000000 |
|                               | RLR      | 4.057061 | 1568.054 | 2        | 773     | 0.000000 |
| LTR                           | WL       | 0.935624 | 26.593   | 2        | 773     | 0.000000 |
|                               | PT       | 0.064376 | 26.593   | 2        | 773     | 0.000000 |
|                               | HT       | 0.068805 | 26.593   | 2        | 773     | 0.000000 |
|                               | RLR      | 0.068805 | 26.593   | 2        | 773     | 0.000000 |
| Гематологический статус       | WL       | 0.619193 | 104.675  | 4        | 1546    | 0.000000 |
|                               | PT       | 0.380882 | 91.038   | 4        | 1548    | 0.000000 |
|                               | HT       | 0.614883 | 118.672  | 4        | 1544    | 0.000000 |
|                               | RLR      | 0.614686 | 237.884  | 2        | 774     | 0.000000 |
| LTR + гематологический статус | WL       | 0.982912 | 3.345    | 4        | 1546    | 0.009764 |
|                               | PT       | 0.017150 | 3.347    | 4        | 1548    | 0.009730 |
|                               | HT       | 0.017322 | 3.343    | 4        | 1544    | 0.009799 |
|                               | RLR      | 0.012124 | 4.692    | 2        | 774     | 0.009430 |

Примечание. dfEffect – степень свободы критерия; dfError – степень свободы остаточной ошибки.

таций определяется, в первую очередь, не качественными изменениями как таковыми, а выживаемостью наиболее возможного количества потомков-носителей мутации, причем правило распространяется не только на вирусы, но и на представителей всех царств живых организмов (Марков, Наймарк, 2015). А одним из собственно вредоносных качеств вирусов является не их вирулентность как таковая, а спровоцированные большим количеством чужеродных клетке хозяина вирусных частиц ответные меры: деградация РНК (вирусных, а также клеточных), угнетение синтеза белков (как вирусных, так и клеточных), самоликвидация (апоптоз и другие виды программируемой гибели) и, наконец, воспаление (Debasq et al., 2004; Lezin et al., 2009; Агол, 2015). В отношении вируса лейкоза крупного рогатого скота, который не изменяет присущий хозяину комплекс синтезируемых им белков, не привнося ничего «своего» (Kettmann et al., 1980), подобная теория выглядит вполне правдоподобной. Так как вирус *BLV* не представляет собой носителя программы кодирования посторонних белков, его вредоносность может повыситься только за счет ускорения синтеза его собственных копий, что и провоцирует саморазрушительный ответ иммунной системы крупного рогатого скота.

На то, что повышенная вирулентность *BLV* III гаплотипа есть следствие ускорения его репликации, а не наоборот, указывают некоторые факты. Вирус не только не программирует клетку носителя на синтез посторонних, тем более вредоносных белков, но и несет в себе генетические элементы, активирующие иммунитет скота (Lagarias, Radke, 1989; Juliarena et al., 2017). Такое, на первый взгляд «самоубийственное», эволюционное приобретение, казалось бы, должно было привести к вымиранию *BLV* как такового. В реальности же это спровоцировало создание

некоего комплекса сосуществования – крупный рогатый скот – *BLV*, где последний – носитель генетической системы, направленной на нейтрализацию неизбежного вредоносного присутствия вируса в организме носителя. Как следствие, 70–90 % особей крупного рогатого скота не проявляют клинических признаков лейкоза, что в целом и было показано в настоящем исследовании (см. табл. 6).

Таким образом, генетическая программа *BLV* предусматривает не только сам факт интенсификации синтеза собственных частиц, но и в некоторой степени нейтрализацию негативных последствий для крупного рогатого скота. И эволюционная стратегия прослеживается довольно четко: вирусу не выгодно вымирание крупного рогатого скота как биологического вида, так как это может повлечь за собой и его собственное исчезновение.

### Закключение

Результаты исследования соответствуют представленной концепции. Мутации в генах домашнего хозяйства LTR-области *BLV* изначально спровоцировали ускорение синтеза вирусных частиц. Это, в свою очередь, интенсифицировало иммунный ответ крупного рогатого скота, что и показали результаты исследований (см. табл. 5, рис. 1). Таким образом, эволюционное преимущество III гаплотипа вируса *BLV* над I гаплотипом выражено в ускоренном воспроизводстве его копий, это в конечном счете отражено в более высокой распространенности III гаплотипа ( $0.67 \pm 0.03$ ) по сравнению с I гаплотипом ( $0.33 \pm 0.03$ ).

### Список литературы / References

- Агол В.И. Природа патогенности вирусов. Природа. 2015;5:3-10.  
[Agol V.I. Nature of virus pathogenicity. Priroda = Nature. 2015;5:3-10. (in Russian)]

- Батенёва Н.В. Особенности течения лейкозной инфекции у носителей 4-го и 7-го генотипов *BLV*. Инновации и продовольственная безопасность. 2015;4(10):5-8.  
[Bateneva N.V. Features of the leukemic process in carriers of *BLV* genotypes 4 and 7. Innovatsii i Prodovolstvennaya Besopasnoct = Innovations and Food Safety. 2015;4(10):5-8. (in Russian)]
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991.  
[Zhivotovskiy L.A. Populational Biometry. Moscow: Nauka Publ., 1991. (in Russian)]
- Козырева Н.Г., Гулюкин М.И. Распространение лейкоза крупного рогатого скота и генетические варианты возбудителя на территории животноводческих хозяйств Центрального федерального округа Российской Федерации. Ветеринария Кубани. 2017;6:4-9.  
[Kozyreva N.G., Gulyukin M.I. The prevalence of cattle leukemia and genetic variants of its causative agent in livestock farms of the Central Federal District of the Russian Federation. Veterinariya Kubani = Veterinary of Kuban. 2017;6:4-9. (in Russian)]
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1973.  
[Lakin G.F. Biometrics. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1973. (in Russian)]
- Марков А., Наймарк Е. Эволюция. Классические идеи в свете новых открытий. М.: Изд-во АСТ: CORPUS, 2015.  
[Markov A., Naimark E. Evolution. Classical Ideas in the Light of New Discoveries. Moscow: AST: CORPUS Publ., 2015. (in Russian)]
- Мищенко В.А., Петрова О.Н., Караулов А.К., Мищенко А.В. Проблемы лейкоза крупного рогатого скота. Владимир, 2018.  
[Mischenko V.A., Petrova O.N., Karaulov A.K., Mischenko A.V. Problems of Bovine Leukemia. Vladimir, 2018. (in Russian)]
- Новикова М.В., Боровой В.Н., Барсуков Ю.И., Коломьцев С.А. Эпизоотическая ситуация по социально значимым и особо опасным болезням животных в Российской Федерации за 2017 год. Бизнес Партнёр (Сельское хозяйство России). Ежегодный справочник для руководителей и специалистов АПК, 2018.  
[Novikova M.V., Borovoy V.N., Barsukov Yu.I., Kolomytsev S.A. Epizootic situation with socially significant and highly infectious diseases of animals in the Russian Federation in 2017. Business Partner (Agriculture). Annual Handbook for Managers and Professionals in AIC, 2018. Available at: mvet/epizooticheskaya-situatsiya-posotsialno-znachimym-i-osobo-opasnym-boleznyam-zhivotnykh. (in Russian)]
- Смирнов П.Н. Болезнь века – лейкоз крупного рогатого скота. Новосибирск, 2007.  
[Smirnov P.N. The Disease of the Century: Bovine Leukemia. Novosibirsk, 2007. (in Russian)]
- Смирнов П.Н., Батенёва Н.В., Белявская В.А. Генотипическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Новосибирской области и Краснодарского края. Вестник НГАУ. 2011;2(18):81-83.  
[Smirnov P.N., Bateneva N.V., Belyavskaya V.A. Genotypic diversity of bovine leukemia virus in the Novosibirsk and Krasnodar regions. Vestnik Novosibirskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University. 2011;2(18):81-83. (in Russian)]
- Смирнов П.Н., Батенёва Н.В., Князев С.П., Хрипко Ю.И., Скачков А.С. Метод изучения нуклеотидных последовательностей *BLV*. Международный научно-исследовательский журнал. 2015;7(38):95-98.  
[Smirnov P.N., Bateneva N.V., Knyazev S.P., Khripko Yu.I., Skachkov A.S. Method for the study of nucleotide sequences *BLV*. Mezhdunarodnyy Nauchno-Issledovatel'skiy Zhurnal = International Research Journal. 2015;7(38):95-98. (in Russian)]
- Смирнов Ю.П., Суворова И.Л., Грязева Н.А. Динамика эпизоотического процесса лейкоза крупного рогатого скота в Кировской области и эффективность противолейкозных мероприятий. Аграрная наука Северо-Востока. 2015;1(44):60-65.  
[Smirnov Yu.P., Suvorova I.L., Gryazeva N.A. Dynamics of the epizootic process of bovine leukemia in the Kirov region and the effectiveness of anti-leukemia measures. Agrarnaya Nauka Evro-Severo-
- Vostoka = Agricultural Science of the Euro-North-East. 2015;1(44):60-65. (in Russian)]
- Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьёв Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП, 2001.  
[Syurin V.N., Samuylenko A.Ya., Solov'ev B.V., Fomina N.V. Viral Diseases of Animals. Moscow, All-Russia Research and Technology Institute of Bioindustry, 2001. (in Russian)]
- Эрнст Л.К., Сулимова Г.Е., Орлова А.Р. Особенности распространения антигенов *BoLA-A* и аллелей гена *BoLA-DRB3* у чернопестрого скота в связи с ассоциацией с лейкозом. Генетика. 1997;33(1):87-95.  
[Ernst L.K., Sulimova G.E., Orlova A.R. Peculiarities of distribution of *BoLA-A* antigens and alleles of *BoLA-DRB3* gene in black and white cattle due to association with leukemia. Russ. J. Genet. 1997;33(1):73-80.]
- Acaite J., Tamosiunas V., Lukauskas K., Milius J., Pieskus J. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. Prev. Vet. Med. 2007;82(1-2):83-89. DOI 10.1016/j.prevetmed.2007.05.01.
- Barrick J.E., Yu D.S., Yoon S.H., Jeong H., Oh T.K., Schneider D., Lenski R.E., Kim J.F. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. Nature. 2009;461(7268):1243-1247. DOI 10.1038/nature08480.
- Blood D.C., Henderson J.A., Radostits O.M. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, and horses. London: Balliere Tindall, 1979.
- Buehring G.C., Philpott S.M., Choi K.Y. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2003;19(12):1105-1113. DOI 10.1089/088922203771881202.
- Debaq C., Sanchez Alcaraz M.T., Mortreux F., Kerkhofs P., Kettmann R., Willems L. Reduced proviral loads during primoinfection of sheep by Bovine Leukemia virus attenuated mutants. Retrovirology. 2004;1(31). DOI 10.1186/1742-4690-1-31.
- Elsworth P., Cooke B.D., Kovaliski J., Sinclair R., Holmes E.C., Strive T. Increased virulence of rabbit haemorrhagic disease virus associated with genetic resistance in wild Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Virology. 2014;464-465:415-423. DOI 10.1016/j.virol.2014.06.037.
- Fitzsimmons W.J., Woods R.J., McCrone J.T., Woodman A., Arnold J.J., Yennawar M., Evans R., Cameron C.E., Luring A.S. A speed-fidelity trade-off determines the mutation rate and virulence of an RNA virus. PLoS Biol. 2018;16(6):e2006459. DOI 10.1371/journal.pbio.2006459.
- Furió V., Garijo R., Durán M., Moya A., Bell J.C., Sanjuána R. Relationship between within-host fitness and virulence in the vesicular stomatitis virus: correlation with partial decoupling. J. Virol. 2012;86(22):12228-12236. DOI 10.1128/JVI.00755-12.
- Gyles C. Should we be more concerned about bovine leukemia virus? Can Vet. J. 2016;57(2):115-116.
- Juliarena M.A., Barrios C.N., Lützelshwab C.M., Esteban E.N., Gutiérrez S.E. Bovine leukemia virus: current perspectives. Vir. Adapt. Treat. 2017;(9):13-26. DOI 10.2147/VAAT.S113947.
- Kettmann R., Burny A., Callebaut I., Drogmans L., Mammerickx M., Willems L., Portetelle D. Bovine leukemia virus. Ed. J.A. Levy. The Retroviridae. New York: Plenum Press, 1994;39-82.
- Kettmann R., Marbaix G., Cleuter Y., Portetelle D., Mammerickx M., Burny A. Genomic integration of bovine leukemia provirus and lack of viral RNA expression in the target cells of cattle with different responses to *BLV* infection. Leuk. Res. 1980;4(6):509-519.
- Knapen K., Kerkhofs P., Mammerickx M. Eradication of enzootic bovine leukosis in Belgium: results of the mass detection on the national cattle population in 1989, 1990 and 1991. Ann. Med. Vet. 1993;137:197-201.
- Korboukh V.K., Lee C.A., Acevedo A., Vignuzzi M., Xiao Y., Arnold J.J., Hemperly S., Graci J.D., August A., Andino R., Cameron C.E. RNA Virus population diversity, an optimum for maximal fitness and virulence. J. Biol. Chem. 2014;289(43):29531-29544. DOI 10.1074/jbc.M114.592303.

- Lagarias M., Radke K. Transcriptional activation of bovine leukemia virus in blood cells from experimentally infected, asymptomatic sheep with latent infections. *J. Virol.* 1989;63:2099-2107.
- Lewin B. *Genes IX*. Oxford: Jones and Bartlett Publ., 2008.
- Lezin A., Olindo S., Belrose G., Signate A., Cesaire R., Smadja D., Macallan D., Asquith B., Bangham C., Bouzar A., Gillet N., De-foiche J., Florins A., Verlaeten O., Burny A., Willems L. Gene activation therapy: from the *BLV* model to HAM/TSP patients. *Front. Biosci.* 2009; 1:205-215.
- Merezak C., Pierreux C., Adam E., Lemaigre F., Rousseau G.G., Ca-lomnie C., Van Lint C., Christophe D., Kerkhofs P., Burny A., Kett-mann R., Willems L. Suboptimal enhancer sequences are required for efficient bovine leukemia virus propagation *in vivo*: implications for viral latency. *J. Virol.* 2001;75:6977-6988. DOI 10.1128/JVI.75.15. 6977-6988.2001.
- Moelling K. *Viruses: More Friends Than Foes*. Singapore: World Sci-entific Publ., 2016. DOI 10.1142/10230.
- Nuotio L., Rusanen H., Sihvonen L., Neuvonen E. Eradication of en-zootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.* 2003;59(1-2): 43-49.
- Polat M., Takeshima S., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol. J.* 2017;14:209. DOI 10.1186/s12985-017-0876-4.

---

**Благодарности.** Работа выполнена на средства финансирования по заданию Министерства сельского хозяйства РФ (№ АААА-А18-118101190004-2).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.11.2018. После доработки 17.12.2018. Принята к публикации 17.12.2018.