

Нефедченко А. В.¹, Южаков А.Г.², Котенева С.В.¹, Глотова Т.И.¹, Глов А.Г.¹,
Забережный А.Д.³

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК ГЕРПЕСВИРУСА ЧЕТВЕРТОГО ТИПА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ПОМОЩИ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹ ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН (СФНЦА РАН), Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск, Россия;

² Институт вирусологии им. Д.И. Иванковского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

³ ФГБНУ ФНЦ Институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко, 109428, г. Москва, Россия

Введение. В аспекте экономически значимых инфекций герпесвирус крупного рогатого скота (КРС) 4-го типа (BoHV-4) слабо изучен. Данных о циркуляции вируса среди животных и его роли в инфекционной патологии в России недостаточно.

Цели и задачи исследования: разработка полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени для обнаружения ДНК вируса и изучение частоты его выявления в пробах биоматериала от животных с различной клинической патологией в моноварианте и в ассоциациях с другими вирусами.

Материал и методы. Мишенью для амплификации служили нуклеотидные последовательности гена гликопротеина L. Для анализа и конструирования праймеров использовали последовательности референтных штаммов, опубликованные в GenBank. Исследования проводили в 3 регионах Западной Сибири на 5 крупных молочных комплексах.

Результаты. 27,7% проб биоматериала содержали геном вируса. Вирус присутствовал в смывах из носовой полости телят (80,0%), лёгких (46,2%) и бронхиальных лимфатических узлах (38,5%) при пневмониях. При диареях вирус выявили в 20% проб, а у коров с гинекологической патологией – в 10,0% проб. При респираторных болезнях телят вирус выявляли в ассоциации с вирусами инфекционного ринотрахеита КРС (BoHV-1) (21,6%) и коронавирусом КРС (BoCoV) (20,3%), а при гинекологической патологии коров – с вирусом вирусной диареи КРС 1-го типа (BVDV1) (6%).

Обсуждение. По результатам филогенетического анализа, из 5 выявленных изолятов вируса, четыре принадлежали к Американской ветви штаммов и один – к Европейской. Американские штаммы циркулировали на территории Республики Казахстан (1), Тюменской (1) и Новосибирской (2) областей, а европейский изолят был выделен от животных в Новосибирской области.

Заключение. При интенсивном развитии молочного животноводства в России актуальны поиск вирусных агентов, участвующих в этиологии инфекционной патологии животных, а также изучение генетического разнообразия вирусов, циркулирующих на конкретной ферме, в том числе завезённых из других стран.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; герпесвирус 4-го типа; гликопротеин L; ПЦР в режиме реального времени; филогенетический анализ.

Для цитирования: Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глов А.Г., Забережный А.Д. Выявление ДНК герпесвируса четвертого типа у крупного рогатого скота при помощи ПЦР в режиме реального времени. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(4):178-184. DOI:<https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-178-184>

Информация об авторах:

Нефедченко А.В., <http://orcid.org/0000-0002-4181-4268>

Южаков А.Г., <http://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Котенева С.В., <http://orcid.org/0000-0003-2649-7505>

Глотова Т.И., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>

Глов А.Г., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>

Забережный А.Д., <http://orcid.org/0000-0001-7635-2596>

Для корреспонденции: Глов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, зав. лабораторией биотехнологии – диагностический центр СФНЦА РАН, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск.

E-mail: glotov_vet@mail.ru

Nefedchenko A.V.¹, Yuzhakov A.G.², Koteneva S.V.¹, Glotova T.I.¹, Glotov A.G.¹, Zaberezhny A.D.³

DETECTION OF BOVINE HERPESVIRUS 4 DNA IN CATTLE BY REALTIME PCR

¹ Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Institute of Experimentally Veterinary Medicine of Siberia and Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation;

² D.I. Ivanovsky Institute of Virology «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 109428, Russian Federation;

³ All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, 109428, Russian Federation

Introduction. BoHV-4 is poorly understood. Data on the circulation of the virus among animals and its role in infectious diseases insufficient.

Aims and goals. Development of real-time PCR for detecting the BoHV-4 and studying the frequency of its presence in samples from sick animals.

Material and methods. The nucleotide sequences of the glycoprotein L gene served as a target for amplification. The sequences of reference strains published in GenBank were used to analyze and design the primers. Studies were conducted in 3 regions of Western Siberia on 5 large dairy farms.

Results. 27.7% of samples contained the virus. The virus was present as a monoagent in nasal cavity of calves (80.0%), lungs (46.2%) and bronchial lymph nodes (38.5%) in pneumonia. In the cases of diarrhea the virus was detected in 20%, and in cows with gynecological pathology in 10.0%. In respiratory diseases of calves the virus was detected in association with BoHV-1 (21.6%) and BoCV (20.3%), and in gynecological pathology of cows with BVDV1 (6%).

Discussion. According to the phylogenetic analysis of 5 identified virus isolates, four belonged to the American branch and one to the European branch. The circulation of American strains occurred in the territory of the Republic of Kazakhstan (1), Tyumen (1) and Novosibirsk (2) regions, and the European - in the Novosibirsk region.

Conclusion. The search for viruses involved to the infectious pathology, as well as studying the genetic diversity of viruses circulating on a particular farm including imported from other countries, is relevant.

Keywords: cattle; herpes virus type 4; glycoprotein L; real-time PCR; phylogenetic analysis.

For citation: Nefedchenko A.V., Yuzhakov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G., Zaberezhny A.D. Detection of bovine herpesvirus 4 DNA in cattle by realtime PCR. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4):178-184. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-178-184>

For correspondence: Alexander G. Glotov, Dr. Sci. Veter., Professor, Head of laboratory Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Science, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Information about authors:

Nefedchenko A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4181-4268>

Yuzhakov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Koteneva S.V., <http://orcid.org/0000-0003-2649-7505>

Glotova T.I., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>

Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>

Zaberezhny A.D., <http://orcid.org/0000-0001-7635-2596>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Received 24 January 2019

Accepted 09 April 2019

Введение

Вирусные инфекции широко распространены во всём мире и наносят значительный экономический ущерб животноводству, особенно при интенсивном типе ведения [1–5]. В этиологии так называемых экономически значимых инфекций принимают участие многие вирусы, среди которых значительная роль принадлежит вирусам семейства *Herpesviridae* [6]. Относительно слабо изучен в этом аспекте герпесвирус крупного рогатого скота (КРС) 4-го типа (BoHV-4).

Согласно современной классификации, BoHV-4 относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, роду *Rhadinovirus* и отличается от большинства изолятов герпесвирусов, выделенных от жвачных животных [6]. Впервые вирус был выделен в Венгрии от телят с респираторной и глазной патологией [7, 8]. Впоследствии агент был выделен во многих странах от животных при абортках, эндометритах, пневмониях, диарее, респираторных инфекциях, пустулёзном дерматите вымени, а также от клинически здоровых животных [9–11]. Воспроизвести болезнь экспериментально удавалось не всегда, поэтому роль вируса в инфекционной патологии КРС до сих пор неясна [10]. Подобно другим герпесвирусам, BoHV-4 способен устанавливать латентное состояние (персистентную инфекцию) после первичной её острой формы. Несмотря на то, что BoHV-4 был идентифицирован во многих тканях во время персистирующей инфекции, накопленные данные свидетельствуют о том, что преимущественным сайтом персистенции являются клетки линии моноцитов / макрофагов [11].

В литературе описаны ассоциации этого вируса с другими патогенами при метритах, в том числе с бактериями [12–15].

Кроме крупного рогатого скота BoHV-4 может инфицировать широкий спектр жвачных животных, включая американского бизона, американского буйвола, овец и коз [10].

В СССР выделение вируса впервые было описано Н.Н. Крюковым и соавт. [16], а выявление его генома при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) – Л.Б. Прохвятиловой и соавт. [17].

Данных о циркуляции вируса среди КРС и его роли в инфекционной патологии в нашей стране недостаточно.

В связи с этим целью настоящего исследования была разработка ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для обнаружения ДНК BoHV-4 и изучение частоты его выявления в пробах биоматериала от животных с различной клинической патологией в моноварианте и в ассоциациях с другими вирусами.

Материал и методы

В качестве мишени для амплификации выбрали нуклеотидные последовательности гена гликопротеина L BoHV-4. Для анализа и конструирования праймеров использовали последовательности штаммов JN133502.1, Z79634.1, M90787.1, KC999113.1, AF318573.1, опубликованные в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Сравнительный анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакетов программ Mega 6.06. Дизайн

олигонуклеотидов и праймеров выполняли с помощью программы PerlPrimer v1.1.21 и VectorNTI 8.

Исследования проводили в 3 регионах Западной Сибири: в Тюменской, Новосибирской областях и в Республике Казахстан на 5 крупных молочных комплексах с поголовьем 800 дойных коров и более со среднегодовой продуктивностью 7000–10000 л и выше.

Пробы биоматериала отбирали от телят с респираторными и желудочно-кишечными болезнями, а также от коров с гинекологической патологией. При респираторной патологии исследовали смывы из носовой полости, пробы слизистой трахеи, лёгких, бронхиальных лимфатических узлов, крови; при желудочно-кишечной патологии – лёгких, селезёнки, бронхиальных и брыжеечных лимфатических узлов, кишечника; при гинекологической патологии у коров – выделения из влагалища и матки.

Всего исследовали 292 пробы биоматериала, отобранные от животных посмертно и при жизни. Для выявления ассоциации BoHV-4 с другими возбудителями, участвующими в этиологии изучаемой патологии, проводили исследования на наличие в биоматериале вирусов инфекционного ринотрахеита (BHV-1), вирусной диареи (BVDV), парагриппа-3 (BPIV-3), респираторно-синцитиального (BRSV) и коронавируса (BoCV) крупного рогатого скота методом ПЦР-РВ.

Суспензии внутренних органов готовили путём растирания в ступке с кварцевым песком с последующим разведением 1 : 10 фосфатно-солевым буфером (рН 7,4). Для выделения суммарной нуклеиновой кислоты из суспензий органов использовали коммерческий набор «РИБО-Преп» (ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции производителя.

ПЦР-РВ с детекцией флуоресценции на канале FAM проводили на амплификаторе CFX96 Touch (Biorad, США). Концентрацию нуклеиновых кислот в контрольных материалах определяли спектрофотометрически с помощью флуориметра «Qubit 2.0» (Invitrogen, США). В качестве контроля амплификации использовали штамм «Mova» BoHV-4. Оптимизировали ПЦР с использованием в качестве ДНК-матрицы рекомбинантной плазмиды pCR 2.1 (Invitrogen, США) со вставкой фрагмента гена-мишени гликопротеина L.

Для подтверждения результатов реакции определяли нуклеотидную последовательность фрагмента гена гликопротеина L. Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера с помощью набора реагентов BigDye v.3.1 на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3130xl DNA analyzer» (Applied Biosystems, США). Сравнивали установленные нуклеотидные

последовательности с представленными в базе данных GenBank с использованием поисковой системы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Анализ последовательностей. Анализировали нуклеотидные последовательности синтезируемых фрагментов методами выравнивания с опубликованными последовательностями других штаммов вируса с помощью программ BioEdit 7.0.0 и Lasergene 7.1.0. Построение дендрограмм проводили при помощи метода наибольшего правдоподобия (ML – maximum likelihood) в программе MEGA v.7 [18]. Для оценки достоверности топологии использовали бутстрэп-тест (1000 репликаций) [19].

Результаты

Для конструирования праймеров и зонда был выбран наиболее консервативный ген gL, кодирующий гликопротеин L вируса [6].

При конструировании олигонуклеотидов учитывали следующие требования: отсутствие протяжённых участков повторяющихся нуклеотидов, а также комплементарных последовательностей длиной более 3 оснований внутри олигонуклеотидов, высокое содержание гс-оснований (не менее 50%).

В результате выбрали пару праймеров длиной 22 и 25 нуклеотидов, а также ДНК-зонд длиной 20 нуклеотидов. Последовательности праймеров и зонда приведены в табл. 1.

В качестве положительного контрольного образца в ПЦР использовали рекомбинантную плазмидную ДНК pCR2.1, содержащую нуклеотидную последовательность фрагмента гена gL. Амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, включавшей набор реагентов БиоМастер UDG HS-qPCR (ООО «Биолаб-микс», Россия), 10 pM каждого праймера и зонда, а также 5 мкл ДНК.

Экспериментально подобрали оптимальные временные промежутки инкубации (временной диапазон для стадий денатурации, отжига праймеров и элонгации варьировал от 10 до 40 с шагом в 5 с). В ходе исследования выбрали оптимальный протокол проведения ПЦР: 50 °C – 2 мин, 95 °C – 5 мин, 10 циклов 95 °C – 15 с, 60 °C – 20 с, 72 °C – 20 с, далее 45 циклов: 95 °C – 15 с, 57 °C – 1 мин. Учёт реакции проводили на канале FAM при шаге циклирования 57. Результат считали положительным при величине порогового цикла (Ct) не выше 30.

Результаты оценки аналитической чувствительности ПЦР представлены на рис. 1. Минимальная аналитическая чувствительность составила 53 геномных эквивалента на реакцию.

Таблица 1

Структура праймеров и зонда для детекции генетического материала BoHV-4 по участку гена gL

Показатель	Последовательность (5' → 3')		Размер ампликона, п.н.	Положение*
Праймеры	F	5'-ACATCACATTAACCCATTGGC-3'	156	60 494 – 60 648
	R	5'-ACTCCTTCTGTGTTAACSTATCAG-3'		
Зонд	Z	5(FAM)-CAATTGGAATGTGCTGTGGT-3(BHQ1)		

Примечание. * нумерация дана по полной последовательности изолята FMV09-1180503 (номер в GenBank KC999113.1).

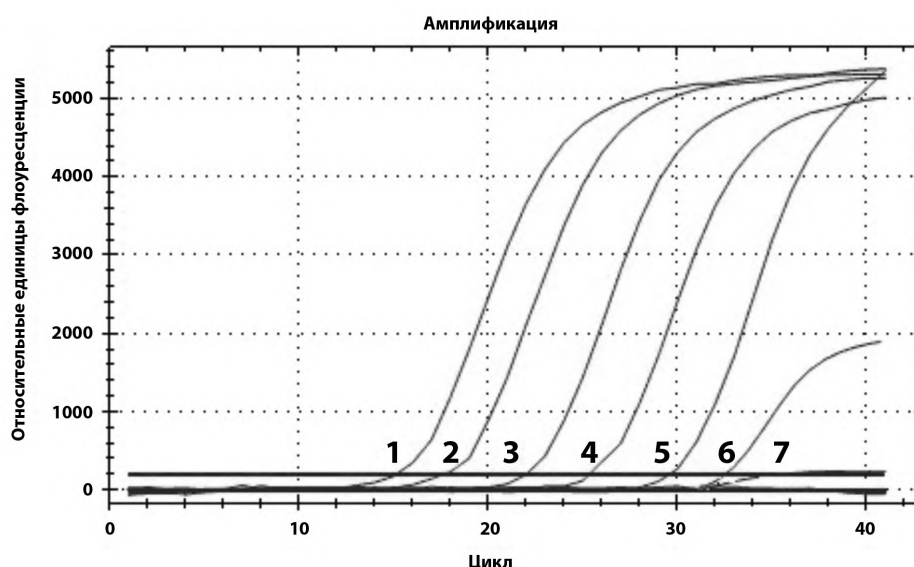


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации рекомбинантной плазмиды в реакции.

Цифрами обозначены 10-кратные разведения плазмиды от $5,3 \cdot 10^5$ до $5,3 \cdot 10^{-1}$ геномных эквивалентов на реакцию. Данные получены на приборе «CFX96 Touch» (Biorad, США).

Специфичность реакции определяли с использованием референтных штаммов близкородственных герпесвирусов, вирусов других семейств и ДНК культуры клеток MDBK: BoHV-4 (штамм «Movar»), BoHV-1 (штамм «Оренбург»), BoHV-2 (штамм «М»), SuHV-1 (штамм «Арский»), BAdV-1 (штамм BV-10), BRAV (штамм «SD-1»). Отрицательные результаты ПЦР с

каждым из вышеперечисленных образцов позволили определить специфичность тест-системы как 100%.

Для оценки возможности применения разработанной ПЦР для анализа проб биологического материала от КРС исследовали 292 пробы биоматериала от животных с респираторной и гинекологической патологией (табл. 2).

По результатам ПЦР 81 (27,7%) из 292 исследованных проб биоматериала от животных содержала геном вируса BoHV-4. В результате ДНК BoHV-4 выявили у животных с респираторными, желудочно-кишечными и гинекологическими заболеваниями. Чаще всего его обнаруживали в смывах из носовой полости (80,0% положительных проб), реже в пробах из тканей лёгких (46,2%) и бронхиальных лимфатических узлов (38,5%), отобранных от телят в возрасте 2-3 мес с респираторными заболеваниями. При желудочно-кишечных болезнях вирус выявили у 2 из 10 телят в лёгких и бронхиальных лимфатических узлах. У коров с гинекологической патологией вирус удалось выявить в 10,0% проб.

Для изучения потенциальной этиологической роли вируса в развитии респираторных, желудочно-кишечных и гинекологических болезней сравнили частоту выявления этого вируса с другими возбудителями вирусных болезней КРС. Виды ассоциаций BoHV-4 с другими вирусами, участвующими в этиологии изучаемой патологии животных, приведены в табл. 3.

Из данных табл. 3 следует, что чаще всего ДНК BoHV-4 выявляли в моноварианте. Так, при респираторных болезнях телят в моноварианте он присутствовал в 43 (58,1%) пробах, в 16 (21,6%) пробах его выявили в ассоциации с BnV-1, а ещё в 15 (20,3%) – с BoCV. Ассоциаций BoHV-4 и других патогенов вирусной природы при желудочно-кишечных болезнях телят не установили.

Таблица 2

Частота выявления BoHV-4 в органах животных с различной клинической патологией

Вид материала	Количество исследованных проб	Количество положительных проб, абс. / %
<i>Респираторные болезни телят в возрасте 2-3 мес</i>		
Смывы из носовой полости	20	16 / 80,0
Слизистая трахеи	52	12 / 23,1
Лёгкие	52	24 / 46,2
Бронхиальные лимфатические узлы	52	20 / 38,5
Кровь	36	2 / 5,6
И т о г о ...	212	74 / 34,9
<i>Желудочно-кишечные болезни телят в возрасте до 20 дней</i>		
Лёгкие	10	2 / 20,0
Селезёнка	10	0
Бронхиальные лимфатические узлы	10	2 / 20,0
Брыжеечные лимфатические узлы	10	0
Кишечник	10	0
И т о г о ...	50	4 / 8,0
<i>Гинекологическая патология коров</i>		
Вагинальные и маточные выделения	30	3 / 10,0
В с е г о исследовано проб	292	81 / 27,7

Таблица 3

Ассоциации BoHV-4 с другими возбудителями вирусных болезней КРС

Статус по BoHV-4	Коли- чество проб	Количество положительных проб				
		BHV-1	BVDV	BPIV	BRSV	BoCV
Респираторные болезни телят в возрасте 2-3 мес						
BoHV-4 по- ложительно	74	16	0	0	0	15
BoHV-4 от- рицательно	138	27	9	0	7	11
В с е г о...	212	43	9	0	7	26
Желудочно-кишечные болезни телят в возрасте до 20 дней						
BoHV-4 по- ложительно	10	—	0	—	—	0
BoHV-4 от- рицательно	40	—	11	—	—	0
В с е г о...	50	—	11	—	—	0
Гинекологическая патология коров						
BoHV-4 по- ложительно	3	0	2	—	—	—
BoHV-4 от- рицательно	27	9	5	—	—	—
В с е г о...	30	9	7	—	—	—

Примечание. Прочерк означает, что исследование не проводилось.

При исследовании проб биоматериала от коров с гинекологической патологией (задержание последа, метриты и эндометриты) BoHV-4 выявили в 3 из 30 исследованных проб, 2 из них содержали также геном BVDV1.

Для оценки специфичности выявления вируса в пробах биоматериала от животных определяли первичные нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов ДНК вируса и проводили их филогенетический анализ (рис. 2).

Филогенетический анализ участка гена гликопротеина L BoHV-4 показал, что в России встречаются штаммы как Европейской (Movar-like, генотип 1), так и Американской (DN 599-like, генотип 2) ветвей данного вируса (см. рис. 1). Из 5 исследованных образцов 4 изолята были отнесены к Американской ветви и один к Европейской.

Обсуждение

По данным зарубежной литературы, в качестве мишеней для выявления ДНК BoHV-4 чаще используют праймеры на ген тимидинкиназы или гликопротеина В [20]. Ген gB имеет высокую степень гомологии с gB вируса Эпштейна–Барр и герпесвируса Саймири [21]. Поэтому для его выявления иногда используют общие праймеры [22]. В нашем исследовании в качестве контроля для амплификации использованы последовательности гена гликопротеина L вируса. Результаты показали высокую чувствительность и специфичность выявления генома вируса как при исследовании референтных штаммов, так и проб биологического материала от животных.

Известно, что штаммы BoHV-4 могут быть разделены на 3 группы: европейские, американские и штаммы, выделенные от африканских буйволов [23]. Опубликовано сообщение о выделении новой – Ар-

гентинской группы штаммов вируса [20]. Есть мнение, что Европейская и Американская ветви вируса разошлись около 260 000 лет назад [23].

В данной работе нам удалось выявить 5 изолятов вируса, четыре из которых (Kz19/18, T24/18, N26/18, N29/18) по результатам филогенетического анализа были отнесены к Американской ветви штаммов, и один (N31/18) – к Европейской. Циркуляция американских штаммов происходила на территории Республики Казахстан (1), Тюменской (1) и Новосибирской (2) областей, а европейский изолят был выделен от животных в Новосибирской области.

Изолят Kz19/18 был получен от коровы с гинекологической патологией, изоляты T24/18 и N29/18 – от телят, больных диареей, а N26/18 и N31/18 – от телят с респираторными болезнями. Таким образом, на территории Новосибирской области циркулируют изоляты вируса обеих подгрупп.

В настоящее время установить происхождение циркулирующих среди животных штаммов вируса сложно, для этого нужны дополнительные исследования. Возможно, в Сибири распространена именно Американская ветвь, и вирус был завезён в Сибирь в 1970–1980-х годах с импортированными из США животными, либо присутствовал в популяции сибирского скота длительное время. Определённое заключение можно сделать только в отношении изолятов Kz19/18, T24/18, так как они были выделены от животных голштино-фризской породы, завезённых из США в 2008–2012 гг. Изолят N31/18 был выделен от животных, завезённых из Германии. Происхождение изолятов N26/18, N29/18 установить сложно, так как они были выделены от животных из хозяйств, куда завоз импортных животных не осуществлялся. Для получения ответов на данные вопросы требуются дополнительные исследования.

Как указывалось выше, роль вируса в качестве основного этиологического агента эндометритов, желудочно-кишечной и респираторной патологии КРС до конца не изучена, несмотря на то, что он был выделен от животных при абортках, эндометритах, пневмонии, диарее, респираторных инфекциях, пустильном дерматите вымени. Описаны случаи его выделения и от клинически здоровых животных [25].

В последние годы обсуждается этиологическая роль вируса в возникновении эндометритов у коров. Считается, что вирус играет потенциальную роль в качестве вторичного этиологического агента [24, 25]. В литературе описаны ассоциации этого вируса с другими патогенами при метритах, а также в случае обострения бактериального метрита у персистентно инфицированных коров [25].

D. Areda и соавт. [26] изучали возможность распространения и факторы риска инфицирования животных BoHV-4, а также генетический профиль и доминирующие генотипы вируса в двух регионах штата

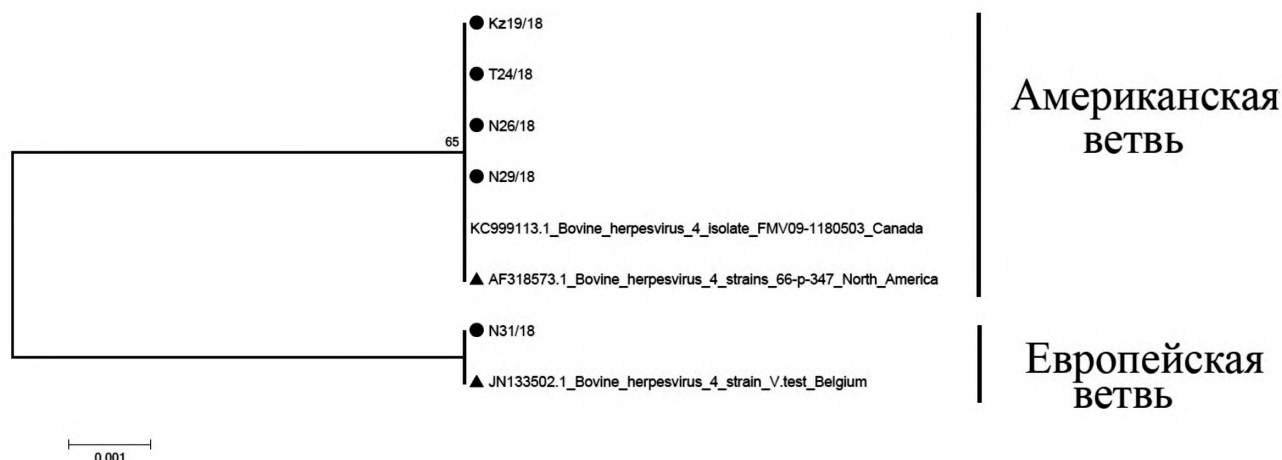


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка гена гликопротеина L герпесвируса крупного рогатого скота 4-го типа.

Выравнивание последовательностей проведено с использованием ClustalW метода. Бутстреп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Штаммы, исследуемые в данной работе, отмечены черным кругом (●). Референтные штаммы отмечены черным треугольником (▲). Для штаммов из базы данных GenBank указаны название и идентификационный номер.

Калифорния. Методом ПЦР-РВ на гены гликопротеина В и тимидинкиназы исследовали вагинальные и маточные выделения 48 отелившихся коров из 11 молочных ферм. Филогенетический анализ 10 полученных в ходе работы изолятов показал циркуляцию вируса двух генотипов и изменчивость гликопротеина В вируса первого генотипа (Movar-like) и гена тимидинкиназы вируса второго генотипа (DN 599-like). Авторы считают, что высокая генетическая изменчивость BoHV-4 свидетельствует о возможной инфекции животных несколькими его генотипами. Распространённость инфекции составила 22,3% (33/148), послеродовой метрит выявляли в 33,8% случаев (48/142). Обнаружили сильную зависимость между инфекцией BoHV-4 и количеством лактаций, стадиями лактаций и наличием послеродовых метритов.

В работе S. Klammer и соавт. [27] показано, что инфекция вирусом отрицательно влияет на плодотворность искусственного осеменения животных, снижая его эффективность, особенно в ассоциации с бактерией *Trueperella pyogenes*. В литературе описаны случаи абортов, вызванных вирусами BoHV-1 и BVDV1, однако при исследовании проб биоматериала от 81 абортировавших плодов BoHV-4 не выявлено [28].

В нашей работе присутствие вируса в моноварианте установлено в 27,7% исследованных проб, полученных от телят при вспышках желудочно-кишечных и респираторных болезней, а также от коров с гинекологической патологией.

Из 74 положительных на BoHV-4 проб биоматериала от телят с респираторным дистрессом 15 проб содержали геном коронавируса КРС. В пробах, полученных от телят с признаками диареи, BoHV-4 присутствовал как моноагент. В двух из 3 положительных на BoHV-4 проб присутствовал генетический материал вируса BVDV1. Наличие у животного одновременно

двух вирусов может способствовать усилению тяжести течения патологического процесса за счёт их синергетического взаимодействия [2, 3]. Исследования в этом направлении необходимо продолжить.

Заключение

Если учесть, что в России меняется стратегия ведения животноводства, возрастает количество молочных «мегаферм», поиск и выявление вирусных агентов, участвующих в этиологии инфекционной патологии КРС, а также изучение генетического разнообразия вирусов, циркулирующих на конкретной ферме, весьма актуальны. В данной ситуации необходимо проводить исследования по молекулярной эпизоотологии вирусов, циркулирующих среди КРС на молочных комплексах, особенно с животными, завезёнными из других стран. Сопоставление данных о происхождении животных с результатами филогенетического анализа может оказать большую помощь в определении источников и путей заноса возбудителей в тот или иной регион, а также в выявлении и отслеживании новых и высоковирулентных штаммов вирусов. На основании филогенетического анализа на молочных комплексах Западной и Восточной Сибири нами установлена циркуляция BoHV-4 двух генотипов: американского и европейского, происхождение которых на территории Западной Сибири и Республики Казахстан установить сложно. Четыре из пяти изолятов по результатам филогенетического анализа были отнесены к Американской ветви штаммов (генотип 2) и один (N31/18) – к Европейской (генотип 1). Циркуляция американских штаммов происходила на территории Республики Казахстан (1), в Тюменской области (1; среди животных, завезённых из США), а также в Новосибирской области (2; среди местного скота). Изолят, принадлежащий к Европейской ветви вируса, был выделен в Новосибирской области

от местных животных. Изолят Kz19/18 был выделен от коровы с гинекологической патологией, изоляты T24/18 и N29/18 – от больных диареей телят, а N26/18 и N31/18 – от телят с респираторной патологией. Таким образом, на территории Новосибирской области циркулируют изоляты вируса обеих подгрупп.

Учитывая слабую изученность роли вируса в патологии респираторной и генитальной систем КРС, а также распространения инфекции в России, исследования в этом направлении будут продолжены.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 7-15, 18-28 см. REFERENCES)

3. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Петрова О.Г., Нефедченко А.В., Татарчук А.Т., Котенева С.В. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2002; (3): 17-21.
4. Глотов А.Г., Глотова Т.И. *Респираторные болезни телят вирусно-бактериальной этиологии*. Новосибирск; 2008.
5. Гулюкин М.И., Юров К.П., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(6): 13-8.
6. Шабунин С.В., Шахов А.Г., Черницкий А.Е., Золотарев А.И., Рецкий М.И. Респираторные болезни телят: современный взгляд на проблему. *Ветеринария*. 2015; (5): 3-13.
16. Крюков Н.Н. Герпесвирусы и их роль в инфекционной патологии. *Бюллетень ВИЭВ*. 1971; (11): 7-10.
17. Прохвятилова Л.Б., Гусев А.А. Использование полимеразной цепной реакции для выявления герпесвируса КРС 4 типа в патологическом материале. В кн.: *Болезни сельскохозяйственных животных вирусной и других этиологий и меры борьбы с ними: Материалы научно-практической конференции*. Новосибирск: Ревик-К; 2001: 25-6.

REFERENCES

1. Andrews A.H. Respiratory disease. In: Andrews A.H., Blowey R., Boyd H., Eddy R., eds. *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2004: 286-3.
2. Glotov A.G., Glotova T.I., Petrova O.G., Nefedchenko A.V., Tatarchuk A.T., Koteneva S.V., et al. The spread of viral respiratory diseases of cattle. *Veterinariya*. 2002; (3): 17-21. (in Russian)
3. Glotov A.G., Glotova T.I. *Respiratory Diseases of Calves of Viral-Bacterial Etiology [Respiratornye bolezni telyat virusno-bakterial'noy etiologii]*. Novosibirsk; 2008. (in Russian)
4. Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. Strategy to combat viral diarrhea - a disease of the mucous membranes of cattle in livestock farms of the Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(6): 13-8. (in Russian)
5. Shabunin S.V., Shakhov A.G., Chernitskiy A.E., Zolotarev A.I., Retzkiy M.I. Respiratory diseases of calves: a modern look at the problem. *Veterinariya*. 2015; (5): 3-13. (in Russian)
6. Davison A.J. Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* 2010; 143(1): 52-69. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
7. Bartha A., Juhasz M., Liebermann H. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 1966; 16(3): 357-8.
8. Mohanty S.B., Hammond R.C., Lillie M.G. A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. Brief report. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1971; 33(3): 394-5. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf01254696>
9. Dubuisson J., Thiry E., Thalasso F., Bublot M., Pastoret P.P. Biological and biochemical comparison of bovid herpesvirus-4 strains. *Vet. Microbiol.* 1988; 16(4): 339-49. Doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90015-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90015-6)
10. Thiry E., Bublot M., Dubuisson J., Pastoret P.P. Bovine herpesvirus-4

- (BHV-4) infection in cattle. In: Wittmann G., ed. *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*. Boston: Kluwer; 1989: 96-5.
11. Donofrio G., Van Santen V.L. A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus 4 persistent infection. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 5): 1181-5. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-1181>
12. Donofrio G., Flammini C.F., Scatozza F., Cavarani S. Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(12): 4668-71.
13. Czaplicki G., Thiry E. An association exists between bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Prev. Vet. Med.* 1998; 33(1): 235-40.
14. Frazier K., Pence M., Mauel M.J., Liggett A., Hines M.E., Sangster L., et al. Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001; 13(6): 502-8. Doi: <https://doi.org/10.1177/104063870101300608>
15. Frazier K.S., Baldwin C.A., Pence M., West J., Bernard J., Liggett A., et al. Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic bovine herpesvirus-4. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002; 14(6): 457-62. Doi: <https://doi.org/10.1177/104063870201400602>
16. Kryukov N.N. Herpes viruses and their role in infectious diseases. *Byulleten' VIEV*. 1971; (11): 7-10. (in Russian)
17. Prokhvatilova L.B., Gusev A.A. The use of polymerase chain reaction for the manifestation of herpesvirus cattle type 4 in the pathological material. In: *Diseases of Agricultural Animals of Viral and Other Etiologies and Measures to Combat Them: Materials of the Scientific-Practical Conference [Bolezni sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh virusnoy i drugikh etiologiy i меры бор'бы с ними: Материалы научно-практической конференции]*. Novosibirsk: Revik-K; 2001: 25-6. (in Russian)
18. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870-4. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
19. Felsenstein J. Phylogenies and the Comparative Method. *Am. Nat.* 1985; 125(1): 1-15.
20. Verna A.E., Manrique J.M., Pérez S.E., Leunda M.R., Pereyra S.B., Jones L.R., et al. Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) from Argentina: high genetic variability and novel phylogenetic groups. *Vet. Microbiol.* 2012; 160(1-2): 1-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.039>
21. Goltz M., Broll H., Mankertz A., Weigelt W., Ludwug H., Buhk H.J., et al. Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses. *Virus Genes*. 1994; 9(1): 53-9.
22. Palmeira L., Machiels B., Lété C., Vanderplasschen A., Gillet L. Sequencing of bovine herpesvirus 4 v.test strain reveals important genome features. *Virology J.* 2011; 8: 406. Doi: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-406>
23. Dewals B., Thirion M., Markine-Goriaynoff N., Gillet L., de Fays K., Minner F., et al. Evolution of bovine herpesvirus 4: Recombination and transmission between African buffalo and cattle. *J. Gen. Virol.* 2006; 87(Pt. 6): 1509-19. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81757-0>
24. Donofrio G., Cavarani S., van Santen V., Flammini C.F. Potential Secondary Pathogenic Role for Bovine Herpesvirus 4. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(7): 3421-6. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3421-3426.2005>
25. Chastant-Maillard S. Impact of Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) on Reproduction. *Transbound Emerg. Dis.* 2015; 62(3): 245-51. Doi: <https://doi.org/10.1111/tbed.12155>
26. Areda D., Chigerwe M., Crossley B. Bovine herpes virus type-4 infection among postpartum dairy cows in California: risk factors and phylogenetic analysis. *Epidemiol. Infect.* 2018; 146(7): 904-12. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268818000791>
27. Klammering S., Prunner I., Giuldor M.J., Drillich M. Uterine infection with bovine herpesvirus type 4 in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 2017; 52(1): 115-21. Doi: <https://doi.org/10.1111/rda.12865>
28. Tuncer-Göktuna P., Alpay G., Öner E.B., Yeşilbaş K. The role of herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) and pestiviruses (BVDV and BDV) in ruminant abortion cases in western Turkey. *Trop. Anim. Health Prod.* 2016; 48(5): 1021-7. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1050-5>

Поступила 24.01.19

Принята в печать 09.04.19