


Оригинальная статья / Original article  
УДК 616.15:636.2  
DOI: 10.18470/1992-1098-2019-4-46-55

## Биологическое разнообразие гаплотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV)

Наталья В. Блажко<sup>1</sup>, Султан Х. Вышегуров<sup>1</sup>, Юрий И. Хрипко<sup>2,3</sup>, Татьяна И. Крыцына<sup>1</sup>, Кирилл С. Шатохин<sup>1</sup> , Сергей И. Логинов<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>3</sup>Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup>ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологии» Российской академии наук, пос. Краснообск, Новосибирская область, Россия

### Контактное лицо

Кирилл С. Шатохин, кандидат биологических наук, инженер-биотехнолог лаборатории энзимного анализа и ДНК-технологий, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет»; 630039 Россия, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, д. 160. Тел. +79130049765  
Email [true\\_genetic@mail.ru](mailto:true_genetic@mail.ru)  
ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0885-2772>

**Формат цитирования:** Блажко Н.В., Вышегуров С.Х., Хрипко Ю.И., Крыцына Т.И., Шатохин К.С., Логинов С.И. Биологическое разнообразие гаплотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) // Юг России: экология, развитие. 2019. Т.14, N 4. С. 46-55. DOI: 10.18470/1992-1098-2019-4-46-55

Получена 10 апреля 2019 г.  
Прошла рецензирование 17 июня 2019 г.  
Принята 15 июля 2019 г.

### Резюме

**Цель.** Настоящая статья посвящена изучению молекулярной структуры LTR-области генома BLV (bovine leukemia virus), циркулирующего в стадах чёрно-пёстрой голштинизированной породы на территории Новосибирской области.

**Материал и методы.** Пробы крови (n=288) чёрно-пёстрого голштинизированного скота были отобраны в 2016 г. в Новосибирской области. Скрининг на наличие/отсутствие BLV проводился методом ПЦР-анализа. Гематологические исследования осуществляли при помощи гематологического анализатора PCE-90 Vet.


**Результаты.** Рестриктаза *Bst*MA I образует одинаковые для всех исследованных проб разрезы, визуализируемые как фрагменты длиной 237 пн и 206 соответственно. Гидролиз рестриктазой *Bsp*I в 100% проб показал образование фрагментов 262 и 161 пн, что свидетельствует о мономорфности сайта по нуклеотиду А (аденину). Гидролиз эндонуклеазой *Bse*I образовал фрагменты, длиной 370 и 73 пн, что соответствовало гаплотипу I, а так же 378 и 65 пн, что соответствовало гаплотипу III. Проведено соответствие между гаплотипом вируса и количеством лейкоцитов крупного рогатого скота, однако существенных различий лейкоцитарных формул носителей I и III гаплотипа не обнаружено. Рассмотрены различные гипотезы эволюционных моделей взаимоотношения BLV и крупного рогатого скота, где определяющим фактором мог оказаться полиморфизм LTR-области вируса.

**Выводы.** Совокупность собственных исследований и литературных данных указывает на несостоятельность гипотезы о влиянии мутаций LTR-области на степень узнаваемости BLV иммунной системой крупного рогатого скота.

### Ключевые слова

SNP, вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV), LTR-область, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, лейкоз, гаплотип, сельское хозяйство.

# Biological Diversity of Haplotypes of the Bovine Leukemia Virus (BLV)

Natalia V. Blazhko<sup>1</sup>, Sultan Kh. Vyshegurov<sup>1</sup>, Yuriy I. Khripko<sup>1,2,3</sup>, Tatyana I. Krytsyna<sup>1</sup>, Kirill S. Shatokhin<sup>1</sup>  and Sergei I. Loginov<sup>1,4</sup>

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

<sup>2</sup>Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

<sup>3</sup>Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup>Siberian Federal Research Centre for Agro-Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russia

## Principal contact

Kirill S. Shatokhin, Engineer-Biotechnologist, Laboratory of Enzyme Analysis and DNA Technology, Novosibirsk State Agrarian University, 160 Dobrolyubova St, Novosibirsk, 630039 Russia.

Tel. +79130049765

Email [true\\_genetic@mail.ru](mailto:true_genetic@mail.ru)

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0885-2772>

**How to cite this article:** Blazhko N.V., Vyshegurov S.Kh., Khripko Yu.I., Krytsyna T.I., Shatokhin K.S., Loginov S.I. Biological Diversity of Haplotypes of the Bovine Leukemia Virus (BLV). *South of Russia: ecology, development*. 2019, vol. 14, no. 4, pp. 46-55. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2019-4-46-55

Received 10 April 2019

Revised 17 June 2019

Accepted 15 July 2019

## Abstract

**Aim.** This article is devoted to the study of the molecular structure of the LTR-region of the BLV genome (bovine leukemia virus) circulating in herds of the black-and-white Holstein breed in the Novosibirsk Region.

**Material and Methods.** Blood samples (n=288) of black-and-white Holstein cattle were taken in 2016 in the Novosibirsk Region. Screening for the presence/absence of BLV was carried out by PCR analysis. Hematological studies were carried out using a hematological analyzer RSE-90 Vet.

**Results.** BstMAI restrictase forms the same sections for all the studied samples, visualized as fragments of 237 and 206 bp in length, respectively. The hydrolysis of restrictase Bspl showed the formation of fragments of 262 and 161 bp in 100% of the samples, which indicates the monomorphism of the site for nucleotide A (adenine). Hydrolysis by endonuclease Bse1 formed fragments 370 and 73 bp long, which correspond to haplotype I, as well as 378 and 65 bp, which correspond to haplotype III. The correspondence between the virus haplotype and the number of bovine leukocytes was considered but no significant differences in the leukocyte formulas of haplotype I and III carriers were found. Various hypotheses of evolutionary models of the relationship between BLV and cattle, where the determining factor might be polymorphism of the LTR virus region, are considered.

**Conclusion.** Our own research and data in the literature indicates the invalidity of the hypothesis of the influence of mutations of the LTR-region on the degree of recognition of BLV by the immune system of cattle.

## Key Words

SNP, bovine leukemia virus (BLV), LTR-region, restriction fragment length polymorphism, leukemia, haplotype, Agriculture.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время лейкоз регистрируется как наиболее распространённое эпизоотическое заболевание крупного рогатого скота в России и ряде зарубежных стран [1-3]. Его возбудителем является *BLV* – вирус лейкоза крупного рогатого скота, относящийся к РНК-содержащим вирусам семейства *Retroviridae*. *BLV* интегрируется в геномную ДНК В-лимфоцитов, в качестве промежуточной ДНК-формы (провируса) [4; 5]. Сводящиеся к репликации жизненные процессы вирусов в принципе невозможны вне организма хозяина [6], что стало причиной набирающей популярность концепции «вирус – организм – среда» [7; 8]. Считается, что симбиотические и паразитические отношения микроорганизмов, в частности вирусов, с носителями являются довольно мощными коэволюционными факторами [9].

Из всех живых организмов вирусы наиболее подвержены мутагенезу [10]. *BLV* хоть и является вирусом с достаточно консервативной нуклеотидной последовательностью [11; 12], молекула РНК всё же представляет собой довольно неустойчивую и мутабельную структуру [13]. За последние десять лет в мире было зарегистрировано немало новых штаммов *BLV* [14], при этом гарантии того, что исследователями описаны все существующие разновидности по-прежнему нет [15]. В свою очередь, именно нуклеотидная последовательность вируса сама по себе является мишенью для наиболее современного и точного метода скрининга – ПЦР-анализа [16-18]. При этом единичной мутации вполне достаточно для того, что бы имеющиеся тест-системы дали при анализе ложноотрицательный результат. Таким образом, на «вооружении» диагностической лаборатории желательнее иметь несколько тест-систем, позволяющих идентифицировать наличие *BLV* в пробах биологического материала крупного рогатого скота.

Такие гены *BLV* как *pol*, *env* и *gag* являются достаточно хорошо изученными и используются в тест-системах для скрининга [19-21]. В то же время LTR-область *BLV* считается довольно слабоизученной структурой [15], что делает актуальным не только изучение её молекулярной структуры как таковой, но и создаёт перспективу разработки тест-систем на основе праймеров, специфичных именно к LTR-области.

Известно, что в LTR-области *BLV* локализованы так называемые гены-мутаторы, катализирующие мутагенез [2]. В некоторых исследованиях показана связь мутаций LTR-области *BLV* с особенностями течения инфекции [2; 22]. Длинные кольцевые повторы провирусной ДНК вируса *BLV* содержат последовательности, предрасположенные к формированию таких неканонических структур ДНК, как G4 квадруплексы [7; 21; 23] и триплексы [24]. Установлено, что сравнительно длинный пурин-пиримидиновый трек длиной в 13 пн, предрасположенный к формированию межмолекулярных триплексов ДНК-РНК, и отличающийся относительно повышенным консерватизмом как в секвенированных

последовательностях GenBank, так и лимфомах, индуцированных *BLV*, локализован в области второго участка TxRE (Tax-responsive elements) [7; 25]. Можно ожидать, что встройки провирусной ДНК с такими флангами, предрасположенными к формированию неканонических структур ДНК, оказывают существенное влияние на экспрессию рядом расположенных генов. Участок TxRE, связывающий активатор транскрипции провирусной ДНК (Tax), представляет особый интерес, поскольку локализован в энхансерном участке LTR-области. Tax непосредственно участвует в регуляции транскрипции провирусной ДНК *BLV* и оказывает существенное влияние на экспрессию генов хозяина, связанных с клеточной пролиферацией и дифференцировкой, иммортализацией первичных клеточных популяций в системе *in vitro*, увеличения скорости мутирования путем подавления эксцизионной репарации ДНК [7; 21]. Несмотря на широкий спектр мишеней регуляторных эффектов Tax белка, принято считать, что одними из ведущих мишеней регуляторных эффектов этого белка являются гены, кодирующие белки иммунной системы [7; 21]. Существует предположение о влиянии однонуклеотидных замен в длинных концевых повторах (LTR-области) на узнаваемость вируса организмом, то есть скрывать вирус от иммунной системы организма, тем самым увеличивая шанс встраивания вируса в клетку «хозяина» [25; 26]. Таким образом, изучение мутаций LTR-области *BLV* представляется весьма интересным аспектом. Вклад в его разрешение и является целью настоящего исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы тотальной ДНК, выделенной из цельной крови 288 коров чёрно-пёстрой голштинизированной породы, разводимой на территории Новосибирской области. Пробы крови были отобраны в мае 2016 г. из хвостовой вены стерильными катетерами с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта. ДНК выделяли с помощью набора «ДНК-Сорб-В» (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Скрининговые исследования на наличие *BLV* в пробах проводили набором «АмплиСенс®» (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Цитофлюориметрические и морфологические показатели крови определяли при помощи автоматического ветеринарного гематологического анализатора PCE-90 Vet.

Инфицированных *BLV* выявляли методом ПЦР-анализа, так как данный метод считается наиболее достоверным [16-18]. Методика ПЦР-анализа LTR-области *BLV* и применяемые в исследовании праймеры являются собственными разработками. Непосредственная методика тестирования подробно описана в предыдущей работе [27]. Для типирования полиморфизма LTR-области использовали рестриктазы *BstMA I*, *BseI*, *BspI*. Рестриктационную карту составляли с использованием биоинформационных программ для работы с последовательностями расшифрованных геномов, при использовании последовательностей из Международной

базы NCBI (GeneBank). Длины фрагментов рестрикции указаны в соответствии с Каталогом продукции компании «SibEnzym». Статистическую достоверность различий признаков оценивали критерием Стьюдента.

#### ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ассоциация результатов скрининга на вирусоносительство *BLV* и биохимического тестирования проб

крови показывает, что из 288 исследованных особей у 63 было выявлено носительство *BLV* (табл. 1). Из общего количества инфицированных животных всего у 15% показатели крови оставались в пределах нормы. Гематологическая стадия течения лейкозной инфекции, с выраженным лимфоцитозом была диагностирована у 14 голов.

**Таблица 1.** Распределение инфицированных *BLV* животных по интенсивности проявления лейкомоидных реакций

**Table 1.** Disposition of *BLV*-infected animals by intensity of leukemoid reactions

№	Показатель / Index	n	%
1	Инфицированные / Infected	63	100
2	Без изменений гематологических показателей No changes in hematological parameters	16	25
3	С выраженным лейкоцитозом With expressed leukocytosis / $> 10 \times 10^9/l$	33	53
4	С гематологической стадией течения лейкоза With the hematological stage of the course of leukemia	14	22

Учитывая замены на сайтах генома 8034 и 8139 пар нуклеотидов, выявленных методом полиморфизма длин рестриционных фрагментов, была составлена схема образования гаплотипов (табл. 2). Гаплотип был обозначен соответствующей аббревиатурой нуклеотида, в случае разрезания, и символом N, то есть неизвестным нуклеотидом – в случае отсутствия разреза. Учитывая комбинацию замен (табл. 2) по каждой пробе была составлена таблица образования гаплотипа, в соответствии с которой все пробы распределились на 2 гаплотипа – I и III. Встречаемость гаплотипа I ( $n=42$ ;  $p=0,667$ ;  $m_p=0,059$ )

была в два раза выше ( $P<0,001$ ), чем гаплотипа III ( $n=21$ ;  $q=0,333$ ;  $m_q=0,059$ ).

Результаты исследований показали наличие: гомогенной дикого типа, гомогенной с наличием SNP и двух гетерогенных, то есть имеющих гаплотипы дикого типа и полиморфизмы. Рестриктаза *BstMA I* образует одинаковые для всех исследованных проб разрезы, визуализируемые как фрагменты длиной 237 пн и 206 соответственно. Таким образом, нуклеотид №237 в изученной выборке являлся мономорфным, представленным аденином (A), что соответствует так называемому дикому типу вируса (рис. 1, табл. 2).

**Таблица 2.** Схема образования гаплотипов

**Table 2.** Scheme of formation of haplotypes

Гаплотип Haplotype	Фрагменты продуктов рестрикции Products of restriction fragments		
	<i>BstMA I</i> – GTTCN↑ CAGAG(N) <sub>2</sub> ↓		<i>BseI</i> – ACTGGN↑ TGAC↓CN
	<i>Bsp I</i> – C↑CGC GGC↓G		
I	237 (A)	378 (GC)	262 (CG)
II	237 (A)	378 (GC)	- (AG)
III	237 (A)	370 (CN)	262 (CG)
IV	237 (A)	370 (CN)	-(AG)
V	- (N)	378 (GC)	262 (CG)
VI	- (N)	378 (GC)	- (AG)
VII	- (N)	370 (CN)	262 (CG)
VIII	- (N)	370 (CN)	- (AG)

Продукты рестрикции эндонуклеазы *BspI* были идентичны во всех изученных пробах с образованием фрагментов 262 и 161 пн, что свидетельствует о наличии цитозина (C). Отсутствие гидролиза, характерное при наличии на данном сайте аденина (A), свойственного аденина (A) на сайте рестрикции (рис. 1, табл. 2). Таким образом, 100% образовавшихся амплификонов принадлежали к дикому типу.

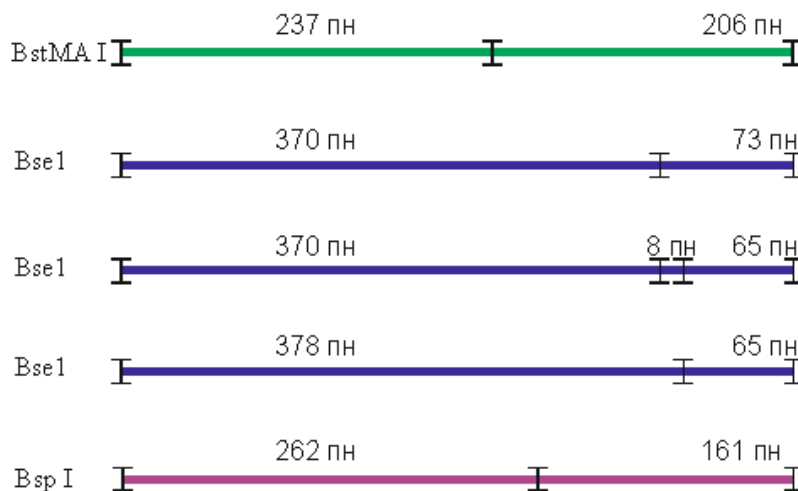
Гидролиз эндонуклеазой *BseI* оказался наиболее информативным. На электрофореграмме (рис. 2) различаются две группы паттернов: первый отрезок амплификона на уровне 378 пар нуклеотидов визуализируется отчетливо, второй на уровне 65 пн на фото плохо различим, хотя зрительно визуализируется. Различие в качестве визуализации

объясняется проведением электрофореза в агарозном геле, в котором, как правило, слабо визуализируются короткие фрагменты [28; 29]. На второй группе паттернов виден участок амплификона размером 370 пар нуклеотидов, и также слабо визуализируется второй – 73 пн (рис. 2).

Данная картина распределения рестриционных фрагментов была типичной для всех проб. Определялось только два гаплотипа. Причем, хотелось бы обратить внимание на тот факт, что на уровне 370 пар нуклеотидов фрагмент режется эндонуклеазой в случае наличия замены в последовательности с G на C, в то время как разрез на сайте 378 пн возможен при последовательности дикого типа, то есть без замены при гаплотипе C (рис. 2, 3).

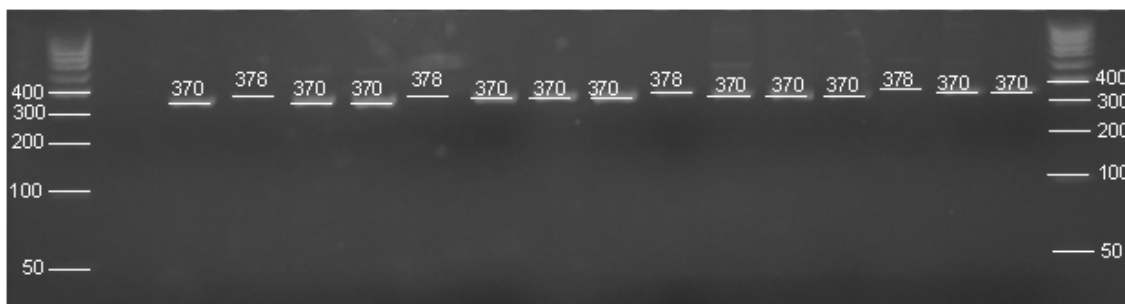
Возможные замены (SNP) указаны в круглых скобках за нуклеотидом, который они замещают. Таким образом, фактором, определяющим гаплотип *BLV* в

изученных пробах стали мутации нуклеотидов, определяемых гидролизом при воздействии эндонуклеазой *Bse1*.



**Рисунок 1.** Схема образования фрагментов при гидролизе участка генома *BLV* 443 пн указанными рестриктазами

**Figure 1.** Scheme of formation of fragments during hydrolysis of part of the genome of *BLV* 443 bp of the indicated restrictases



**Рисунок 2.** Визуализация гидролиза продуктов амплификации *Bse1* - CN/GC

**Figure 2.** Visualization of hydrolysis of the products of *Bse1* - CN/GC amplification

8011-GTATGAAAGATCATGCAGGCCTAGGCGCCGCCACCGCCCGTAAA  
 CCAGACAGAGA↓CGTCAGCTGCCAGAGAAGCTGCTGAC↑GGCAGCT  
 GGTGGCTAGAATCCCCGTACCTCCCCAACTTCCCCTTCCCGAAAAATC  
 CACACCCTGAG(C)↑CTGCTGAC↑(G)TCACCTGCTGATAAATTAA - 8030

**Рисунок 3.** Нуклеотидная последовательность участка генома *BLV*, находящаяся в LTR области и фланкируемая олигонуклеотидными праймерами, в местах предполагаемых SNP указаны разрезы эндонуклеазами

**Figure 3.** The nucleotide sequence of the *BLV* genome site located in the LTR region and flanked by oligonucleotide primers in the places of the assumed SNP are indicated by endonuclease sections

Помимо скрининга на наличие/отсутствие *BLV* в пробах биологического материала крупного рогатого скота был проведён биохимический анализ сыворотки крови. Показатели крови животных, инфицированных лейкозом разных гаплотипов, не имели между собой значимых различий содержания как общего числа лейкоцитов, так и их отдельных фракций, что подтверждается значением критерия Стьюдента ниже стандартного для  $P < 0,05$  ( $t = 2,00$  при  $d.f. = 61$ ). Стоит отметить, что животные-носители I гаплотипа отличались несколько более высоким лейкоцитозом, за счет лимфоцитов и гранулоцитов

(табл. 3). Лейкоцитарная формула животных обеих групп существенно превышала физиологическую норму [30].

Обращает на себя внимание, что в изученной выборке только 25% инфицированных животных не проявляли клинических признаков лейкоза, выражаемых лейкоцитарной формулой. Более ранние исследования показывают, что латентное течение лейкоза характерно как минимум для 70% носителей [2; 31; 32]. Более того, оба гаплотипа *BLV* в настоящем исследовании проявляют себя более агрессивно, вызывая большую долю клинических

случаев лейкоза даже в сравнении с результатами типирования животных других хозяйств Новосибирской области [27]. Впрочем, это может объясняться не столько неучтёнными генетическими факторами вируса или же крупного рогатого скота, сколько неравноценными условиями кормления и содержания. Давно известно [33], что неполноценное

кормление является весьма существенным фактором для прогрессирования инфекционных агентов, что невозможно при наличии в достаточном количестве в рационах, а, следовательно, и в организме животных таких естественных противовирусных и противомикробных факторов как витамины, микро- и макроэлементы.

**Таблица 3.** Гематологические показатели крови животных-носителей разных гаплотипов *BLV*

**Table 3.** Hematological parameters of blood of animals-carriers of different haplotypes of *BLV*

Показатель Index	Носители I гаплотипа Carriers of haplotype I, $p \pm m_p$	Носители III гаплотипа Carriers of haplotype III, $p \pm m_p$	$t_f^*$
Лейкоциты Leukocytes, $10^9/l$	17,07± 2,78	14,52±3,05	0,618
Лимфоциты Lymphocytes, $10^9/l$	9,14± 2,46	8,35± 2,75	0,214
Моноциты Monocytes, $10^9/l$	1,50± 0,35	1,27± 0,51	0,372
Гранулоциты Granulocytes, $10^9/l$	6,43±1,22	4,90±1,93	0,670
Лимфоциты Lymphocytes, $10^9/l$	51,95±10,03	57,10±11,56	-0,337
Моноциты Monocytes, $10^9/l$	8,99±1,31	8,78±2,96	0,065
Гранулоциты Granulocytes, $10^9/l$	36,69±7,51	34,14±12,17	0,178

\*  $t_f$  – значение критерия Стьюдента / value of the Student criterion

Немаловажно отметить, что именно I гаплотип носит в себе SNP определяемую эндонуклеазой *Bse1*, что дает возможность проверить предположение ряда ученых [26; 34; 35] о необходимости данных замен, для того чтобы вирус мог «уйти» от реакции иммунной системы организма «хозяина». В настоящем исследовании не было получено данных, указывающих на участие LRT-области *BLV* в регуляции иммунного ответа крупного рогатого скота на возбудитель лейкоза. С другой стороны, LRT-область содержит генетические элементы регуляции скорости синтеза вирусных частиц *BLV* [15], и как показывают наши недавние исследования [27], интенсивность репликации вирусных частиц вполне может являться следствием мутаций LRT-области. Но стоит помнить, что увеличение скорости размножения при прочих равных условиях непременно провоцирует более интенсивный ответ иммунной системы, что чревато гибелью, как вирусоносителя, так и вируса, если последнему не удастся проникнуть в организм следующего владельца [27]. Таким образом, скорость размножения вируса оказывается лимитирована узнаваемостью иммунной системы, что собственно, позволяет определить второй эволюционный вектор, направленный на снижение узнаваемости вируса иммунной системой и, в конечном счёте – на переход отношений вирус-хозяин с паразитических на симбиотические.

Данные предыдущего исследования указывают на увеличение вирусной нагрузки и количества лейкоцитов при замене C>G [34], что явно опровергает предположение о детерминации маскировочного вектора *BLV* LRT-областью. Сопоставление собственных исследований и литературных данных [2; 15; 32] скорее подтверждает гипотезу о

функции LRT-области как регулятора синтеза вирусных частиц. Принимая во внимание принципы генетического контроля, трудно предположить [10], чтобы регулятор сам по себе мог являться фактором узнаваемости вириона иммунной системой носителя по принципу «свой-чужой». Единственное возможное влияние регулятора на маскировочную функцию может заключаться в уменьшении синтеза регулируемого продукта. Гораздо более логичным представляется выполнение маскировочной функции белками оболочки вириона, которые у *BLV* кодируются геном *env* [22; 36; 37].

#### ВЫВОДЫ

1. Типирование LRT-области *BLV* выявило однонуклеотидную замену C>G, которая обнаружилась как образование фрагментов рестрикции эндонуклеазой *Bse1*, длиной 370+73 пн (соответствовало I гаплотипу вируса) и 378+65 пн (III гаплотип).
2. Встречаемость гаплотипа I составила 0,667±0,059; гаплотипа III – 0,333±0,059
3. Содержание лейкоцитов в крови носителей I и III не имела существенных различий.
4. Совокупность собственных исследований и литературных данных указывает на несостоятельность гипотезы о влиянии мутаций LRT-области на степень узнаваемости *BLV* иммунной системой крупного рогатого скота.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена на средства финансирования по заданию МСХРФ (№ АААА-А18-118101190004-2).

#### ACKNOWLEDGMENT

The work was performed with funding by the Ministry of Agriculture of Russian Federation (№ АААА-А18-118101190004-2).

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Новикова М.В., Боровой В.Н., Барсуков Ю.И., Коломыцев С.А. Эпизоотическая ситуация по социально значимым и особо опасным болезням животных в Российской Федерации за 2017 год // Бизнес партнёр сельское хозяйство. Ежегодный справочник для руководителей и специалистов АПК, 2018. URL: <http://www.tseNvik.ru/bizness/articles/mvet/epizooticheskaya-situatsiya-po-sotsialN-znachimym-i-osoboopasnym-boleznyam-zhivotnykh-v-rossiysko1/> (дата обращения: 22.02.2018)
- Juliarena M.A., Barrios C.N., Lützelshwab C.M., Esteban E.N., Gutiérrez S.E. Bovine leukemia virus: current perspectives // *Virus Adaptation and Treatment*. 2017. N 9. P. 13-26. DOI: 10.2147/VAAT.S113947
- Polat M., Takeshima S., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus // *Virology*. 2017. V. 14. 209 p. DOI: 10.1186/s12985-017-0876-4
- Tellam R.L., Worley K.C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution // *Science*. 2009. V. 324. Iss. 5926. P. 522-528. DOI: 10.1126/science.1169588
- Suzuki T., Ikeda H., Mase M. Restricted viral cDNA synthesis in cell lines that fail to support productive infection by bovine leukemia virus // *Arch Virol*. 2018. V. 163. Iss. 9. P. 2415-2422. DOI: 10.1007/s00705-018-3887-6
- Moelling K. *Viruses: More Friends than Foes*. Singapore: World Scientific Publ., 2016. 420 p. DOI: 10.1142/10230
- Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Глазко Т.Т. Введение в геномную селекцию животных. М.: ООО «Приятная компания», 2012. 258 с.
- Ковалев Н., Красочко П. *Вирусы и прионы в патологии животных и человека*. М.: Литрес, 2017. 428 с.
- Марков А. Наймарк Э. *Эволюция. Классические идеи в свете новых открытий*. М.: изд-во АСТ: CORPUS, 2015. 656 с.
- Lewin B. *Genes IX*. Jones & Bartlett Learning, 2008. 892 p.
- Tajima S., Ikawa Y., Aida Y. Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development // *J Virol*. 1998. V. 72. P. 7569-7576.
- Yanagihara R., Saitou N., Nerurkar V.R., Song K.J., Bastian I., Franchini G., Gajdusek D.C. Molecular phylogeny and dissemination of human T-cell lymphotropic virus type I viewed within the context of primate evolution and human migration // *Cell Mol Biol*. 1995. V. 41. P. 145-161.
- Ridley M. *Genome: the Autobiography of a Species in 23 Chapters*. Published by Harper Perennial, Paperback, 2006. 344 p.
- Marawan M.A., Mekata H., Hayashi T., Sekiguchi S., Kirino Y., Horii Y., Moustafa A-M.M., Arnaout F.K., Galila E.S.M., Nrimine J. Phylogenetic analysis of *env* gene of bovine leukemia virus strains spread in Miyazaki prefecture, Japan // *J Vet Med Sci*. 2017. V. 79. Iss. 5. P. 912-916. DOI: 10.1292/jvms.17-0055
- Pluta A., Rola-Luszczak M., Douville R.N., Kuźmak J. Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences // *Virology*. 2018. V. 15. P. 165. DOI: 10.1186/s12985-018-1062-z
- Andreolla A.P., ScheerErpen L.M., Frandoloso R., Kreutz L.K. Development of an indirect ELISA based on recombinant capsid protein to detect antibodies to bovine leukemia virus // *Braz J Microbiol*. 2018. V. 49. Supp. 1. P. 68-75. DOI: 10.1016/j.bjm.2018.05.001
- 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 Евро-Северо-Востока*. 2015. Т. 44. N 1. С. 60-65.
- Мищенко В.А., Петрова О.Н., Караулов А.К., Мищенко А.В. *Проблемы лейкоза крупного рогатого скота*. Владимир, 2018. 38 с.
- Lojkić I., Balic D., Rudan N., Kovacic M., Cacic Z., Periskis M., Bedecovic T., Roic B., Ciglar Grozdanic I. Eradication of bovine leukosis virus on a dairy farm through improved virus detection // *Vet. Arhiv*. 2013. V. 83. P. 581-591.
- Ruggiero V.J., Benitez O.J., Tsai Y.L., Lee P.A., Tsai C.F., Lin Y.C., Chang H.G., Wang H.T., Bartlett P. On-site detection of bovine leukemia virus by a field-deployable automatic nucleic extraction plus insulated isothermal polymerase chain reaction system // *J Virol Methods*. 2018. V. 259. P. 116-121. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.06.008
- Glazko T.T., Kosovskiy G.Yu., Kovaltchuk S.N., Zybailov B.L., Glazko V.I. Genomic scanning using inverted repeats of microsatellites (GAG)6C, (AG)9C // *Biogeosystem Technique*. 2015. V. 4. Iss. 2. P. 138-152. DOI: 10.13187/bgt.2015.4.138
- Moratorio G., Fischer S., Bianchi S., Tome L., Rama G., Obal G., Carrion F., Pritsch O., Cristina J. A detailed molecular analysis of complete bovine leukemia virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas // *Vet Res*. 2013. V. 44. P. 19. DOI: 10.1186/1297-9716-44-19. URL: <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/19> (дата обращения: 18.03.2013)
- Buske F.A., Mattick J.S., Bailey T.L. Potential in vivo roles of nucleic acid triple-helices // *RNA Biology*. 2011. V. 8. Iss. 3. P. 427-439. DOI: 10.4161/rna.8.3.14999
- Limanskaya O.Yu. Polypurine/polypyrimidine sequences with potential of forming triplexes in the proviral DNA of bovine retroviruses // *Cytology and Genetics*. 2010. V. 44. Iss. 1. P. 10-18.
- Косовский Г.Ю., Глазко В.И., Архипов А.В., Петрова И.О., Глазко Т.Т. Популяционно-генетическая дифференциация молочного скота по ISSR-PCR маркерам // *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2014. N 5. С. 53-56.
- Buehring G.C., Philpott S.M., Choi K.Y. Humans have antibodies reactive with bovine leukemia virus // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2003. V. 19. N 12. P. 1105-1113. DOI: 10.1089/088922203771881202
- 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 // Вавилонский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. N 3. С. 262-269. DOI: 10.18699/VJ19.491
28. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. М.: «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», 2012. 80 с.
29. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. K. Wilson and J. Walker (eds). Sixth edition. Cambridge University Press, 2005.
30. Frandson R.D., Wilke W.L., Fails A.D. Anatomy and physiology of farm animals. Seven edition. Wiley-Blackwell: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2009. 536 p.
31. Ruiz V., Porta N.G., Lomónaco M., Trono K., Alvarez I. Bovine leukemia virus infection in neonatal calves: Risk factors and control measures // Frontiers in Veterinary Science. 2018. V. 5. Article 267. DOI: 10.3389/fvets.2018.00267
32. Gyles C. Should we be more concerned about bovine leukemia virus? // Can Vet. J. 2016. V. 57. Iss. 2. P. 115-116.
33. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьёв Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП, 2001. 928 с.
34. Rice N.R., Stephens R.M., Burny A., Gilden R.V. The *gag* and *pol* genes of bovine leukemia virus: Nucleotide sequence and analysis // Virology. 1985. V. 142. P. 357-377.
35. Агол В.И. Природа патогенности вирусов // Природа. 2015. N 5. С. 3-10.
36. Florins A., de Brogniez A., Elemans M., Bouzar A.B., François C., Reichert M., Asquith B., Willems L. Viral expression directs the fate of B cells in bovine leukemia virus-infected sheep // J Virol. 2012. V. 86. Iss. 1. P. 621-624. DOI: 10.1128/JVI.05718-11
37. Barez P.Y., de Brogniez A., Carpentier A., Gazon H., Gillet N., Gutiérrez G., Hamaidia M., Jacques J.R., Perike S., NeelatureSriramareddy S., ReNtte N., Staumont B., Reichert M., TroN K, Willems L. Recent Advances in BLV Research // Viruses. 2015. V. 7. Iss. 11. P. 6080-6088. DOI: 10.3390/v7112929
5. Suzuki T., Ikeda H., Mase M. Restricted viral cDNA synthesis in cell lines that fail to support productive infection by bovine leukemia virus. *Arch Virol.*, 2018, vol. 163, iss. 9, pp. 2415-2422. DOI: 10.1007/s00705-018-3887-6
6. Moelling K. Viruses: More Friends than Foes. Singapore, World Scientific Publ., 2016, 420 p. DOI: 10.1142/10230
7. Glazko V.I., Kosovskiy G.Yu., Glazko T.T. *Vvedenie v genomnyu selektsiyu zhivotnykh* [Introduction to genomic selection of animals]. Moscow, Ltd «Priyatnaya kompaniya», 2012, 258 p. (In Russian)
8. Kovalev N., Krasochko P. *Virusy i priony v patologii zhivotnykh i cheloveka* [Viruses and prions in animal and human pathology]. Moscow, Litres Publ., 2017, 428 p. (In Russian)
9. Markov A., Naimark E. *Evolutsiya. Klassicheskie idei v svete novykh otkrytiy* [Evolution. Classical Ideas in the Light of New Discoveries]. Moscow, ACT: CORPUS Publ., 2015, 656 p. (In Russian)
10. Lewin B. Genes IX. Jones & Bartlett Learning, 2008, 892 p.
11. Tajima S., Ikawa Y., Aida Y. Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *J Virol.*, 1998, vol. 72, pp. 7569-7576.
12. Yanagihara R., Saitou N., Nerurkar V.R., Song K.J., Bastian I., Franchini G., Gajdusek D.C. Molecular phylogeny and dissemination of human T-cell lymphotropic virus type I viewed within the context of primate evolution and human migration. *Cell Mol Biol.*, 1995, vol. 41, pp. 145-161.
13. Ridley M. Genome: the Autobiography of a Species in 23 Chapters. Published by Harper Perennial, Paperback, 2006, 344 p.
14. Marawan M.A., Mekata H., Hayashi T., Sekiguchi S., Kirino Y., Horii Y., Moustafa A-M.M., Arnaout F.K., Galila E.S.M., Nrimine J. Phylogenetic analysis of *env* gene of bovine leukemia virus strains spread in Miyazaki prefecture, Japan. *J Vet Med Sci.*, 2017, vol. 79, iss. 5, pp. 912-916. DOI: 10.1292/jvms.17-0055
15. Pluta A., Rola-Łuszczak M., Douville R.N., Kuźmak J. Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. *Virol J.*, 2018, vol. 15, p. 165. DOI: 10.1186/s12985-018-1062-z
16. Andreolla A.P., ScheerErpen L.M., Frandoloso R., Kreutz L.K. Development of an indirect ELISA based on recombinant capsid protein to detect antibodies to bovine leukemia virus. *Braz J Microbiol.*, 2018, vol. 49, supp. 1, pp. 68-75. DOI: 10.1016/j.bjm.2018.05.001
17. Smirnov Y.P., Suvorova I.L., Gryazeva N.A. Dynamics of bovine leucosis infection in the Kirov region and effectiveness of anti-leucosis measures. *Agrarnaya Nauka Evro-Severo Vostoka* [Agricultural Science Euro-North-East]. 2015, vol. 44, no. 1, pp. 60-65. (In Russian)
18. Mischenko V.A., Petrova O.N., Karaulov A.K., Mischenko A.V. *Problemy leikoza krupnogo rogatogo skota* [Problems of Bovine Leukemia]. Vladimir, 2018, 38 p. (In Russian)
19. Lojkic I., Balic D., Kovacic M., Cac Z., Periskis M., Bedecovic T., Roic B., Ciglar-Grozdanic I. Eradication of bovine leukosis virus on a dairy farm through improved virus detection. *Vet. arhiv*, 2013, vol. 83, pp. 581-591.

## REFERENCES

1. 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. (In Russian) Available at: [mvvet/epizooticheskaya-situatsiya-posotsialno-znachimym-i-osobo-opasnymbolezniam-zhivotnykh](http://mvvet/epizooticheskaya-situatsiya-posotsialno-znachimym-i-osobo-opasnymbolezniam-zhivotnykh). (accessed 22.02.2018)
2. Juliarena M.A., Barrios C.N., Lützel Schwab C.M., Esteban E.N., Gutiérrez S.E. Bovine leukemia virus: current perspectives. *Virus Adaptation and Treatment*, 2017, no. 9, pp. 13-26. DOI: 10.2147/VAAT.S113947
3. Polat M., Takeshima S., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J.*, 2017, vol. 14, 209 p. DOI: 10.1186/s12985-017-0876-4
4. Tellam R.L., Worley K.C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, 2009, vol. 324, iss. 5926, pp. 522-528. DOI: 10.1126/science.1169588



20. Ruggiero V.J., Benitez O.J., Tsai Y.L., Lee P.A., Tsai C.F., Lin Y.C., Chang H.G., Wang H.T., Bartlett P. On-site detection of bovine leukemia virus by a field-deployable automatic nucleic extraction plus insulated isothermal polymerase chain reaction system. *J Virol Methods.*, 2018, vol. 259, pp. 116-121. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.06.008
21. Glazko T.T., Kosovskiy G.Yu., Kovaltchuk S.N., Zybaïlov B.L., Glazko V.I. Genomic scanning using inverted repeats of microsatellites (GAG)<sub>6</sub>C, (AG)<sub>9</sub>C // *Biogeosystem Technique.* 2015. V. 4. Iss. 2. P. 138-152. DOI: 10.13187/bgt.2015.4.138
22. Moratorio G., Fischer S., Bianchi S., Tome L., Rama G., Obal G., Carrion F., Pritsch O., Cristina J. A detailed molecular analysis of complete bovine leukemia virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas. *Vet Res.*, 2013, vol. 44, 19 p. DOI: 10.1186/1297-9716-44-19. Available at: <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/19> (accessed 18.03.2013)
23. Buske F.A., Mattick J.S., Bailey T.L. Potential in vivo roles of nucleic acid triple-helices. *RNA Biology*, 2011, vol. 8, iss. 3, pp. 427-439. DOI: 10.4161/rna.8.3.14999
24. Limanskaya O.Yu. Polypurine/polypyrimidine sequences with potential of forming triplexes in the proviral DNA of bovine retroviruses. *Cytology and Genetics*, 2010, vol. 44, no 1, pp. 10-18.
25. Kosovskiy G.Yu., Glazko V.I., Arkhipov A.V., Petrova I.O., Glazko T.T. Population-genetic differentiation of dairy cattle by ISSR-PCR markers. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk* [Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences]. 2014, no. 5, pp. 53-56. (In Russian)
26. Buehring G.C., Philpott S.M., Choi K.Y. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 2003, vol. 19, no. 12, pp. 1105-1113. DOI: 10.1089/088922203771881202
27. 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. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2019, vol. 23, no. 3, pp. 262-269. (In Russian) DOI: 10.18699/VJ19.491
28. Zorina V.V. *Osnovy polimeraznoy tsepnoy reaktsyi (PTsR)* [Basics of polymerase chain reaction (PCR)]. Moscow, «DNA-TEKHNOLOGIA» Publ., 2012, 80 p. (In Russian)
29. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. K. Wilson and J. Walker (eds). Sixth edition. Cambridge University Press, 2005.
30. Frandson R.D. Wilke W.L., Fails A.D. Anatomy and physiology of farm animals. Seven edition. Wiley-Blackwell: A John Wiley & Sons, 2009, 536 p.
31. Ruiz V., Porta N.G., Lomónaco M., Trono K., Alvarez I. Bovine leukemia virus infection in neonatal calves. Risk factors and control measures. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, vol. 5, article 267. DOI: 10.3389/fvets.2018.00267
32. Gyles C. Should we be more concerned about bovine leukemia virus? *Can Vet. J.*, 2016, vol. 57, iss. 2, pp. 115-116.
33. Syurin V.N., Samuylenko A.Ya., Solov'ev B.V., Fomina N.V. *Virusnye bolezni zhivotnykh* [Viral Diseases of Animals]. Moscow, All-Russia Research and Technology Institute of Bioindustry Publ., 2001, 928 p. (In Russian)
34. Rice N.R., Stephens R.M., Burny A., Gilden R.V. The *gag* and *pol* genes of bovine leukemia virus: Nucleotide sequence and analysis. *Virology*, 1985, vol. 142, pp. 357-377.
35. Agol V.I. Nature of virus pathogenicity. *Priroda* [Nature]. 2015, no. 5, pp. 3-10. (In Russian)
36. Florins A., de Brogniez A., Elemans M., Bouzar A.B., François C., Reichert M., Asquith B., Willems L. Viral expression directs the fate of B cells in bovine leukemia virus-infected sheep. *J Virol.*, 2012, vol. 86, iss. 1, pp. 621-624. DOI: 10.1128/JVI.05718-11
37. Barez P.Y., de Brogniez A., Carpentier A., Gazon H., Gillet N., Gutiérrez G., Hamaidia M., Jacques J.R., Perike S., NeelatureSriramareddy S., ReNtte N., Stau-mont B., Reichert M., TroN K, Willems L. Recent Advances in BLV Research. *Viruses*, 2015, vol. 7, iss. 11, pp. 6080-6088. DOI: 10.3390/v7112929

#### КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Наталья В. Блажко – разработка методики ПЦР-анализа LRT-области *BLV*, разработка общей научной концепции статьи, обработка первичных данных, написание первичного текста. Султан Х. Вышегуров – решение организационно-технических и финансовых аспектов эксперимента. Юрий И. Хрипко – разработка методики ПЦР-анализа LRT-области *BLV*, получение первичных экспериментальных данных. Татьяна И. Крыцына – получение первичных экспериментальных данных. Кирилл С. Шатохин – статистическая обработка экспериментальных данных, обсуждение результатов исследования, подготовка статьи к публикации. Сергей И. Логинов – разработка общей научной концепции статьи, обсуждение результатов исследования.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Natalia V. Blazhko: development of methods of PCR analysis of LRT-region of *BLV*, development of the general scientific concept of the article, processing of primary data, and writing the primary text. Sultan H. Vyshegurov: solution of the organizational, technical and financial aspects of the experiment. Yuriy I. Khripko: development of PCR analysis methodology for LRT- region of *BLV* region and obtaining primary experimental data. Tatyana I. Krytsyna: obtaining primary experimental data. Kirill S. Shatokhin: statistical processing of experimental data, discussion of research results and preparation of the article for publication. Sergei I. Loginov: development of the general scientific concept of the article and discussion of research results.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION**

The authors state that there is no conflict of interest.

**ORCID**

Наталья В. Блажко / Natalia V. Blazhko <https://orcid.org/0000-0002-9414-2186>

Султан Х. Вышегуров / Sultan H. Vyshegurov <https://orcid.org/0000-0002-4180-1643>

Юрий И. Хрипко / Yuriy I. Khripko <https://orcid.org/0000-0002-8527-3977>

Татьяна И. Крыцына / Tatyana I. Krytsyna <https://orcid.org/0000-0002-5197-3828>

Кирилл С. Шатохин / Kirill S. Shatokhin <https://orcid.org/0000-0002-0885-2772>

Сергей И. Логинов / Sergei I. Loginov <https://orcid.org/0000-0003-0921-1405>