

29. Berkowitz R., Ilves H., Lin W. Y., Eckert K., Coward A., Tamaki S., Veres G., Plavec I. Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 2001. Vol. 75, No 7. P. 3371–3382. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.7.3371-3382.2001>.
30. de Pablo-Maiso L., Doménech A., Echeverría I., Gómez-Arrebola C., de Andrés D., Rosati S., Gómez-Lucía E., Reina R. Prospects in innate immune responses as potential control strategies against non-primate lentiviruses. *Viruses*. 2018. Vol. 10, No 8. P. 435. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10080435>.
31. St-Louis M. C., Cojocariu M., Archambault D. The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentiviruses. *Animal Health Research Reviews*. 2004. Vol. 5, No 2. P. 125–143. DOI: <https://doi.org/10.1079/ahr200496>.

IDENTIFICATION OF CONSERVED G-QUADRUPLEX MOTIFS IN THE GENOME OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

Balak O. K.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Lymanska O. Yu.

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

Guanine-rich DNA and RNA fragments tend to form stable noncanonical secondary structures — G-quadruplexes (G4) — which can be of different topologies (monomolecular, interstranded bimolecular, interstranded tetramolecular). Canonical G4s contain 2-4 G-tetrads, which are stabilized by stacking interactions, Hoogsteen hydrogen bonds and connected by a loop of 1-12 nucleotides. Based on the analysis of the nucleotide sequence, conservative G-quadruplexes that can be formed in genomic RNA and proviral DNA of the bovine immunodeficiency virus (BIV) were determined. In addition to the known potential G4 in the 3'LTR of BIV RNA, 20 stable conservative motifs of G-quadruplexes were identified for the «+» strand of the RNA, as well as for the «-» strand sequence of the proviral DNA, which G-score value (a relative parameter that characterizes stability G4) varies from 33 to 36. Two fragments with potential G4 previously identified only for the 3'U5 LTR were shown to be direct repeats and localized also in the 5'R5 LTR. A localization map of potentially stable conservative intramolecular G-quadruplexes formed by two G-tetrads was created on the BIV genome. G4 is unevenly distributed throughout the genome: for the env gene, the density was 2.6 G4 per 1000 nt., for the tat-rev gene — 2.7 G4 per 1000 nt., the highest density values were determined for the tmx (5.4 G4 per 1000 nt.) and pol genes (2.8 G4 per 1000 nt.), the lowest for gag gene (1.4 G4 per 1000 nt.). The importance of G4 search in the sequence of the minus strand of proviral DNA, in which one G4 was identified, was proved

Keywords: bovine immunodeficiency virus (BIV), G-quadruplex, noncanonical structure

УДК 619:616.98:578.828.5.083.224:578.2'21:636.22/.28

DOI [10.36016/VM-2024-110-11](https://doi.org/10.36016/VM-2024-110-11)

ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЗБУДНИКА СПУМАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ВРХ НА КУЛЬТУРАЛЬНОМУ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОМУ РІВНІ

**Горбатенко С. К., Дідик Т. Б., Корнєйкова О. Б.,
Кузнецова О. В., Мягих Н. В., Бриль Н. Ф.**

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

Дунаєва О. В.

Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

*Вивчали адаптаційну можливість спумавірусу до гомологічних перещеплюваних культур клітин, а саме ЛЕК і КСТ. В процесі інтеграції збудника спумавірусної інфекції ВРХ в перещеплювані культури клітин ЛЕК та КСТ спостерігаються морфологічні зміни стану моношару за принципом синцитійутворення та вакуолізації. Встановлено, що перещеплювана культура клітин ЛЕК більш придатна для реплікації збудника та накопичення вірусної маси. Дослідження щодо можливості інтеграції польової форми спумавірусу в перещеплювану культуру клітин КСТ показали низьку чутливість останньої до вірусу сімейства *Retroviridae**

Ключові слова: спума (пінистий) вірус, перещеплювані культури клітин, полімеразна ланцюгова реакція, моношар культури клітин

Пінистий вірус, збудник однієї з повільних, або мінорних інфекцій великої рогатої худоби, (*Bovine foamy virus* BFV), відомий як спумавірус, відноситься до підсімейства *Shumaretroviridae* сімейства *Retroviridae* і складає особливу групу ретровірусів. Вперше пінистий вірус ВРХ виділено з лімфоцитів, лімфатичних вузлів, осадженого молока при лімфосаркомі. Молекулярна структура BFV демонструє, що її геном, від 12 kb довжини, має ті ж функції, що й інші відомі пінисті віруси [1–3]. Матеріали, що висвітлені у літературі, свідчать, що від 30 до 45 % ВРХ серопозитивні до BFV і викликана ним інфекція розповсюджена в усьому світі [4–5]. Як і інші спумавіруси, BFV може передаватись багатьма шляхами, які вказують, що молоко та слина інфікованих тварин утримують активний або клітинно-пов'язаний вірус.

Встановлено, що передача збудника проходить через слину за природного та експериментального інфікування. Спостерігали сероконверсії у телят після інокуляції слини від BFV-серопозитивної худоби. Інфекційний агент у слині був вільною вірусною часткою, а не внутрішньоклітинним вірусом [6–7].

Експериментально встановлено, що ДНК BFV, чи у провірусній, чи у вірусній формі, присутня в лімфоцитах крові та клітинах молока. Важливо, що рівень ДНК BFV копій в клітинах молока був у 2,5 рази нижчим у порівнянні з лімфоцитами крові. Це пояснюють тим, що у жуйних клітини молока мають більш неоднорідну популяцію, ніж лімфоцити периферійної крові і клітини з пониженим вмістом BFV вибірково ускладнюють рух в коров'яче молоко. Можливе існування специфічної популяції лімфоцитів, чутливих до інфекції BFV.

Є всі підстави вважати, що молоко та слина ВРХ, серопозитивної до BFV, можуть розглядатись як реальний шлях розповсюдження BFV серед великої рогатої худоби [8–11].

Науковцями ННЦ «ІЕКВМ» — лабораторії вивчення лейкозу та молекулярної діагностики виявлено генетичний матеріал пінистого вірусу в організмі тварин ряду господарств центрального та східного регіонів України. Це повідомлення містить результати вивчення властивостей спумавірусу на клітинному та молекулярно-генетичному рівні.

Матеріал і методи. Пробу стабілізованої крові від корови одного з тваринницьких господарств Сумської області, в організмі якої виявлено генетичний матеріал спумавірусу, використали для зараження двох перещеплюваних культур клітин, а саме легень ембріону корови (ЛЕК) та коронарні судини теляти (КСТ). Враховуючи на те, що ретровіруси являються лімфонейротропними, ми в своїх дослідженнях для зараження культур клітин використовували лімфоїдну фракцію крові тварин-донорів, інфікованих збудником спумавірусної інфекції великої рогатої худоби. Для виділення лімфоцитів в стерильних умовах кров розводили у 2 рази забуференим фізіологічним розчином з додаванням пеніциліну 100 ОД/см³, рН 7,2, потім нашаровували по 8 см³ на розчин триомбразу з щільністю 1,075, який був попередньо розлитий у центрифужні пробірки по 2 см³. Після центрифугування в режимі 1000 об./хв. протягом 40 хвилин відбирали шар лімфоцитів в окрему пробірку, після чого відмивали 1 раз забуференим фізіологічним розчином з додаванням пеніциліну в режимі 1000 об./хв., 10 хвилин та 1 раз середовищем Ігла у вищезазначеному режимі. Об'єм суспензії лімфоцитів доводили до 10 см³ середовищем Ігла для підрахування кількості живих клітин за допомогою 0,1 % розчину трипанового синього. Концентрація живих лімфоцитів становила 1-3 x 10⁶ клітин/см³ у середовищі для культивування, до складу якого входило 90 % середовища Ігла, 10 % нативної сироватки ВРХ і 100 ОД/см³ пеніциліну. У вищезазначеному поживному середовищі з метою стимулювання продукції вірусу проводили короткострокове культивування виділених із крові донора лімфоцитів. Для цього суспензію лімфоцитів піддавали інкубації впродовж 48 годин за температури (37±0,5) °С. Після закінчення терміну культивування отримана суспензія лімфоцитів пройшла перевірку на стерильність з використанням бактеріологічних середовищ МПА, МПБ, ТІО та методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) була підтверджена наявність провірусів BFV у виділеній фракції лімфоцитів.

Проведена адаптація культур ЛЕК та КСТ впродовж 4–5 пасажів, після чого культури клітин на рівні 24–48 годин росту з (50–75) % виповнення моношару були піддані інфікуванню досліджуваним ретровірусом шляхом заміни ростового середовища на суміш ростового з суспензією короткостроково культивованих лімфоцитів у співвідношенні 1:1. Пересів культур

проводився у міру виконання моношару, в середньому кожні 4–5 діб. В якості контролю виступали ємкості з неінфікованими культурами клітин ЛЕК та КСТ.

Кожен пасаж контролювався щодня візуально та з використанням світлової мікроскопії. На рівні третього і кожного п'ятого пасажів проби піддавали дослідженню молекулярно-генетичним методом (ПЛР) для виявлення генетичного матеріалу збудників.

Для детекції провірусної ДНК BFV використано системи праймерів Int1-Int2 (зовнішня пара, довжина ампліфікованого продукту становить 430 пар нуклеотидів (п.н.)) та Int3-Int4 (внутрішня пара, довжина ампліфікованого продукту 221 п.н.) шляхом «гніздового» варіанту ПЛР згідно з рекомендаціями розробників (Materniak et al., 2016).

Ампліфікацію проведено шляхом стандартного варіанту ПЛР згідно з рекомендаціями розробників (Moody et al., 2002).

Результати досліджень. Мікроскопічні дослідження перещеплюваних культур, проведені після інфікування, свідчать, що додавання короткостроково культивованих лімфоцитів не викликало деструктивних змін морфології клітин обох ліній. Клітини моношару розміщувались щільно, з чітко вираженими границями, в цитоплазмі спостерігалась невелика кількість вакуолей, ядра мали типову овальну форму. Після 1 пасажу ще частково зустрічались лімфоцити, але вже після 2 пасажу лімфоцити під час мікроскопії не виявлялись.

Спостерігаючи за станом моношару культури клітин (ЛЕК + BFV), на рівні 1, 2 та 3 пасажів спостерігали задовільне заповнення моношару, морфологічно клітини експериментальної культури були подібні контрольним, за результатами ПЛР на рівні 3 пасажу була відмічена наявність генетичного матеріалу BFV в клітинах моношару. На 4–6 пасажах в експериментальній культурі клітин спостерігалась морфологічна деструкція клітин з ознаками симпластоутворення — в культурі зустрічались збільшені клітини з двома або трьома ядрами, клітини моношару знімали зі скла утруднено з використанням суміші версен-трипсину. На рівні 7, 8 пасажів картина стану моношару залишалась подібною, разом з цим відмічалось різке збільшення кількості відмерлих клітин в культуральній рідині.

Всього було виконано по 15 пасажів культури (ЛЕК + BFV), генетичний матеріал збудника спумавірусної інфекції ВРХ за результатами ПЛР ще фіксувався на рівні 10 пасажу, дослідження культури клітин в ПЛР на рівні 13 та 15 пасажів показали негативний результат.

Спроба проведення досліджень щодо можливості інтеграції польової форми пінистого вірусу ВРХ (BFV) в перещеплювану культуру клітин КСТ показали низьку чутливість клітин цієї культури до вірусу сімейства Retroviridae.

За результатами ПЛР на рівні 3 пасажу була відмічена наявність генетичного матеріалу BFV в клітинах моношару культури КСТ, і вже на цьому рівні культивування спостерігали багаточисельну вакуолізацію в клітинах зараженого моношару (КСТ + BFV) та деструктивні зміни в стані моношару, які виражались в його частковому руйнуванні з утворенням чисельної кількості відмерлих клітин. На рівні 4 та 5 пасажів вакуолізація та синцитійутворення спостерігалось в більшій частині (70–80 %) клітин моношару. Всього було проведено 7 пасажів, на рівні 5 пасажу за результатами ПЛР ще відмічалась наявність генетичного матеріалу збудника ретровірусних інфекцій, а матеріал 7 пасажу дав негативний результат.

Для детального вивчення морфології інфікованих клітин ЛЕК виконували висіви клітинної суспензії у пробірки з покривними скельцями за загальноприйнятим методом, після утворення моношару забарвлювали клітини культури за Романовським-Гімзе, водночас спостерігали більш інтенсивне забарвлення в навколоядерній зоні.

Висновки. 1. Збудник спумавірусної інфекції великої рогатої худоби спроможний інтегрувати в перещеплюваних культурах клітин гомологічного для великої рогатої худоби типу, зокрема ЛЕК та КСТ, що підтверджується результатами молекулярно-генетичних методів (ПЛР).

2. Адаптаційна спроможність спумавірусу більш виражена в умовах перещеплюваної культури клітин ЛЕК у порівнянні з культурою КСТ.

3. В процесі інтеграції збудника спумавірусної інфекції ВРХ в перещеплювані культури клітин ЛЕК та КСТ спостерігаються морфологічні зміни стану моношару за принципом синцитійутворення та вакуолізація.

Перспективи подальшого використання отриманих результатів. Можливість реплікації збудника спумавірусної інфекції великої рогатої худоби в гомологічній для цього виду

тварин культурі клітин дасть змогу для накопичення вірусної маси з метою розробки вітчизняного засобу серологічної діагностики захворювання.

Список літератури

1. Супотницький М. В. Эволюционная патология. К вопросу о месте ВИЧ-инфекции и ВИЧ/СПИД-пандемии среди других инфекционных, эпидемических и пандемических процессов. Москва : Вузовская книга, 2009. 400 с.
2. Pamba R., Jeronimo C., Archambault D. Detection of bovine retrospumavirus by the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*. 1999. Vol. 78, No 1–2. P. 199–208. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00179-7](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00179-7).
3. Bhatia S., Patil S. S., Sood R. Bovine immunodeficiency virus: a lentiviral infection. *Indian journal of virology : an official organ of Indian Virological Society*. 2013. Vol. 24, No 3. P. 332–341. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0165-9>.
4. Carpenter S., Vaughn E. M., Yang J., Baccam P., Roth J. A., Wannemuehler Y. Antigenic and genetic stability of bovine immunodeficiency virus during long-term persistence in cattle experimentally infected with the BIV(R29) isolate. *The Journal of general virology*. 2000. Vol. 81, Pt 6. P. 1463–1472. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-6-1463>.
5. 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>.
6. Guo H. Y., Ma Y. G., Gai Y. M., Liang Z. B., Ma J., Su Y., Zhang Q. C., Chen Q. M., Tan J. Bovine HEXIM1 inhibits bovine immunodeficiency virus replication through regulating BTat-mediated transactivation. *Veterinary research*. 2013. Vol. 44, No 1. P. 21. DOI: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-21>.
7. Suarez D. L., VanDerMaaten M. J., Wood C., Whetstone C. A. Isolation and characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus. *Journal of virology*. 1993. Vol. 67, No 8. P. 5051–5055. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.5051-5055.1993>.
8. Materniak-Kornas M., Osiński Z., Rudzki M., Kuźmak J. Development of a Recombinant Protein-based ELISA for Detection of Antibodies Against Bovine Foamy Virus. *Journal of veterinary research*. 2017. Vol. 61, No 3. P. 247–252. DOI: <https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0034>.
9. Moody C. A., Pharr G. T., Murphey J., Hughlett M. B., Weaver C. C., Nelson P. D., Coats K. S. Confirmation of vertical transmission of bovine immunodeficiency virus in naturally infected dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2002. Vol. 14, No 2. P. 113–119. DOI: <https://doi.org/10.1177/104063870201400204>.
10. Materniak M., Sieradzki Z., Kuźmak J. Detection of bovine foamy virus in milk and saliva of BFV seropositive cattle. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2010. Vol. 54, P. 461–465.
11. Rethwilm A., Bodem J. Evolution of foamy viruses: the most ancient of all retroviruses. *Viruses*, 2013. Vol. 5, No 10. P. 2349–2374. DOI: <https://doi.org/10.3390/v5102349>.

STUDYING THE CHARACTERISTICS OF BOVINE FOAMY VIRUS AT THE CULTURAL AND MOLECULAR GENETIC LEVEL

Gorbatenko S. K., Didyk T. B., Korneikova O. B., Kuznetsova O. V., Myagkikh N. V., Bryl N. F.
National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Dunaieva O. V.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

The article is devoted to the study of the adaptive capacity of bovine foamy virus to homologous continuous cell cultures, namely LEK and KST. In the process of integration of the causative agent of spumavirus infection in cattle into the continuous cultures LEK and KST, morphological changes in the state of the monolayer are observed on the principle of syncytium formation and vacuolization. It was found that LEK continuous cell culture is more suitable for pathogen replication and accumulation of viral mass. Studies on the possibility of integrating the field form of bovine foamy virus into the continuous cell culture KST showed low sensitivity of the latter to the virus of the Retroviridae family

Keywords: bovine foamy virus, continuous cell cultures, polymerase chain reaction, cell culture monolayer