

## 2. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ ТА МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 619:616.98:578.828:578.2'21:636.22/.28

DOI 10.36016/VM-2023-109-2

### БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ОСНОВНИХ ГЕНІВ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ (*GAG, ENV, POL*)

**Рудова Н. Г., Солодянкін О. С.**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: rudovanatawa@ukr.net

У статті представлено результати біоінформатичного аналізу послідовностей основних генів вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (*gag, env, pol*). Отримано оновлені дані щодо філогенетичних зв'язків збудника. Встановлено існування щонайменше двох генетичних груп BIV, які мають спільне походження від єдиного пращура. Крім того, відзначено складність проведення повноцінного та всебічного аналізу послідовностей для повного розуміння еволюції та філогенетичних зв'язків вірусу. Визначено, що відсутність єдиного методологічного підходу щодо секвенування BIV у різних наукових спільнотах світу ускладнює аналізування та інтерпретацію отриманих даних. Запропоновано застосування технологій повногеномного секвенування для вирішення цього питання

**Ключові слова:** філогенетичні зв'язки, *Lentivirus*, *Retroviridae*

Вірус імунодефіциту великої рогатої худоби (Bovine immunodeficiency virus, BIV), що належить до роду *Lentivirus* сімейства *Retroviridae*, спричиняє прогресуюче та стійке інфікування великої рогатої худоби [1]. Геном вірусу складається з двох копій одноланцюгової позитивної РНК, яка може інтегруватися в клітинну ДНК. За генетичною та антигенною структурою BIV споріднений з вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) та вірусом імунодефіциту мавп, тому його використовують як тваринну модель для вивчення інших ретровірусів [2]. BIV уперше був виділений у 1969 році від тільної молочної корови з ознаками виснаження, персистуючого лімфоцитозу, лімфаденопатії та ураженням центральної нервової системи за відсутності інфікування вірусом лейкозу ВРХ [3]. Вірус імунодефіциту ВРХ розповсюджений в усьому світі, а серопозитивну молочну та м'ясну худобу реєструють в багатьох країнах, включаючи США, Канаду, Іран, Німеччину, Францію, Швейцарію, Австралію, Велику Британію, Японію, Італію, Корею, Мексику, Індію та Бразилію [4].

У тварин, інфікованих BIV, не було виявлено ознак важкого прояву хвороби. Але, ураховуючи подібність цього вірусу до інших патогенних лентівірусів, є припущення, що BIV також здатен спричиняти клінічний прояв в організмі великої рогатої худоби, однак це не відбувається через високу швидкість обертів виробничих тварин та пов'язаний з цим короткий термін життя тварини. Тому, цілком можливо, що BIV-інфекція може бути пов'язана зі зниженням надою молока, втратою ваги в інфікованих тварин і сприяти вторинним інфекціям в їхньому організмі [5].

Геномна мінливість є важливою особливістю РНК-вірусів, зокрема і вірусу імунодефіциту ВРХ, який навіть в межах одного вірусного ізоляту демонструє значні геномні варіації [6].

В структурі BIV виявлено три основні рамки зчитування (ORF), що кодують гени *gag, env i pol* [1, 4, 7].

Для молекулярно-генетичних досліджень найбільш придатними та інформативними є гени *env i pol* [8]. Ген *env*, який зазнає найбільшого селективного тиску у геномі ретровірусів, використовують для досліджень молекулярної епідеміології збудника. Ген *pol*, який є більш консервативним, використовують для створення філогенетичних дерев і встановлення еволюційних зв'язків ізолятів [4].

У доступній нам літературі є публікації щодо філогенетичного аналізу тих чи інших генів, проведеного науковцями з метою встановлення філогенетичних зв'язків збудника, що виділений в їхніх країнах. Ці дані демонструють більш ніж 98–99 % нуклеотидної гомології зі штамом R-29, що є референтним [8–11].

**Мета досліджень.** Провести біоінформатичний аналіз наявних у міжнародній базі даних GenBank нуклеотидних послідовностей основних генів BIV (*gag*, *env*, *pol*) та отримати оновлені дані щодо філогенетичних зв'язків збудника.

**Матеріали та методи.** Для формування баз даних нуклеотидних послідовностей основних генів вірусу імунодефіциту ВРХ проводили відповідний інформаційний пошук у міжнародній базі даних GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Отримані послідовності розподіляли до відповідних підбаз з метою подальшого проведення філогенетичного аналізу.

Множинне вирівнювання обраних послідовностей проводили за допомогою програми BioEdit v. 7.0.0, модулю ClustaW [12].

Біоінформатичний аналіз отриманих послідовностей проводили з використанням алгоритму BLAST-online інтернет-ресурсу GenBank [13]. Для проведення філогенетичного аналізу використовували програму MEGA 11 [14]. Філогенетичний аналіз секвенованих послідовностей основних генів BIV та побудову дендрограм проводили за методом найближчих сусідів (Neighbour joining, bootstrap 1000, модель попарних дистанцій). Аналіз філогенетичного дерева здійснювали шляхом візуальної оцінки його топології та попарних відстаней між компонентами вибірки.

**Результати досліджень.** На основі інформації, представленої у міжнародній базі даних GenBank, було сформовано базу даних повних геномів та частково секвенованих послідовностей основних генів *gag*, *env* і *pol* ізолятів вірусу імунодефіциту ВРХ, виявленого у різних географічних регіонах світу. Послідовності були розподілені на окремі підбази, кожна з яких містила інформацію тільки про гени *gag*, *env* і *pol*. Усі послідовності були отримані у форматах FASTA (\*.fasta) або GenBank (\*.gb).

Сформована база даних містила 52 послідовності геномних РНК BIV довжиною від 170 до 8 482 пар нуклеотидів (п. н.). З них: 2 повногеномні послідовності вірусу довжиною 8 482 п. н., 8 послідовностей гена *gag* довжиною від 171 до 393 п. н., 16 послідовностей гена *env* довжиною від 170 до 1 857 п. н., 22 послідовності гена *pol* довжиною від 176 до 451 п. н.

Після множинного вирівнювання послідовностей кожного з генів проводили пошук консервативних регіонів і варіабельних ділянок з метою їх аналізування.

Результати множинного вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів *gag* та *env* демонструють відсутність єдиного методологічного підходу щодо секвенування цих генів, що унеможлиблює їх аналізування за допомогою стандартних біоінформатичних пакетів.

Множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *pol* демонструвало відносну однорідність вибірки, що дозволило нам сформувати матрицю для аналізу в програмному пакеті MEGA 11. За результатами множинного вирівнювання було встановлено, що максимальне перекриття вирівняних ділянок становило 176 п. н.

Після множинного вирівнювання отриманих послідовностей були побудовані філогенетичні дерева за алгоритмом найближчого сусіда для кожного з генів BIV.

Аналіз філодендрограми, побудованої для гена *gag* (рис. 1), свідчить про те, що існує щонайменше дві генетичні гілки BIV, які походять від спільного пращура та у певний час відокремились одна від одної.

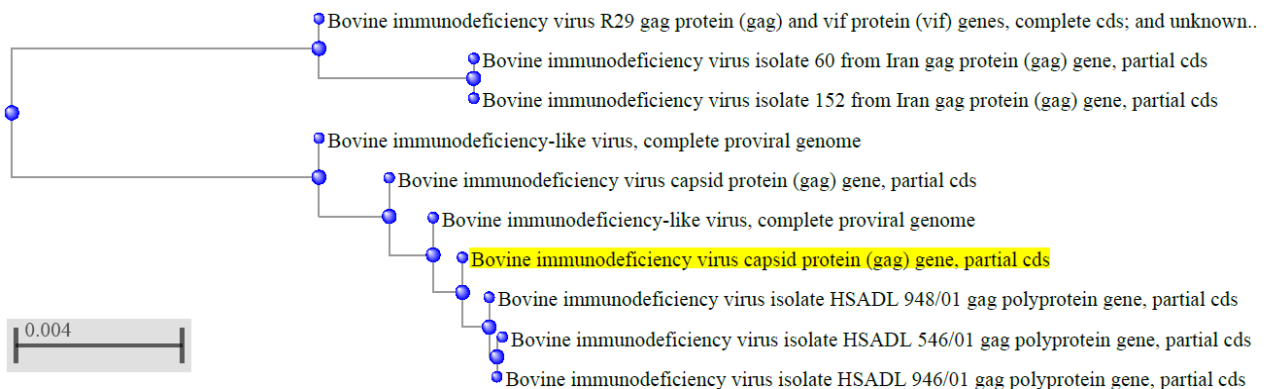


Рис. 1. Філогенетичний аналіз ізолятів BIV на основі послідовностей гена *gag*.

За результатами філогенетичного аналізу гена *env* також встановлено існування двох генетичних гілок BIV (рис. 2).

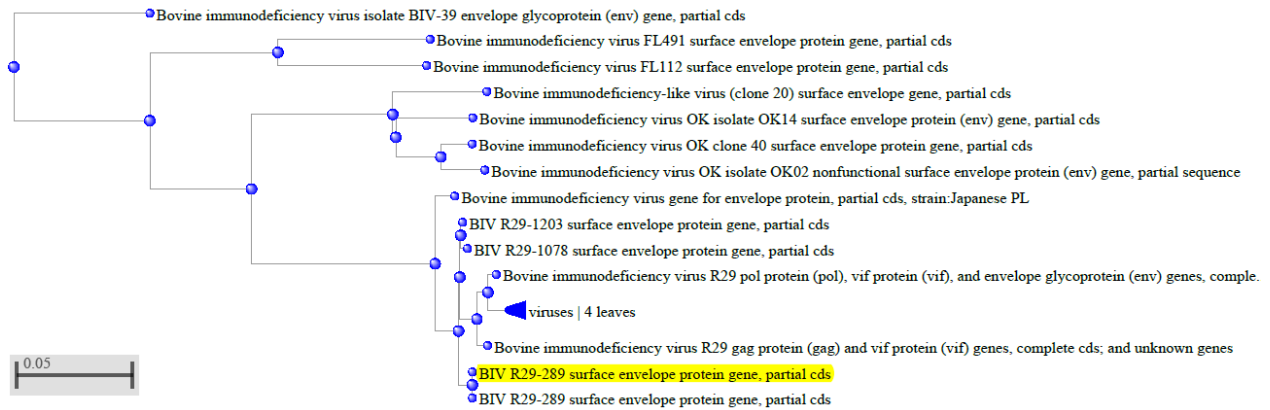


Рис. 2. Філогенетичний аналіз ізолятів BIV на основі послідовностей гена *env*.

Існування двох геногруп було також підтверджено під час побудови дендрограми для гена *pol* (рис. 3).

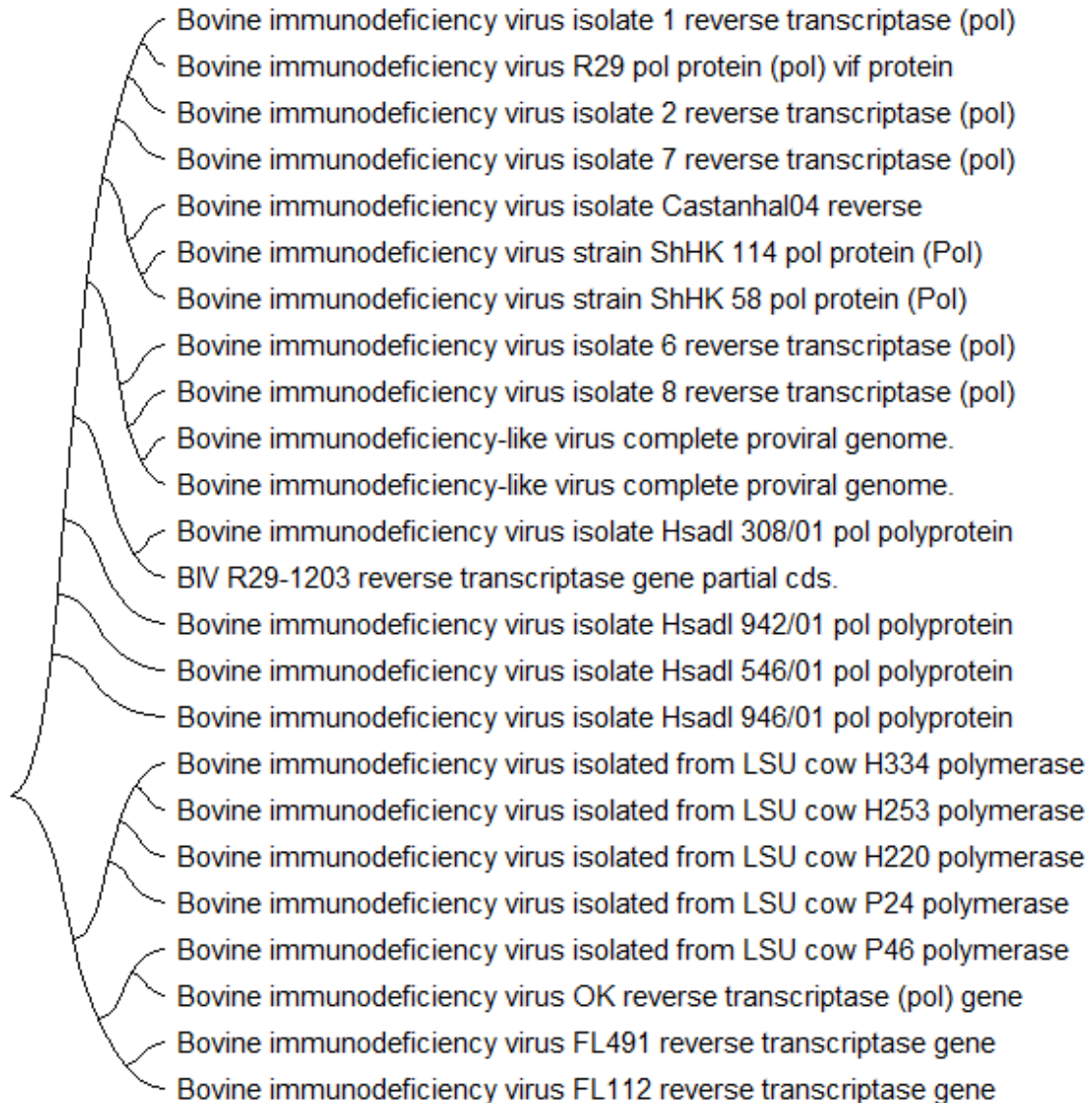


Рис. 3. Філогенетичний аналіз ізолятів BIV на основі послідовностей гена *pol*.

Таким чином, біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів *gag*, *env* і *pol* BIV демонструє існування щонайменше двох генетичних груп BIV і вказує на їхнє спільне походження від єдиного пращура. Ці дані узгоджуються з даними, отриманими іншою науковою групою дослідників, які у своїх дослідженнях використали ген *pol* [4].

Однак, мала вибірка доступних для біоінформатичного аналізу послідовностей, що опубліковані в міжнародній базі даних GenBank, та відсутність єдиного методологічного підходу щодо секвенування цих генів не дозволяє провести повноцінний і всебічний аналіз та оцінити потенційний ризик впливу цього вірусного агента. Крім того, еволюційна мінливість цього РНК-вірусу, його генетична й антигенна спорідненість з вірусом імунодефіциту людини робить його потенційно небезпечним у концепті Єдиного здоров'я. Що, враховуючи негативний досвід людства щодо інших РНК-вірусів (пташиний грип, COVID-19, ВІЛ та ін.), вимагає більш детального вивчення та ретельного аналізування усіх можливих ризиків, пов'язаних з цим.

**Висновки.** 1. Біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів *gag*, *env* і *pol* BIV демонструє існування щонайменше двох генетичних груп вірусу та вказує на їхнє спільне походження від єдиного пращура.

2. Молекулярно-генетичний аналіз BIV значно ускладнений відсутністю єдиного методологічного підходу щодо секвенування цього збудника у різних лабораторіях світу.

3. Вирішенням цього питання може стати застосування технологій повногеномного секвенування, що дасть більш чітке та конкретизоване розуміння філогенетичних зв'язків збудника.

**Перспективи використання отриманих результатів.** Отримані результати можуть стати підґрунтям для проведення більш детального вивчення циркуляції BIV в Україні, а результати біоінформатичного аналізу взято за основу для проведення філогенетичного аналізу українських ізолятів після їх секвенування.

### Список літератури

1. Gonda M. A. et al. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature*. 1987. Vol. 330, No. 6146. P. 388–391. DOI: <https://doi.org/10.1038/330388a0>.
2. Bouillant A. M., Archambault D. Le virus de l'immunodéficience bovine: brève revue. *Annales de Recherches Veterinaires*. 1990. Vol. 21, No. 4. P. 239–250.
3. Van der Maaten M. J., Boothe A. D., Seger C. L. Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1972. Vol. 49, No. 6. P. 1649–1657. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/49.6.1649>.
4. Keshavarz H., Mohammadi A., Morovati S. Evidence of bovine immunodeficiency virus: a molecular survey in water buffalo populations of Iran. *Veterinary Medicine and Science*. 2022. Vol. 8, No. 5. P. 2167–2172. DOI: <https://doi.org/10.1002/vms3.872>.
5. Meas S. et al. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2000. Vol. 62, No. 3. P. 329–331. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.62.329>.
6. Esmailnejad A., Najafi H., Torfi Y. Molecular and serological evaluation of bovine leukemia virus in water buffaloes of southern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. 2020. Vol. 14, No. 1. P. 37–44. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijvm.2019.283696.1004998>.
7. Battles J. K. et al. Immunological characterization of the gag gene products of bovine immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 1992. Vol. 66, No. 12. P. 6868–6877. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.66.12.6868-6877.1992>.
8. Rodrigues A. P. S. et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus (BIV) in bovines from the state of Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2019. Vol. 71, No. 2. P. 711–714. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10495>.
9. González-Fernández V. D. et al. First evidence of bovine immunodeficiency virus infection in Mexican cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2020. Vol. 67. P. 1768–1775. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13530>.
10. Albernaz T. T. et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency virus in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Amazon region, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 2015. Vol. 47, No. 8. P. 1625–1628. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0884-6>.
11. Cooper C. R. et al. Natural selection of the *pol* gene of bovine immunodeficiency virus. *Virology*. 1999. Vol. 255, No. 2. P. 294–301. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9572>.
12. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994. Vol. 22, No. 22. P. 4673–4680. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
13. Altschul S. F. et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990. Vol. 215, No. 3. P. 403–410. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).
14. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021. Vol. 38, No. 7. P. 3022–3027. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

**BIOINFORMATICS ANALYSIS OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY  
VIRUS MAIN GENES (GAG, ENV, POL) SEQUENCES**

**Rudova N. G., Solodiantkin O. S.**

*National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine*

*The sequences bioinformatic analysis results of the of the bovine immunodeficiency virus main genes (gag, env, pol), and updated data on the phylogenetic relationships of the pathogen are presented in the article. The existence of at least two genetic groups of BIV, which have a common origin from a common ancestor, has been established. In addition, the complexity of conducting a full-fledged and comprehensive sequence analysis for a complete understanding of the evolution and virus phylogenetic relationships was noted. It was determined that the lack of a single methodological approach to BIV sequencing in different world scientific communities complicates the analysis and interpretation of the obtained data. The application of whole-genome sequencing technologies is proposed to solve this issue*

**Keywords:** *phylogenetic relationships, Lentivirus, Retroviridae*

УДК 619:616.98-036.22-07:579.873.21:636.22/28

DOI 10.36016/VM-2023-109-3

**ПРОБЛЕМИ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

**Завгородній А. І., Білушко В. В., Позмогова С. А., Калашник М. В., Бусол В. О.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної  
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: bw.pochta@gmail.com*

*Представлені результати комплексних досліджень у скотарських господарствах України щодо визначення епізоотичної ситуації з туберкульозу великої рогатої худоби. Доведено, що застосування запропонованого комплексу методів досліджень дозволяє з'ясувати причини неспецифічних алергічних реакцій на туберкулін у тварин з мінімальними економічними збитками для сільгосппідприємств. При цьому встановлено, що параалергічні реакції на туберкулін у великої рогатої худоби зумовлюють такі види мікобактерій, як *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. nonchromogenicum*, а псевдоалергічні — нокардії та актиноміцети. Прояв у тварин неспецифічних реакцій не є підставою вважати гурти тварин неблагополучними з туберкульозу, проте слід приділяти особливу увагу контролю благополуччя щодо цього захворювання*

**Ключові слова:** *параалергія, атипові мікобактерії, нокардії, актиноміцети*

Одним із особливо небезпечних інфекційних захворювань людей і тварин у світі є туберкульоз, за якого й дотепер не розроблено високоефективних засобів лікування та вакцинних препаратів, а також уніфікованого методу діагностики [1]. Тому в основу заходів профілактики та оздоровлення гуртів великої рогатої худоби щодо туберкульозу і на сьогодні залишається своєчасна та ефективна діагностика цього захворювання із застосуванням різних методичних прийомів і методів досліджень. Для контролю благополуччя стад великої рогатої худоби (ВРХ) щодо туберкульозу у багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні, проводять щорічні моніторингові дослідження поголів'я із застосуванням алергічного методу з використанням туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців. За результатами проведених досліджень визначають стан гуртів ВРХ щодо туберкульозної інфекції. Ефективність проведених заходів профілактики та боротьби з туберкульозом залежить від своєчасного виявлення й видалення зі стада інфікованих і хворих тварин, які є джерелом збудника інфекції, а також від якості проведених ветеринарно-санітарних заходів.

Ряд дослідників повідомляють, що при діагностичному забої у реагуючих на туберкулін тварин на секції в органах і тканинах характерні для туберкульозу ураження були відсутні. При культуральному дослідженні біоматеріалу, відібраного від цих тварин збудника туберкульозу не виділяли [2, 3]. При цьому, господарствам були нанесені економічні збитки від необґрунтованого забою продуктивних тварин і недоотримання продукції, втрати племінної цінності тварин, проведення додаткових діагностичних та ветеринарно-санітарних заходів.