

Научная статья

УДК 619:616.98:578.828.11

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2022-16-3-282-295>

## Генетический анализ изолятов ВЛКРС у перинатально инфицированного крупного рогатого скота в молодом возрасте

Наталья Геннадиевна Козырева<sup>1</sup>, Илья Юрьевич Абашин<sup>2</sup>,  
Людмила Александровна Иванова<sup>3</sup>

<sup>1-3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия

<sup>1</sup> nk07-73@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4318-8173>

<sup>2</sup> nk07-73@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3623-1623>

<sup>3</sup> nk07-73@mail.ru

### Аннотация

**Цель исследований** – в динамике выявления случаев перинатального заражения оценить количество, генетический статус провирусов лейкоза крупного рогатого скота, выделенных от молодых животных, и корреляционные связи между некоторыми показателями проявления инфекционного процесса на основе методов генодиагностики.

**Материалы и методы.** Использовали материал от крупного рогатого скота различных возрастных групп: 1 – телята (30–40 минут после рождения до приема молозива и от 15 до 45 сут); 2 – нетели (не старше двух лет). Применяли методы радиальной иммунодиффузии (РИД), полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), филогенетический анализ.

**Результаты и обсуждение.** Приведена оценка случаев перинатального заражения молодняка крупного рогатого скота. Частота выявления случаев инфицирования составила у телят 4,15% (ПЦР-РВ) и 1,09% (РИД); у нетелей – 1,1% (ПЦР-РВ) и 0,88% (РИД). В положительной динамике (2013–2022 гг.) обнаружено снижение в 36 раз случаев инфицирования с 14,5 до 0,4%, при этом, проходя через 0% (2020 г.) и находясь на уровне 0% (2022 г.). Диапазон провирусной нагрузки в крови обследованных животных составил  $2,02 \times 10^4$  –  $8,38 \times 10^6$  ГЭ/мл. Показана принадлежность выделенных изолятов ВЛКРС к двум генотипам *GIV* и *GVII* (env) и кладу 1 (pol). Оценено завышение числа провирусов в три раза у особей до двух лет ( $3,83 \times 10^6$  ГЭ/мл) относительно таковой у месячных телят ( $1,3 \times 10^6$  ГЭ/мл) и в 9 раз для *GIV* относительно *GVII*. Проработка генодиагностических алгоритмов важна для повышения эффективности профилактических инструментов по предотвращению распространения данной ретровирусной инфекции на ранних сроках у молодых животных, что подтверждено снижением до 0% случаев выявления ретровирусной инфекции у молодых животных в динамике. Число провируса было выше у нетелей, чем у телят; у повторнородящих молочных коров уровень провирусной нагрузки выше, чем у не рожавших особей и количественные показатели в крови животных с генотипом *GIV* были выше относительно таковых с *GVII* генетическим вариантом ВЛКРС.

**Ключевые слова:** лейкоз, ВЛКРС, крупный рогатый скот, перинатальное инфицирование, филогенетический анализ, генетический полиморфизм, противолейкозные оздоровительные мероприятия

**Благодарность.** Работа выполнена в рамках государственного задания в соответствии с утвержденным планом НИР ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН на 2022 год.

**Прозрачность финансовой деятельности:** в представленных материалах или методах авторы не имеют финансовой заинтересованности.

**Конфликт интересов отсутствует**

**Для цитирования:** Козырева Н. Г., Абашин И. Ю., Иванова Л. А. Генетический анализ изолятов ВЛКРС у перинатально инфицированного крупного рогатого скота в молодом возрасте // Российский паразитологический журнал. 2022. Т. 16. № 3. С. 282–295.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2022-16-3-282-295>

© Козырева Н. Г., Абашин И. Ю., Иванова Л. А., 2022



Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.  
The content is available under Creative Commons Attribution 4.0 License.

Original article

# Bovine Leukemia Virus (BLV) isolates genetic analysis in perinatally infected cattle at young age

Natalia G. Kozyreva<sup>1</sup>, Iliya Yu. Abashin<sup>2</sup>, Lyudmila A. Ivanova<sup>3</sup><sup>1-3</sup>Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia<sup>1</sup>nk07-73@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4318-8173><sup>2</sup>nk07-73@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3623-1623><sup>3</sup>nk07-73@mail.ru

## Abstract

**The purpose of the research** is to identify perinatal infection in the dynamics, and assess the number and genetic status of bovine leukemia proviruses isolated from young animals, and correlations between some indicators of the infectious process based on gene diagnostics methods.

**Materials and methods.** We used the material from cattle of different age groups: 1, calves (30–40 minutes after birth before colostrum and 15 to 45 days); and 2, heifers (not older than two years). Radial immunodiffusion (RID), real-time polymerase chain reaction (PCR), and phylogenetic analysis were used.

**Results and discussion.** An assessment is given for perinatal infection of the young cattle. The detection rate of the infection in the calves was 4.15% (PCR) and 1.09% (RID); and 1.1% (PCR) and 0.88% (RID) in the heifers. A 36-fold decrease of the infection was found in positive dynamics (2013–2022) from 14.5 to 0.4% with passing through 0% (2020) and being at the level of 0% (2022). The proviral load ranged from  $2.02 \times 10^4$  to  $8.38 \times 10^6$  GE/mL in the blood of the examined animals. The BLV isolates obtained were shown to belong to two genotypes, *GIV* and *GVII* (env), and clade 1 (pol). We assessed an overestimation of the number of the proviruses by a factor of three in the animals under two years of age ( $3.83 \times 10^6$  GE/mL) relative to that in the 1-month-old calves ( $1.3 \times 10^6$  GE/mL), and by a factor of nine for *GIV* relative to *GVII*. It is important to develop gene diagnostics algorithms to increase the effectiveness of routine tools to prevent the spread of this retrovirus infection in young animals at an early stage, which is confirmed by a decrease to 0% of detected retrovirus infection in young animals over time. The provirus number was higher in the heifers than the calves; the proviral load level was higher in the multiparous dairy cows than the nulliparous animals, and quantitative indicators were higher in the animals' blood with the *GIV* genotype relative to those with the *GVII* genetic variant of the BLV.

**Keywords:** leukemia, BLV, cattle, perinatal infection, phylogenetic analysis, genetic polymorphism, anti-leukemic health precautions

**Acknowledgements.** The study was conducted within the State Task as provided by the approved Research Work Plan of the FSC VIEV for 2022.

**Financial transparency:** none of the authors has financial interest in the submitted materials or methods.

**There is no conflict of interests**

**For citation:** Kozyreva N. G., Abashin I. Yu., Ivanova L. A. Bovine Leukemia Virus (BLV) isolates genetic analysis in perinatally infected cattle at young age. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2022;16(3):282–295. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2022-16-3-282-295>

© Kozyreva N. G., Abashin I. Yu., Ivanova L. A., 2022

## Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) является представителем дельтаретровирусов семейства Retroviridae и индуцирует злокачественное лимфопролиферативное заболевание – энзоотический лейкоз [19]. Лейкоз крупного рогатого скота, как латентная ретровирусная инфекция сельскохозяй-

ственных животных, наносит экономический ущерб животноводческой отрасли, и является одной из наиболее важных проблем ветеринарной медицины.

В хозяйствах с высоким уровнем инфицированности выращивание свободного от вируса молодняка с заменой им в дальнейшем маточного поголовья – основное направление

работы по формированию здорового поголовья в рамках осуществления оздоровительных мероприятий, где ведущее место принадлежит диагностике. Применение серологических методов диагностики усложняет задачу своевременной постановки диагноза из-за присутствия в организме телят колостральных антител, приобретенных от матерей. Таким образом, на данном этапе онтогенеза крупного рогатого скота (телята в возрасте 0–6 мес.) прямая диагностика инфекции становится наиболее эффективной и приводит к сокращению сроков противолейкозных мероприятий.

Кровь, все секреты и экскреты с наличием в них лимфоцитов, зараженных ВЛКРС, представляют собой факторы передачи патогена восприимчивому крупному рогатому скоту [1].

При вертикальной передаче инфицирование ВЛ осуществляется в перинатальном периоде, в котором передача лейкозной инфекции от матери к новорожденному происходит следующими путями: а) гематогенным – трансплацентарно при преодолении ретровирусом плацентарного барьера, б) контактным – при родах, посредством заглатывания инфицированной крови или амниотической жидкости, в) алиментарным – после родов через материнское молоко.

По литературным данным, внутриутробное заражение в естественных условиях у новорожденных телят до приема молозива составляет от 4 до 18% [8, 25, 28]. Показана независимость естественного внутриутробного инфицирования ВЛКРС от породы [28], возраста матерей, паритета самок (числа родов) и времени наличия этой инфекции у матерей [9], но выявлена связь с материнским лимфоцитозом [8, 25], злокачественной лимфомой [25] и материнской вирусной нагрузкой [28]. Экспериментальное заражение коров во время беременности подтверждено выявлением серопозитивных телят при рождении, что указывает на их внутриутробное инфицирование [39]. Предположительно плацентарная и пуповинная кровь могут быть путями вертикальной передачи ВЛКРС при наличии провируса в плацентарной и пуповинной крови, но не в амниотической жидкости [34]. При исследовании частоты перинатальной инфекции ВЛКРС в полевых условиях в Японии обнаружено 7,7% телят, рожденных от инфицированных коров с инфицированием в родовых путях, а 10,8% – в утробе [28, 32].

Как для ВЛКРС, так и для представляющих значительную опасность Т-лимфотропных вирусов приматов, существует проблема передачи ретровирусов потомству с молоком от инфицированных матерей [10]. Принимая во внимание сходство биологических свойств этих вирусов, можно ожидать, что способ и механизмы их передачи имеют много общего [2].

Выпаивание материнским молоком увеличивает риск инфицирования новорожденного. При анализе данных о роли молока как фактора передачи ВЛКРС показано, что в естественных условиях заражение телят вирусом лейкоза при этом происходит весьма редко [1]. Однако, при наличии ретровирусной инфекции у коров-матерей вероятность инфицирования через молоко значительно повышается посредством контаминирования кровью, например, в случае заболевания коровы-вирусоносителя маститом [11].

Как по литературным данным, так и по результатам собственных исследований, описано наличие провируса/инфекционного вируса и в молоке, и в молозиве от большинства инфицированных коров [2, 18], которые являются источниками инфекции для новорожденных телят. С другой стороны, и молоко, и молозиво также могут содержать специфические антитела к ВЛКРС [18].

Потенциальные защитная или инфекционная роли/функции молозива и молока при естественной передаче ВЛКРС пока еще до конца не выяснены и в настоящее время являются предметом многочисленных исследований, которые предполагают полярные выводы/гипотезы [13, 15, 24, 39]. При изучении количественных показателей установлено, с одной стороны, что присутствие провируса в молозиве достоверно коррелирует с провирусной нагрузкой (ПН) в крови [17]; с другой стороны, в образцах молозива ПН ниже, чем в образцах периферической крови [2, 4, 32].

По статистике, в среднем, у инфицированных коров рождается 3–5% (собственные наблюдения), около 10% [32] инфицированного потомства. Увеличение частоты перинатальной передачи может достигать практически до 30% в случаях присутствия отягчающих условий (например, факторов патогенности микроорганизмов, нарушающих плацентарный барьер или контаминации кормов плесневыми грибами).

Известно, что путь передачи ретровируса во время родов является основным в вертикальной трансмиссии. Например, для ВИЧ-инфекции это составляет 60–75% случаев. В связи с этим, предполагается, что передача вируса произошла на интранатальном этапе (во время родов) при условии выявления на 7–90-е сутки жизни инфекции и отсутствии грудного вскармливания [6].

Так, в случае лентивирусов (ВИЧ) трансплацентарный путь внутриутробного заражения является ключевым механизмом передачи инфекции и вторым по эффективности заражения относительно гемотрансфузии. Проанализированы патологические изменения в ворсинчатом хорионе, нарушающие защитную функцию плаценты как плацентарного барьера, препятствующего инфицированию плода. При дефектах плаценты (в частности, синцитиотрофобласта), способствующих проникновению вируса в кровотоки плода, частота передачи ВИЧ плоду увеличивается на последнем месяце беременности. В процессах регуляции межклеточного слияния элементов цитотрофобласта и формирования синцитиотрофобласта в плаценте человека на клеточном уровне участвуют гены эндогенных ретровирусов (в частности, лентивирусов) человека (human endogenous retroviruses – HERVs) как рудимент возбудителей ретровирусных инфекций, закрепившихся в зародышевой ДНК. Например, синцитин-1 (ERVWE1 – endogenous retroviral family W, Env(C7), member1) в случае обладания феноменом рецепторной интерференции обеспечивает защиту клеток хозяина от экзогенных ретровирусов и может регулировать тропизм ВИЧ-1 к CD4 негативным клеткам через взаимодействие с рецепторами hASCT1/hASCT2 [6].

Также известно, род дельтаретровирусов представлен, помимо Т-лимфотропных вирусов приматов (PTLV) (в том числе, человека (HTLV) и ВЛКРС (BLV)), эндогенными ретровирусами (endogenous retroviruses, ERVs) [19].

При изучении вертикальной трансмиссии в эксперименте частота выявления (скорость распространения) случаев ретровирусной инфекции у последующего поколения мышей, чьи матери были заражены мышинным ретровирусом ts1 (возраст матерей, в котором они получили инокуляцию/инъекцию вирусом 5 сут или 48 ч), составила 2,9 и 25% соответственно [12].

У беременных женщин с условием профилактического лечения и также при кесаревом сечении частота заражения ВИЧ-инфекцией при перинатальной передаче снижается до 5–8% [6]. Однако, риск ее все же остается высоким, что диктует необходимость дальнейшего совершенствования организации системы медико-социальной помощи для данной категории населения с разработкой дополнительных мер по снижению трансмиссии ВИЧ-инфекции, смертности и предупреждению мертворождаемости в перинатальном периоде [7].

В связи с этим, проработка эффективных диагностических алгоритмов профилактики ретровирусной инфекции с применением новых технологий геномного анализа у молодняка крупного рогатого скота на ранних стадиях данного заболевания положено в основу наших исследований.

Цель работы – оценить количество (прототипическую нагрузку), генетический статус прототипов лейкоза крупного рогатого скота, выделенных от молодых животных в динамике выявления случаев перинатального заражения, и также корреляционные связи между некоторыми показателями/переменными (ПН, генетический статус, возрастная группа) на основе методов генодиагностики.

### Материалы и методы

Нами использован материал от крупного рогатого скота из обследуемого хозяйства в возрасте: 0,5 ч (в течение 30–40 мин. после рождения до приема молозива); от 15 до 45 сут (телята) – группа 1; не старше двух лет (нетели) – группа 2.

Методом радиальной иммунодиффузии (РИД) проанализированы пробы сыворотки крови, полученные от новорожденных телят до приема молозива. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) исследованы пробы крови от тех же телят в возрасте до двух месяцев. Данная группа животных после рождения находилась на вскармливании молоком от здоровых коров. Материал от тех же животных в возрасте до двух лет исследовали методами РИД и ПЦР. Испытывали пробы крови и сыворотки, полученные от телок в возрасте до двух лет из группы здоровых животных, сформированной по результатам исследований тех же животных в возрасте 1–2 мес. Таким образом,



максимальный интервал между обследованиями методом ПЦР достигал 2 года, т. е. работу проводили в отрицательном поле при наличии у данных животных отрицательного серологического статуса.

Всего методом ПЦР обследовано 2833 телят и 1597 нетелей.

Все этапы подготовки растворов и реагентов для проведения анализа, а также непосредственно процедуру проведения анализа выполняли в соответствии с инструкциями к соответствующим комплектам реагентов.

Экстракцию геномной ДНК проводили любым методом, позволяющим получить нуклеиновую кислоту (НК), пригодную для амплификации в ПЦР. С этой целью использовали коммерческие наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот: «Рибо-преп» (метод преципитации НК спиртом), «ДНК-сорб-В» (метод сорбции НК на носитель), (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). ДНК экстрагировали из 100 мкл цельной крови, на конечном этапе элюировали ДНК в 50 мкл буфера для элюции. Процедура выделения НК, при этом, сопровождалась отрицательным контролем экстракции (ОКО) при использовании в качестве пробы бидистиллированной воды или физиологического раствора в объеме 100 мкл.

Метод мультиплексной ПЦР-РВ с использованием разработки ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН – тест-системы «ВЛКРС мультиплекс» применяли для выявления ДНК провируса вируса лейкоза крупного рогатого скота [3, 5]. Количественный вариант ПЦР (кПЦР) – с использованием генно-инженерной конструкции – плазмиды *pBLVpol* с известной концентрацией (разработка ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

В качестве референсного использовали набор для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота – выявления антител против гликопротеидного антигена ВЛКРС в РИД в геле агара («БИОК», ФГУП Курская биофабрика, Россия) как «золотого стандарта» диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Серологическим методом исследовали пробы сывороток от новорожденных животных до приема молозива и молодых телок (нетелей).

Идентификацию целевых фрагментов для последующего определения первичной нукле-

отидной последовательности проводили методом ПЦР с электрофоретической детекцией в следующих вариантах: классической одно-раундовой ПЦР с получением ампликонов размером 438 п.о. (*pol*); «гнездовой» ("nested") ПЦР с получением ампликонов размером 341 п.о. (*env*).

Непосредственно секвенирование проводили на автоматическом анализаторе Beckman Coulter в соответствии с рекомендациями производителя. Первичные нуклеотидные последовательности, полученные в результате секвенирования, идентифицировали в базе данных GenBank с помощью сервиса BLAST ресурса NCBI. Для сравнения использовали референсные нуклеотидные последовательности локусов генов *pol*, *env* международных и российских изолятов ВЛКРС, представленные в базах данных (БД) GenBank, ВИЭВ.

Эволюционный анализ локусов генов (*pol* – приблизительно 400 нуклеотидов; *env* – приблизительно 300 нуклеотидов) выполняли с помощью программы Mega v.6. Дендрограммы построены дистанционными методами минимума эволюции (ME) [33], присоединения соседей (NJ) [35] с определением *r*-дистанций. Статистическую достоверность топологии деревьев оценивали с помощью метода бутстрэп-анализа при 1000 итерациях. Эволюционные дистанции рассчитывали с использованием моделей Кимуры [22], Таджима и Неи [38].

## Результаты и обсуждение

За 2013–2022 гг. обследован молодняк методом ПЦР по выявлению ДНК ВЛКРС у молодых животных (телок) в динамике. Частота случаев обнаружения ДНК ВЛКРС составила от 14,5 (2013 г.) до 0,4% (2021 г.); при этом показатели инфицированности были снижены в 36 раз, проходя через 0% (2020 г.) и находясь на уровне 0% в текущем периоде, что свидетельствует о положительной динамике развития ситуации (рис. 1).

При проведении эксперимента в хозяйстве отлучали новорожденных телят от инфицированных матерей сразу же после рождения (не допускали контакта с ними) и выпаивали молоком от здоровых особей. Ранее нами была показана опасность нативного молока, обладающего инфекционными свойствами [2].

При сравнении чувствительности методов ПЦР-РВ и РИД в 1373 случаях для телят 1-й



Рис. 1. Динамика выявления случаев ВЛКРС у телок  
 [Fig. 1. Dynamics of detection of cases of BLV infection in heifers]

группы животные распределились следующим образом: ПЦР<sup>+</sup>/РИД<sup>+</sup> – 1,09% (15/1373), ПЦР<sup>+</sup>/РИД<sup>-</sup> – 3,06% (42/1373), ПЦР<sup>-</sup>/РИД<sup>+</sup> – не выявлено, ПЦР<sup>-</sup>/РИД<sup>-</sup> – 95,85% (1316/1373). Во 2-й группе нетелей в 1364 случаях распределение животных представлено следующими вариантами: ПЦР<sup>+</sup>/РИД<sup>+</sup> – 0,88% (12/1364), ПЦР<sup>+</sup>/РИД<sup>-</sup> – 0,22% (3/1364), ПЦР<sup>-</sup>/РИД<sup>+</sup> – не выявлено (0/1364), ПЦР<sup>-</sup>/РИД<sup>-</sup> – 98,90% (1349/1364). При этом уровень вирусоносительства у телят составил 4,15% (ПЦР-РВ) и 1,09% (РИД); у нетелей – 1,1% (ПЦР-РВ) и 0,88% (РИД). В результате испытания диагностической чувствительности вышеуказанных методик обнаружено завышение таковой в пользу ПЦР-РВ – в 3,8 (1-я группа) и 1,25 (2-я группа) раз относительно РИД.

На данном этапе определены первичная нуклеотидная последовательность, количества провируса; проведен филогенетический анализ 22 образцов провирусной ДНК изолятов ВЛКРС; установлен их генетический статус. Среди данных исследуемых изолятов 14 образцов ДНК анализировали по локусу *pol* и 19 – по локусу *env* ВЛКРС (рис. 2, 3).

На основе анализа локуса гена *pol* выявлено, что общая тенденция по БД сохраняется – анализируемые российские изоляты (14/14, 100%) сгруппировались с изолятом M16017 (USA) – клад 1 (рис. 2, Б). Относительно международного штамма – M16017\_(USA) – эволюционные расстояния составляли, в среднем, 0,012. Диапазон эволюционных расстояний представлен следующим образом: минимальная дистанция

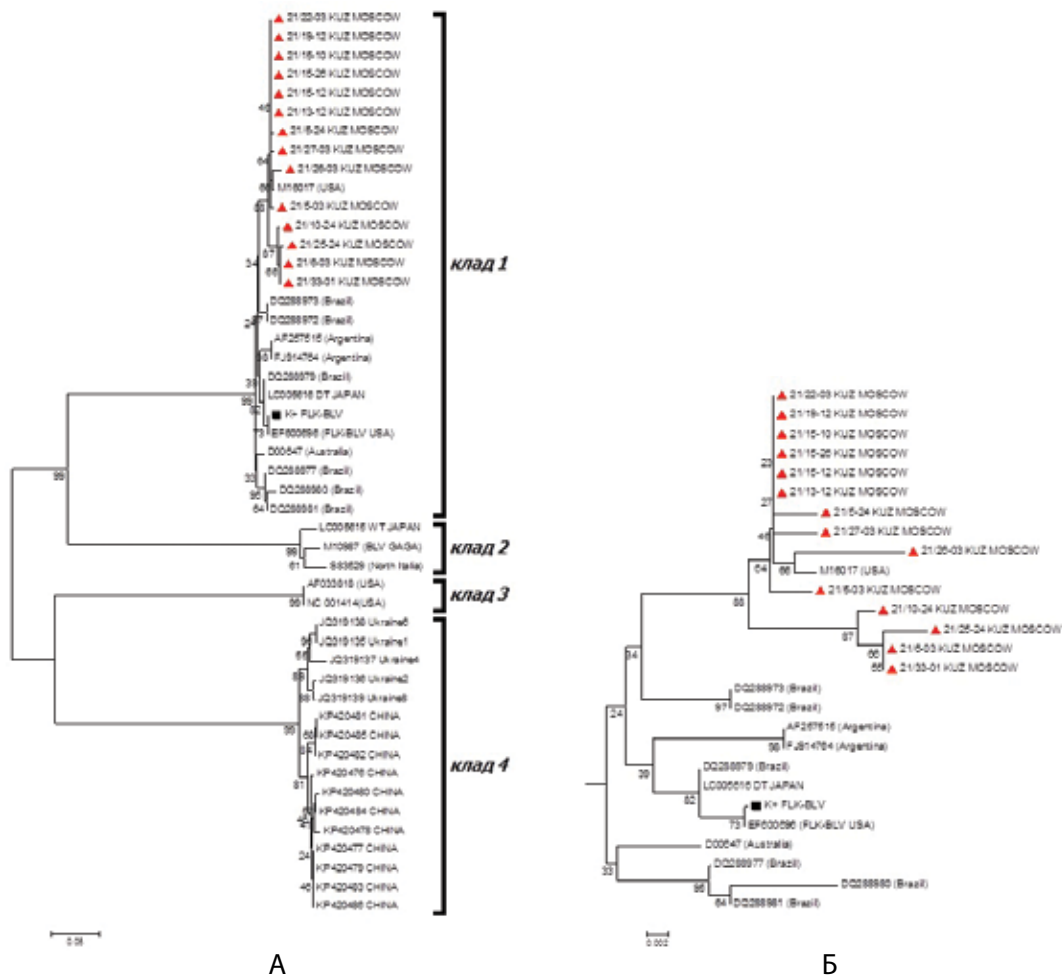
составила 0,007 (5/14, 35,7% изолятов), максимальная – 0,037 (2/14, 14,3% изолятов). Определены внутригрупповые средние эволюционные дистанции среди исследуемых изолятов и референс-последовательностей для клада 1 – проанализированная степень внутригрупповой дивергенции, в среднем, составила 0,018±0,002 (1,8±0,2%).

Филогенетический анализ на основе гена *env* позволил оценить гетерогенность исследуемой группы, включающей 19 изолятов ВЛКРС (рис. 3).

Для положительного контрольного образца К+ (штамм *FLK BLV*) подтверждено его отношение к G1.

У большинства анализируемых изолятов (13/19, 68,4%) обнаружена принадлежность к IV генетическому варианту ВЛКРС (рис. 3, А). Степень дивергенции внутри GIV между исследуемыми изолятами и международными референс штаммами, в среднем, составляет 1,8±0,5% (0,018±0,005) в диапазоне средних значений эволюционных расстояний от 0,008 до 0,038.

Часть изолятов (6/19, 31,6%) сгруппировалась с VII генотипом изучаемого патогена (рис. 3, Б). Данные исследуемые представители ВЛКРС идентичны между собой (0,000; 100%); находятся на минимальном расстоянии (0,006) от международных AY515274 *Chile*, AY515276 *Chile*, AY515280 *Chile* и российского HM563749 штаммов; максимально удалены от польского изолята EU262555 *Poland*. Степень дивергенции внутри GVII, в среднем, составила



**Рис. 2.** Филогенетическое сравнение участков гена *pol* провирусов ВЛКРС (дистанционный метод максимума правдоподобия, двухпараметрическая модель Кимуры, бутстреп-анализ при 1000 случайных выборках, массив данных – 48 последовательностей):

А – собственно древо с представителями провирусов ВЛКРС;

Б – ветвь (фрагмент) древа с представителями клада 1.

Красным символом  $\Delta$  обозначены исследуемые изоляты, черным  $\blacksquare$  – изолят K + FLK-BLV

[Fig. 2. Phylogenetic comparison of the *pol* gene regions of BLV proviruses.

The tree was constructed using the remote maximum likelihood method, using two-parameter Kimura model, bootstrap analysis with 1000 random samples, and the data array consists of 48 subsequences:

A – the tree itself with representatives of BLV proviruses;

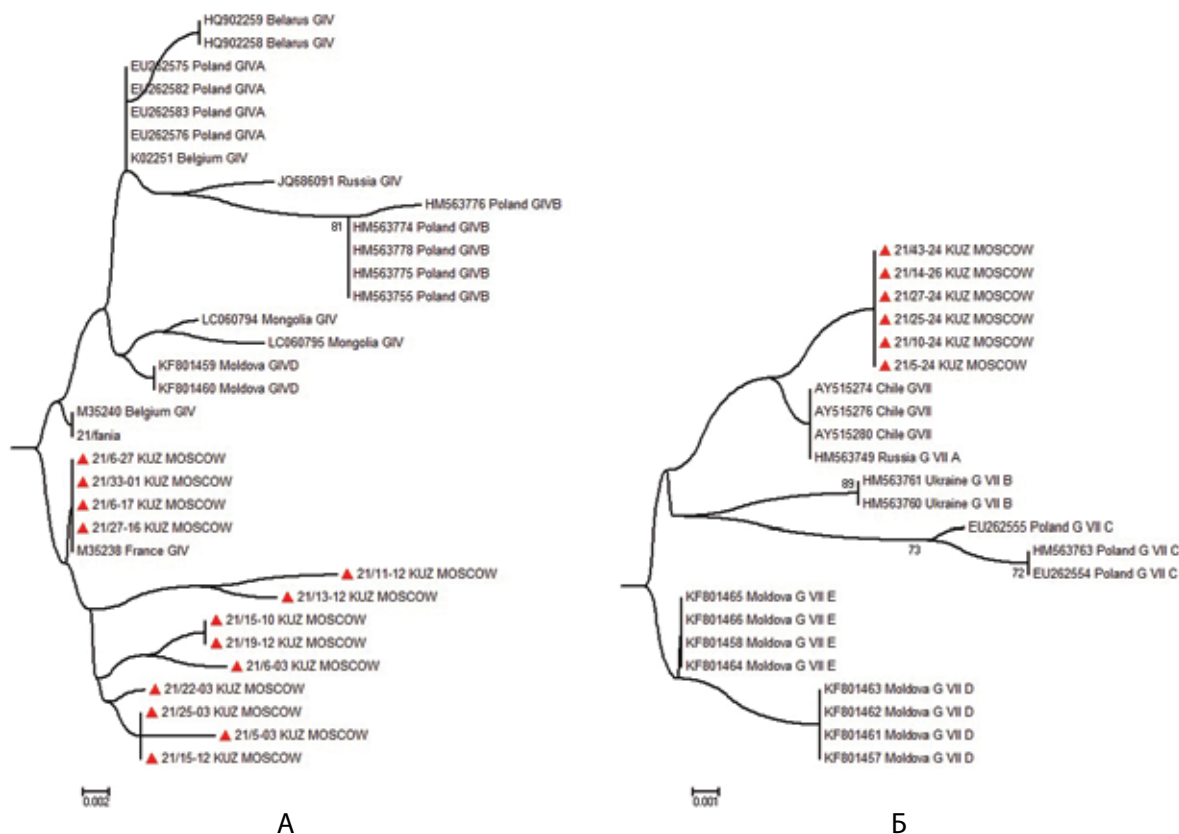
B – branch (fragment) of the tree with representatives of clade 1.

The red symbol  $\Delta$  denotes the studied isolates, the black symbol  $\blacksquare$  denotes the K + FLK-BLV isolate]

$1,1 \pm 0,5\%$  ( $0,011 \pm 0,005$ ) в диапазоне значений эволюционных расстояний от 0,006 до 0,022.

У 13 из обследованных животных проведена оценка ПН, диапазон которой составил  $2,02 \times 10^4$  –  $8,38 \times 10^6$  ГЭ/мл. По возрастным группам количество провируса распределилось следующим образом: у месячных телят (6/13, 46%) эти значения, в среднем, составили  $1,3 \times 10^6$  ГЭ/мл, у животных до 2-х лет (7/13, 54%) –  $3,83 \times 10^6$  ГЭ/мл.

При этом, в процессе анализа генетического статуса (всего исследовано 11 из 13 животных) у 6 телят выявлено наличие двух генотипов вируса *GVII* (3/11, 27,3% изолятов) и *GIV* (3/11, 27,3% изолятов) – гетерогенная популяция патогена; у 5 нетелей обнаружена гомогенная популяция вируса с наличием *IV*-го генетического варианта (5/11, 45,4% изолятов). Уровень ПН для животных с тем или иным генотипом ВЛКРС отличается приблизительно в 9 раз (88%) между собой и, в среднем,



**Рис. 3.** Филогенетическое сравнение участков гена *env* провирусов ВЛКРС: А – ветвь (фрагмент) дерева с представителями IV генотипа; Б – ветвь (фрагмент) дерева с представителями VII генотипа (дистанционный метод присоединения соседей, р-дистанций, бутстреп-анализ при 1000 случайных выборках). Красным символом обозначены исследуемые изоляты

**[Fig. 3.** Phylogenetic comparison of *env* gene regions in BLV Provirus: А – branch (fragment) of the tree with representatives of genotype IV; Б – branch (fragment) of the tree with representatives of genotype VII. The tree itself (data not provided) was constructed using remote method of joining neighbors, p-distances, bootstrap analysis with 1000 random samples. Investigated isolates are marked with a red symbol]

количество патогена составляет  $3,09 \times 10^6$  ГЭ/мл для *GIV* (8/11, 72,3% изолятов), что превышает таковое  $3,58 \times 10^5$  ГЭ/мл для *GVII* (3/11, 27,3% изолятов).

На сегодняшний день отмечается прогрессивная тенденция в обеспечении здоровья молочного поголовья крупного рогатого скота, которая заключается в переходе к профилактике инфекции на ранних ее стадиях до начала применения лечебных мероприятий. Несмотря на то, что данная ретровирусная инфекция – лейкоз КРС – не считается таким инфекционным заболеванием, которое вызывает аборт или неонатальную смертность, следует уделять особое внимание новорожденным телятам в течение первой недели жизни в молочных стадах как фактору раннего

распространения возбудителя среди восприимчивых животных [32].

В связи с этим, оценка частоты встречаемости ВЛКРС у инфицированных перинатально телят представляет собой актуальный вектор стратегии управления биологическими рисками в качестве превентивной/предупредительной меры. При проведении оздоровительных мероприятий сложность серологической диагностики инфекции у телят в период от рождения до 6 мес. заключается, во-первых, в наличии колостральных антител против ВЛКРС, которые теленок получает от матери в первые часы жизни, во-вторых, в слабо выраженном гуморальном иммунном ответе на инфицирование в перинатальный период или его полном отсутствии. Отсутствие иммуно-



глобулинов сыворотки крови телят приводит к быстрой контаминации биоматериала и образованию колоний микроорганизмов в геле агара, что препятствует правильному учету результатов реакции и снижает чувствительность метода РИД. Помимо этого, необходимость взятия материала у новорожденных телят до приема молозива создает дополнительные трудности в работе зооветеринарного персонала. Поэтому, применение прямого высокочувствительного молекулярно-биологического метода выявления генетического материала патогена, не зависящего от присутствия антител, по нашему мнению, позволяет эффективно решать проблему диагностики ВЛКРС-инфекции у телят в раннем возрасте.

Нативное молозиво и молоко, которые обладают инфекционными свойствами [2, 4], представляют потенциальную опасность и, соответственно, являются фактором передачи возбудителя от матери своему потомству. С другой стороны, такая же ситуация продемонстрирована в случае близкородственных Т-лимфотропного вируса человека и вируса иммунодефицита человека, где риск перинатальной трансмиссии повышается при наличии фактора передачи – молока, вместе с такими показателями как ПН и продолжительность лактации [23, 27]. Таким образом, в своей работе выпаивание обследуемых телят проводили молоком от здоровых матерей. В данной ситуации при исключении алиментарного пути передачи возбудителя случаи заражения молодых животных происходили гематогенным (с нарушением плацентарного барьера) и контактным (посредством инфицированных амниотической жидкости или крови) путями.

Наша работа была сосредоточена на следующих аспектах молекулярного анализа: обнаружение провирусной ДНК ВЛКРС и ее ассоциации с различными факторами в полевых условиях; оценка провирусной нагрузки в образцах ДНК; филогенетический анализ выявленных изолятов ВЛКРС.

Выявляемая с помощью геномного анализа частота перинатального заражения молодняка трансплацентарным/контактным путями в животноводческом хозяйстве снизилась до минимального уровня 0,4% в 2021 г. и отсутствует (0%) на сегодняшний день.

Также (как и ранее [4]), нами подтверждена относительная диагностическая чувстви-

тельность молекулярно-генетической диагностики с использованием мультиплексной ПЦР-РВ. Частота встречаемости ВЛКРС у молодняка находится на уровне не ниже по сравнению с таковой серологического метода и отличается в 3,8 (1-я группа) и 1,25 (2-я группа) раз в сторону завышения. Это свидетельствует в пользу эффективности методики ПЦР и подтверждается снижением случаев выявления ретровирусной инфекции у молодых животных в динамике.

Известно, что оценка количества провирусной ДНК ВЛКРС, интегрированной в геномной ДНК клеток-хозяев, имеет прогностическое значение для развития лейкоза крупного рогатого скота [26, 36]; потенциально удаление крупного рогатого скота с высокой ПН успешно снижает распространенность и заболеваемость ВЛКРС [31]. Напротив, животные с низкой ПН, по-видимому, имеют, соответственно, меньшую заражающую дозу для передачи ВЛКРС [21, 29]. Следует отметить, что ПН в индивидуальном организме животного не является стабильной и носит колебательный характер при патогенезе [20, 37].

Нами была начата серия экспериментов по выявлению возможной корреляции между некоторыми показателями/характеристиками изучаемого инфекционного процесса. ПН является прогностическим маркером, что показывает, как может снизиться иммунный статус у животного во времени. Так, при сравнении количеств провируса у различных возрастных категорий крупного рогатого скота отмечали трехкратное завышение ПН у нетелей в возрасте до двух лет (2-я группа) относительно таковой у месячных телят (1-я группа). Телята со слабым гуморальным иммунным ответом на инфицирование продолжают быть защищенными на фоне колострального/приобретенного иммунитета (период элиминации материнских антител приблизительно до 6–8 мес.), т. е. незрелая иммунная система не в состоянии справиться с относительно высокими концентрациями вируса. У молодых особей чаще встречаются дефициты гуморального иммунитета в результате недостаточной зрелости иммунной системы в период новорожденности и до 2–3 недели жизни. Другое возможное объяснение относительно высокой концентрации ВЛКРС при вертикальном пути заражения – это передача штаммов вируса, которые мутировали,

чтобы ускользнуть от действия иммунной системы матери. Вирус, адаптировавшийся к иммунной системе матери, несет меньше антигенных детерминант, которые способны образовывать комплексы с молекулами главного комплекса гистосовместимости и распознаваться его иммунной системой [14, 16].

Система естественной резистентности, в том числе нормализация механизмов иммунной реактивности, изменяется в соответствии с общим физиологическим состоянием организма животных и с возрастом.

С другой стороны, ПН у коров в возрасте от 2 до 6 лет, у которых количественные значения были условно высокими (порядок ПН более  $10^5$  ГЭ/мл) и, в среднем, составляли  $1,5 \times 10^8$  ГЭ/мл (не опубликованные данные), превышали таковые у телят приблизительно в  $10^2$  раз, нетелей до двух лет – приблизительно в 40 раз. Это согласуется с литературными данными о том, что у повторнородящего молочного скота уровень ПН более высокий, чем у не телившихся особей [30]. Высокие показатели ПН, как правило, приходится на период, когда телки размножаются, телятся и входят в дойное стадо – это время интенсивного человеческого вмешательства, присутствие стрессовых ситуаций, более тесного физического контакта между взрослыми особями, что возможно оказывает влияние на иммунный профиль животных. У взрослых и старых животных снижение иммунологической реактивности может происходить и за счет аутоиммунных процессов.

Филогенетический анализ показал наличие двух генотипов среди анализируемых животных: *GVII* и *GIV*. При этом, количество провируса варьировало между ними с разницей в 9 раз (88%) с завышением в сторону *GIV* варианта ВЛКРС. Интересно, что в 1-й группе, где выявлена гетерогенная популяция ВЛКРС, ситуация повторилась. Среди телят разница с завышением ПН в сторону *GIV* варианта составила 6,3 (84%) раза. Учитывая малочисленную выборку животных, планируется продолжать исследования в данном направлении с целью проработки эффективных алгоритмов с помощью соответствующих диагностических инструментов в рамках программ по контролю лейкозной инфекции у крупного рогатого скота.

## Заключение

Обнаружена положительная динамика выявления случаев перинатальной инфекции у молодняка за обозначенный период наблюдения в сторону снижения в 36 раз с отсутствием диагностических признаков трансмиссии ВЛКРС у молодых животных на данном этапе наблюдения.

Обоснована необходимость применения метода ПЦР-РВ как эффективного инструмента профилактических мероприятий при ретровирусной инфекции, начиная с самого раннего возраста телят от 0 до 20 сут (оптимально при первой вакцинации с целью наименьшего травмирования животного), что позволяет своевременно удалять инфицированных телят и формировать группу здоровых животных с последующей заменой ими маточного поголовья.

Проведено совершенствование молекулярной диагностики на основе геномного анализа в схеме комплексных противоэпизоотических/оздоровительных мероприятий с целью предотвращения распространения данной ретровирусной инфекции на ранних сроках.

Показано, что на основе филогенетического анализа локусов провирусных генов *pol*, *env* сохраняется общая тенденция по собственной БД ВИЭВ нуклеотидных последовательностей ВЛКРС: по локусу *pol* анализируемые российские изоляты сгруппировались с кладом 1 (14/14, 100% изолятов); по локусу *env* при выявлении двух генотипов вируса – *GVII* (6/19, 31,6% изолятов) и *GIV* (13/19, 68,4% изолятов) – доминирует *GIV* генетический вариант.

Начаты исследования по выявлению корреляционных связей между некоторыми характеристиками инфекционного процесса: количеством и генетическим вариантом ВЛКРС, а также возрастом крупного рогатого скота.

Установлено, что уровень инфицирования выше у нетелей, чем у телят; у повторнородящих молочных коров уровень ПН выше, чем у не рожавших особей; количество провируса завышено в крови животных с генотипом *GIV* относительно таковых с генетическим вариантом *GVII* ВЛКРС.

## Список источников

1. Валихов А. Ф., Бурба Л. Г., Шишков В. П. Иммунологическое и вирусологическое исследование мо-

- лока, крови и спермы крупного рогатого скота, инфицированного онкорнавирусом // Труды ВИЭВ. 1983. № 59. С. 71-72.
2. Гулюкин М. И., Козырева Н. Г., Иванова Л. А., Степанова Т. В., Клименко А. И., Коваленко А. В., Дробин Ю. Д., Василенко В. Н. Межвидовая передача вируса лейкоза крупного рогатого скота в эксперименте // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 5, № 60. С. 32-37.
  3. Козырева Н. Г. Применение методики мультиплексной ПЦР-РВ в молекулярной диагностике ВЛКРС при перинатальном инфицировании // Международный вестник ветеринарии. 2018. № 4. С. 28-32.
  4. Козырева Н. Г., Абашии И. Ю., Иванова Л. А. Эффективность применения генодиагностического теста в оценке перинатального заражения у молодняка при профилактике лейкоза крупного рогатого скота с целью повышения качества молочной продукции // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2020. Т. 4, № 36. С. 450-455. <https://doi.org/10.36871/vet.san.hyg.ecol.202004007>.
  5. Козырева Н. Г., Иванова Л. А., Степанова Т. В., Гулюкин М. И. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции. Патент РФ 2694617, 2018.
  6. Колобов А. В. Место ретровирусов в перинатальной патологии (обзор литературы) // Журнал инфектологии. 2012. Т. 4, № 4. С. 13-19.
  7. Садовникова В. Н. Особенности заболеваемости ВИЧ-инфекцией у детей и меры по профилактике перинатальной трансмиссии ВИЧ-инфекции // Педиатрия. 2010. Т. 89. № 1. С. 14-20.
  8. Agresti A., Ponti W., Rocchi M., Meneveri R., Marozzi A., Cavalleri D., Peri E., Poli G., Ginelli E. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Amer. J. Vet. Res.* 1993; 54: 373-378.
  9. Brym P., Ruśc A., Kamiński S. Evaluation of reference genes for qRT-PCR gene expression studies in whole blood samples from healthy and leukemia-virus infected cattle. *Vet. Immunol. Immunop.* 2013; 153: 302-307. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.03.004>.
  10. Buehring G. C., Choi K. Y., Jensen H. M. Bovine leukemia virus in human breast tissues. *Breast Cancer Res.* 2001; 3: A14. <https://doi.org/10.1186/bcr338>.
  11. Buehring G. C., Kramme P. M., Schultz R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. *Lab. Invest.* 1994; 71: 359-365.
  12. Chakraborty J., Clark S., Okonta H., Duggan J. A small animal model for mother-to-fetus transmission of ts1, a murine retrovirus. *Viral Immunol.* 2003; 16 (2): 191-201. <https://doi.org/10.1089/088282403322017929>.
  13. Dimmock C. K., Chung Y. S., MacKenzie A. R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Austr. Vet. J.* 1991; 68: 230-233. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1991.tb03213.x>
  14. Essajee S. M., Pollack H., Rochford G., Oransky I., Krasinski K., Borkowsky W. Early changes in quasispecies repertoire in HIV-infected infants: correlation with disease progression. *AIDS Res. Human Retroviruses.* 2000; 16 (18): 1949-1957. <https://doi.org/10.1089/088922200750054675>.
  15. Ferrer J. F., Piper C. E. Role colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. *Cancer Res.* 1981; 41: 4906-4909.
  16. Goulder P. J., Brander C., Tang Y. et al. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature.* 2001; 412: 334-338. <https://doi.org/10.1038/35085576>.
  17. Gutiérrez G., Alvarez I., Merlini R., Rondelli F., Trono K. Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC Vet. Res.* 2014; 10: 82. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-82>.
  18. Gutiérrez G., Lomonaco M., Alvarez I., Fernandez F., Trono K. Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. *Vet Microbiol.* 2015; 177 (3-4): 366-369. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.001>.
  19. Hron T., Elleder D., Gifford R. J. Deltaretroviruses have circulated since at least the Paleogene and infected a broad range of mammalian species. *Retrovirology.* 2019; 16: 33. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0495-9>.
  20. Hutchinson H. C. Transmission and Progression of Bovine Leukemia Virus. Michigan State University, 2020.
  21. Juliarena A. M., Barrios C. N., Ceriani M., Esteban E. Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J. Dairy Sci.* 2016; 99 (6): 4586-4589. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10480>.
  22. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. of Molecular Evolution.* 1980; 16: 111-120.
  23. Kinoshita K., Hino S., Amagaski T. et al. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. *Gann.* 1984; 75 (2): 103-105.
  24. Lassauzet M. L., Johnson W. O., Thurmond M. C., Stevens F. Protection of colostrum antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Can. J. Vet. Res.* 1989; 53: 424-430.
  25. Lassauzet M. L., Thurmond M. C., Johnson W. O., Holmberg C. A. Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus

- in calves on a California dairy. *Can. J. Vet. Res.* 1991; 55 (3): 264-268.
26. Lo C.-W., Borjigin L., Saito S., Fukunaga K., Saitou E., Okazaki K., Mizutani T., Wada S., Takeshima S.-N., Aida Y. BoLADRB3 Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load. *Viruses.* 2020; 12 (3): 352. <https://doi.org/10.3390/v12030352>.
  27. Martin-Latil S., Gnadig N. F., Mallet A. et al. Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood.* 2012; 120 (3): 572-580. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374637>.
  28. Mekata H., Sekiguchi S., Konnai S., Kirino Y., Honkawa K., Nonaka N., Horii Y., Norimine J. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. *Vet. Rec.* 2014; 176 (10): 254. <https://doi.org/10.1136/vr.102464>.
  29. Mekata H., Yamamoto M., Kirino Y., Sekiguchi S., Konnai S., Horii Y., Norimine J. New hematological key for bovine leukemia virus-infected Japanese Black cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 2018; 80 (2): 316-319. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0455>.
  30. Ohno A., Takeshima Sh.-N., Matsumoto Y., Aida Y. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Res.* 2015; 210: 283-90. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.020>.
  31. Ruggiero V., Norby B., Benitez O. et al. Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *J. Dairy Sci.* 2019; 102: 9165-9175. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16186>.
  32. Ruiz V., Porta N. G., Lomónaco M., Trono K., Alvarez I. Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves. Risk Factors and Control Measures. *Front. Vet. Sci.* 2018; 5: 267. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00267>.
  33. Rzhetsky A., Nei M. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 1993; 10 (5): 1073-1095.
  34. Sajiki Y., Konnai S., Nishimori A. et al. Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. *J. Vet. Med. Sci.* 2017; 79: 2036-2039. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0391>.
  35. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4 (4): 406-425.
  36. Somura Y., Sugiyama E., Fujikawa H., Murakami K. Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Arch. Virol.* 2014; 159: 2693-2697.
  37. Sultanov A., Rola-Luszczak M., Mamanova S. et al. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan. *Pathogens.* 2022; 11: 180. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020180>.
  38. Tajima F., Nei M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. and Evol.* 1984; 1 (3): 269-285.
  39. Van der Maaten M. J., Miller J. M., Schmerr M. J. F. Effect of colostral antibody on of bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *Amer. J. Vet. Res.* 1981; 42 (6): 1498-1500.

Статья поступила в редакцию 29.04.2022; принята к публикации 15.06.2022

Об авторах:

**Козырева Наталия Геннадиевна**, ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (109428, Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1), Москва, Россия, кандидат биологических наук, ORCID ID: 0000-0003-4318-8173, [nk07-73@mail.ru](mailto:nk07-73@mail.ru)

**Абашин Илья Юрьевич**, ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (109428, Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1), Москва, Россия, аспирант, ORCID ID: 0000-0002-3623-1623

**Иванова Людмила Александровна**, ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (109428, Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1), Москва, Россия, кандидат биологических наук

Вклад соавторов:

**Козырева Наталия Геннадиевна** – получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор исследований по проблеме, написание текста рукописи.

**Абашин Илья Юрьевич** – работа с литературными источниками по теме статьи.

**Иванова Людмила Александровна** – разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных.

*Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.*



## References

1. Valikhov A. F., Burba L. G., Shishkov V. P. Immunology research and virology testing of milk, blood and semen of cattle infected with oncornavirus. *Trudy Vsesoyuznogo instituta eksperimental'noy veterinarii = Proceedings of the All-Union Institute of Experimental Veterinary Medicine*. 1983; 59: 71-72. (In Russ.)
2. Gulyukin M. I., Kozyreva N. G., Ivanova L. A., Stepanova T. V., Klimenko A. I., Kovalenko A. V., Drobin Yu. D., Vasilenko V. N. Cross-species bovine leukemia virus transmission in experiment. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2015; 5 (60): 32-37. (In Russ.)
3. Kozyreva N. G. Application of a multiplex RT-PCR technique in molecular diagnostics of the BLV during perinatal infection. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2018; 4: 28-32. (In Russ.)
4. Kozyreva N. G., Abashin I. Yu., Ivanova L. A. Effectiveness of the gene diagnostics test in evaluating perinatal infection in young animals in the prevention of bovine leukemia to improve the quality of dairy products. *Russian Journal of Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology*. 2020; 4 (36): 450-455. (In Russ.) <https://doi.org/10.36871/vet.san.hyg.ecol.202004007>.
5. Kozyreva N. G., Ivanova L. A., Stepanova T. V., Gulyukin M. I. A polymerase chain reaction method for diagnosing bovine leukemia. RF Patent No. 2694617, 2018.
6. Kolobov A. V. Place of retroviruses in perinatal pathology (literature review). *Journal of Infectiology*. 2012; 4 (4): 13-19. (In Russ.)
7. Sadovnikova V. N. Incidence rate of the HIV infection in children and measures to prevent perinatal HIV transmission. *Pediatriya = Pediatrics*. 2010; 89 (1):14-20.
8. Buehring G.C., Choi K.Y., Jensen H.M. Bovine leukemia virus in human breast tissues. *Breast Cancer Res*. 2001; 3: A14. <https://doi.org/10.1186/bcr338>.
9. Buehring G.C., Kramme P.M., Schultz R.D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. *Lab. Invest*. 1994; 71: 359-365.
10. Chakraborty J., Clark S., Okonta H., Duggan J. A small animal model for mother-to-fetus transmission of ts1, a murine retrovirus. *Viral Immunol*. 2003; 16(2): 191-201. <https://doi.org/10.1089/088282403322017929>.
11. Essajee S.M., Pollack H., Rochford G. Oransky I., Krasinski K., Borkowsky W. Early changes in quasispecies repertoire in HIV-infected infants: correlation with disease progression. *AIDS Res. Human Retroviruses*. 2000; 16(18): 1949-1957. <https://doi.org/10.1089/088922200750054675>.
12. Goulder P.J., Brander C., Tang Y., Tremblay C., Colbert R.A., Addo M.M., Rosenberg E.S., Nguyen T., Allen R., Trocha A., Altfeld M., He S., Bunce M., Funkhouser R., Pelton S. I., Burchett S. K., McIntosh K., Korber B. T., Walker B. D. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature*. 2001; 412: 334-338. <https://doi.org/10.1038/35085576>.
13. Hron T., Elleder D., Gifford R.J. Deltaretroviruses have circulated since at least the Paleogene and infected a broad range of mammalian species. *Retrovirology*. 2019; 16: 33. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0495-9>.
14. Kinoshita K., Hino S., Amagaski T., Ikeda S., Yamada Y., Suzuyama J., Momita S., Toriya K., Kamihira S., Ichimaru M. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. *Gann* 1984; 75(2): 103-105.
15. Li H. C., Biggar R. J., Miley W. J., Maloney E. M., Cranston B., Hanchard B., Hisada M. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004; 190: 1275-1278. <https://doi.org/10.1086/423941>.
16. Martin-Latil S., Gnadig N. F., Mallet A., Desdoutis M., Guivel-Benhassine F., Jeannin P. Prevost M.-Ch., Schwartz O., Gessain A., Ozden S., Ceccaldi P.-E. Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood*. 2012; 120(3): 572-580. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374637>.
17. Milligan C., Overbaugh J. The role of cell-associated virus in mother-to-child HIV transmission. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014; 210(3): 631-640. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu344>.
18. Miotti P. G., Taha T. E., Kumwenda N. I., Broadhead R., Mtimavalye L. A., Hoeven L. V., Chipangwi J. D., Liomba G., Biggar R. J. HIV transmission through breastfeeding: a study in Malawi. *JAMA*. 1999; 282: 744-749. <https://doi.org/10.1001/jama.282.8.744>.
19. Ohno A., Takeshima Sh.-n., Matsumoto Y., Aida Y. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Res*. 2015; 210:283-90. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.020>.
20. Ruiz V., Porta N.G., Lomónaco M., Trono K., Alvarez I. Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves. Risk Factors and Control Measures. *Front. Vet. Sci*. 2018; 5: 267. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00267>.
21. Juliarena A. M., Barrios C. N., Ceriani M., Esteban E. Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J. Dairy Sci*. 2016; 99 (6): 4586-4589. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10480>.
22. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. of Molecular Evolution*. 1980; 16: 111-120.

23. Kinoshita K., Hino S., Amagaski T. et al. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. *Gann*. 1984; 75 (2): 103-105.
24. Lassauzet M. L., Johnson W. O., Thurmond M. C., Stevens F. Protection of colostrum antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Can. J. Vet. Res.* 1989; 53: 424-430.
25. Lassauzet M. L., Thurmond M. C., Johnson W. O., Holmberg C. A. Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a California dairy. *Can. J. Vet. Res.* 1991; 55 (3): 264-268.
26. Lo C.-W., Borjigin L., Saito S., Fukunaga K., Saitou E., Okazaki K., Mizutani T., Wada S., Takeshima S.-N., Aida Y. BoLADRB3 Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load. *Viruses*. 2020; 12 (3): 352. <https://doi.org/10.3390/v12030352>.
27. Martin-Latil S., Gnadig N. F., Mallet A. et al. Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood*. 2012; 120 (3): 572-580. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374637>.
28. Mekata H., Sekiguchi S., Konnai S., Kirino Y., Honkawa K., Nonaka N., Horii Y., Norimine J. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. *Vet. Rec.* 2014; 176 (10): 254. <https://doi.org/10.1136/vr.102464>.
29. Mekata H., Yamamoto M., Kirino Y., Sekiguchi S., Konnai S., Horii Y., Norimine J. New hematological key for bovine leukemia virus-infected Japanese Black cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 2018; 80 (2): 316-319. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0455>.
30. Ohno A., Takeshima Sh.-N., Matsumoto Y., Aida Y. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Res.* 2015; 210: 283-90. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.020>.
31. Ruggiero V., Norby B., Benitez O, et al. Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *J. Dairy Sci.* 2019; 102: 9165-9175. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16186>.
32. Ruiz V., Porta N. G., Lomónaco M., Trono K., Alvarez I. Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves. Risk Factors and Control Measures. *Front. Vet. Sci.* 2018; 5: 267. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00267>.
33. Rzhetsky A., Nei M. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 1993; 10 (5): 1073-1095.
34. Sajiki Y., Konnai S., Nishimori A. et al. Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. *J. Vet. Med. Sci.* 2017; 79: 2036-2039. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0391>.
35. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4 (4): 406-425.
36. Somura Y., Sugiyama E., Fujikawa H., Murakami K. Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Arch. Virol.* 2014; 159: 2693-2697.
37. Sultanov A., Rola-Łuszczak M., Mamanova S. et al. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan. *Pathogens*. 2022; 11: 180. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020180>.
38. Tajima F., Nei M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. and Evol.* 1984; 1 (3): 269-285.
39. Van der Maaten M. J., Miller J. M., Scherr M. J. F. Effect of colostrum antibody on of bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *Amer. J. Vet. Res.* 1981; 42 (6): 1498-1500.

The article was submitted 29.04.2022; accepted for publication 15.06.2022

*About the authors:*

**Kozyreva Natalia G.**, FSC VIEV (24 Ryazansky prospect, Bldg. 1, Moscow, 109428), Moscow, Russia, Cand. Sc. Biol., ORCID ID: 0000-0003-4318-8173, [nk07-73@mail.ru](mailto:nk07-73@mail.ru)

**Abashin Iliya Yu.**, FSC VIEV (24 Ryazansky prospect, Bldg. 1, Moscow, 109428), Moscow, Russia, Postgraduate Student, ORCID ID: 0000-0002-3623-1623

**Ivanova Lyudmila A.**, FSC VIEV (24 Ryazansky prospect, Bldg. 1, Moscow, 109428), Moscow, Russia, Cand. Sc. Biol.

*Contribution of co-authors:*

**Kozyreva Natalia G.** – obtaining data for analysis, analyzing the data obtained, reviewing research on the problem, writing the text of the manuscript.

**Abashin Iliya Yu.** – work with literary sources on the topic of the article.

**Ivanova Lyudmila A.** – research design development, data acquisition for analysis, data analysis.

*All authors have read and approved the final manuscript.*