

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

На правах рукописи

Бабошко Дмитрий Алексеевич

**ВСТРЕЧАЕМОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В
РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН И НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ**

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Гашникова Наталья Матвеевна

Кольцово

2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список иллюстративного материала.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	9
Глава 1 Обзор литературы.....	21
1.1 Общая характеристика ВЛКРС и лейкоза КРС.....	21
1.2 Структура и особенности генома ВЛКРС	26
1.3 Патогенез, молекулярные механизмы онкогенеза и механизмы уклонения ВЛКРС от иммунного ответа	38
1.4 Встречаемость и генетическое разнообразие ВЛКРС.....	41
1.5 Особенности аминокислотных последовательностей и структуры белков ВЛКРС различных генотипов	48
1.6 Диагностика инфекции, вызываемой вирусом лейкоза крупного рогатого скота	51
1.7 Современные методы профилактики и контроля ВЛКРС	59
1.8 ВЛКРС как фактор возникновения онкологических заболеваний человека	62
Глава 2 Материалы и методы.....	68
2.1 Материалы.....	68
2.1.1 Коммерческие наборы	68
2.1.2 Оборудование	68
2.1.3 Сбор эпизоотологических данных встречаемости ВЛКРС в Республике Дагестан.....	69
2.1.4 Отбор образцов крови КРС	69
2.1.5 Олигонуклеотидные пробы.....	69
2.2 Методы	72
2.2.1 Получение нативной ДНК из Т–лимфоцитов периферической крови коровы	72

2.2.2 Постановка полимеразной цепной реакции	72
2.2.3 Постановка электрофореза в агарозном геле	73
2.2.4 Определение первичной структуры ДНК методом Сэнгера	73
2.2.5 Определение первичной структуры ДНК полного генома ВЛКРС с использованием технологий NGS	74
2.2.6 ПЦР в реальном времени.....	74
2.2.7 Цифровая ПЦР.....	75
2.2.8 Филогенетический анализ и анализ точечных мутаций	75
2.2.9 Статистический анализ	77
Глава 3 Результаты собственных исследований	78
3.1 Генетическое разнообразие ВЛКРС, циркулирующих на территории Новосибирской области.....	78
3.1.1 Встречаемость ВЛКРС среди КРС в индивидуальных и коммерческих хозяйствах Коченевского района Новосибирской области	78
3.1.2 Генетическое разнообразие ВЛКРС, встречающихся в Новосибирской области.....	80
3.1.3 Анализ вариабельности ВЛКРС гена env, выделенных на территории Новосибирской области.....	86
3.2 Создание здорового стада на основании ПЦР диагностики.....	88
3.3 Анализ ВЛКРС, циркулирующих на территории Республики Дагестан (РД)..	93
3.3.1 Характеристика хозяйств, вовлеченных в исследование КРС на ВЛКРС на территории Республики Дагестан.....	93
3.3.2 Сбор образцов крови КРС и молекулярно–генетический анализ выделенных образцов ВЛКРС на территории Республики Дагестан	100

3.3.3 Сравнительный молекулярно–генетический анализ области гена env–gp51 вариантов ВЛКРС, выделенных на территориях Республики Дагестан и Новосибирской области.....	105
3.4 Анализ мутаций гена env выделенных провирусов ВЛКРС	109
3.4.1 Анализ мутаций последовательностей гена env ВЛКРС, выделенных на территории Новосибирской области.....	109
3.4.2 Анализ мутаций последовательностей гена env ВЛКРС, выделенных на территории Республики Дагестан.....	114
3.5 Анализ мутаций полногеномных последовательностей ВЛКРС	118
3.5.1 Мутации в структурных генах	119
3.5.2 Мутации в ферментативных генах	126
3.5.3 Мутации в регуляторных генах	130
3.5.4 Филогенетический анализ полных геномов	140
3.6 Разработка прототипа тест–системы на основе цифровой ПЦР для диагностики ВЛКРС в ветеринарном биологическом материале и клеточных культурах in vitro	147
3.6.1 Анализ провирусной нагрузки ВЛКРС по возрастным группам животных	151
Глава 4 Обсуждение полученных результатов	157
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	170
ВЫВОДЫ	173
Список используемых сокращений	176
Список литературы	185
Приложение А. Показатели идентичности по генотипам ВЛКРС.....	212
Приложение Б. Список депонированных нуклеотидных последовательностей гена env ВЛКРС из международной базы GenBank.....	213

Список иллюстративного материала

Список рисунков

Рисунок 1 – Структура вириона ВЛКРС.....	27
Рисунок 2 – Структура провируса ВЛКРС	28
Рисунок 3 – Индивидуальные показатели распространённости ВЛКРС в странах с уровнем инфицирования более 20%	41
Рисунок 4 – Глобальное распределение генотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) по континентам и регионам.....	44
Рисунок 5 – Позиция праймеров используемых для синтеза фрагментов генов и полногеномных последовательностей ВЛКРС	71
Рисунок 6 – Территории Новосибирской области, вовлеченные в исследование .	81
Рисунок 7 – Филогенетическое дерево, построенное для исследованных фрагментов гена env ВЛКРС, выделенных в НСО	82
Рисунок 8 – Матрица SDT с цветовой кодировкой парных показателей идентичности, полученная путем выравнивания набора нуклеотидных последовательностей гена env ВЛКРС генотипа G4 и G7 референсных последовательностей из базы данных GenBank.....	87
Рисунок 9 – Территории Республики Дагестан, вовлеченные в исследование	97
Рисунок 10 – Филогенетическое дерево вариантов ВЛКРС, выделенных в Республике Дагеста	104
Рисунок 11 – Филогенетическое дерево, построенное для области env–gp51 образцов ВЛКРС, выделенных в Республике Дагестан и на территориях Новосибирской области.....	106
Рисунок 12 – Выравнивание аминокислотных последовательностей гена env ВЛКРС, выполненное для 78 геновариантов, выделенных в Новосибирской области России	110

Рисунок 13 – Выравнивание аминокислотных последовательностей гена env ВЛКРС, показывающее 90 геновариантов, выделенных в Республике Дагестан	115
Рисунок 14 – Распределение нуклеотидного разнообразия (π) вдоль генома ВЛКРС	138
Рисунок 15 – Филогенетическое дерево 154 полученных в работе полногеномных последовательностей ВЛКРС.....	141
Рисунок 16 – Филогенетические сети ВЛКРС, построенные для полученных в работе 154 последовательностей полных геномов методом Median Joining в программе SplitsTree	142
Рисунок 17 – Филогенетические сети ВЛКРС, построенные методом SplitNetwork в программе SplitsTree	144
Рисунок 18 – Филогенетические сети ВЛКРС 7 генотипа, построенные методом SplitNetwork в программе SplitsTree.....	145
Рисунок 19 – Филогенетические сети ВЛКРС 4 генотипа, построенные методом SplitNetwork в программе SplitsTree.....	146
Рисунок 20 – Детекция количества наноунок, содержащих продукты ПЦР после эндонуклеазы рестрикции EcoRI	149
Рисунок 21 – График распределения провирусной нагрузки ВЛКРС по возрастам животных в исследованных группах.....	152
Список таблиц	
Таблица 1 – Распределение всех известных генотипов ВЛКРС по регионам мира	45
Таблица 2 – Характеристика праймеров и зондов на ген env.....	70
Таблица 3 – Доля животных–носителей ВЛКРС в крупных и индивидуальных хозяйствах Коченёвского района Новосибирской области России	79
Таблица 4 – Результаты генотипирования вариантов ВЛКРС, выделенных в отдельных районах Новосибирской области	84

Таблица 5 – Данные по выявлению маркеров ВЛКРС у животных при диагностических исследованиях с применением разных методов	89
Таблица 6 – Данные по выявлению маркеров ВЛКРС у телят при исследовании методами ИФА и ПЦР	92
Таблица 7 – Данные о распространении ВЛКРС в пунктах Республики Дагестан	94
Таблица 8 – Данные о распространении ВЛКРС в муниципальных районах и городских округах в Республике Дагестан за 2023 г.....	95
Таблица 9 – Характеристика обследованных хозяйств Республики Дагестан	98
Таблица 10 – Данные по анализу наличия ДНК ВЛКРС и выявленных генотипах вируса в исследованных образцах крови.....	101
Таблица 11 – Сравнительная характеристика геновариантов ВЛКРС в Новосибирской области и Республике Дагестан	108
Таблица 12 – Основные мутации аминокислотных последовательностей гена env ВЛКРС из Новосибирской области	111
Таблица 13 – Основные мутации аминокислотных последовательностей гена env ВЛКРС из Республики Дагестан.....	116
Таблица 14 – Ключевые аминокислотные замены в гене Gag (p15–МА, p24–СА, p12–NC) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7	120
Таблица 15 – Ключевые аминокислотные замены в гене Env (gp51, gp30) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7	124
Таблица 16 – Ключевые аминокислотные замены в гене Pro (PR) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7	127
Таблица 17 – Ключевые аминокислотные замены в гене Pol (RT/RNase H/IN) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7	129
Таблица 18 – Ключевые аминокислотные замены в гене Tax вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7	132

Таблица 19 – Ключевые аминокислотные замены в гене Rex вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7	134
Таблица 20 – Ключевые аминокислотные замены в гене g4/r3 (ORF G4/R3) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота – хроническое лимфопролиферативное заболевание вирусной природы, поражающее в природных условиях только крупный рогатый скот (КРС), протекающее бессимптомно или проявляющееся лимфоцитозом и злокачественными новообразованиями. Энзоотический лейкоз КРС (ЭЛКРС) вызывается ретровирусом – вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) (род *Deltaretrovirus*, семейство *Retroviridae*), поражающим преимущественно В–лимфоциты и формирующим пожизненную персистенцию провирусной ДНК в геноме клеток хозяина [1,2]. Большинство инфицированных животных длительно остаются субклиническими носителями; примерно в 30% у КРС старше трех лет развивается персистентный лимфоцитоз, а у 0,1–10% (по EFSA чаще 2–5%) формируются лимфосаркомы с летальным исходом в течение нескольких месяцев [3].

Влияние ЭЛКРС на продуктивность и экономику выражено уже на субклинических стадиях: крупномасштабные исследования показали снижение удоя в ЭЛКРС–положительных стадах на 2,5–2,7% на корову в сравнении с ЭЛКРС–отрицательными стадами, снижение коэффициента оплодотворения примерно на 7%, рост выбраковки и восприимчивости к инфекционным заболеваниям; снижение вакцинационного ответа у инфицированных животных [4]. Естественная передача ВЛКРС определяется переносом инфицированных лимфоцитов горизонтально (контактно–ятрогенно, изучается возможность передачи кровососущими насекомыми) и вертикально (*in utero* и через молозиво/молоко, особенно при высокой пораженности клеток коровы ВЛКРС (высокая провирусная нагрузка, HPVL – high proviral load) [5].

Глобальное распределение вируса лейкоза крупного рогатого скота характеризуется выраженной территориальной неоднородностью. В России инфекция вызванная ВЛКРС занимает первое место среди причин смертности

скота. В целом по стране около 7% поголовья (924 тысячи из 15,5 миллионов животных) инфицированы ВЛКРС, при этом в различных регионах уровень поражённости животных энзоотическим лейкозом существенно отличается: в Новосибирской области зарегистрировано 222 неблагополучных пункта, в Челябинской – 127, в Калужской – 109, в Краснодарском крае – 100; в то же время в Тюменской и Пензенской областях удалось значительно снизить заболеваемость и ликвидировать ЭЛКРС в 53 ранее неблагополучных пунктах [6].

По данным глобальных и региональных исследований ВЛКРС представлен 12 генотипами G1 – G12, которые имеют территориальную специфику распределения. В России преобладают генотипы G4 и G7, также описана циркуляция ВЛКРС G1 и G8 [7–9]. Молекулярная характеристика ВЛКРС (генотипирование) в мире проводится по области гена *env-grp51* – признанному стандарту для генотипирования и филогенетического анализа, поскольку участок гена *env-grp51* сочетает высокую вариабельность, отражающую генетическое разнообразие геновариантов, с достаточной консервативностью для надежного выравнивания и сравнения последовательностей [7]. Пополнение базы данных последовательностей гена *env-grp51* позволяет улучшать точность диагностики и выявлять эпизоотологическую трассировку источников и путей распространения инфекции [9–11].

В России представлена лишь ограниченная информация о встречающихся вариантах ВЛКРС, отсутствуют современные данные по генетическим особенностям циркулирующих ВЛКРС и их филогенетических связях. Дефицит актуальной информации о генетическом разнообразии ВЛКРС в России может приводить к снижению эффективности молекулярной диагностики, затруднять разработку и оценку вакцинных препаратов, а также ограничивать возможности эпизоотологического мониторинга, прогнозирования и контроля распространения инфекции.

Оценка потенциальной зоонозной опасности ВЛКРС остается предметом дискуссии в научном сообществе, выявление фрагментов генома ВЛКРС у женщин

с онкологией или с предраковыми изменениями тканей молочной железы (карцинома *in situ*, атипичная гиперплазия) по информации литературных источников сильно варьирует, наиболее убедительные данные о значимой ассоциации между присутствием вируса и развитием рака получены при исследовании тканей молочной железы [12]. Это окончательно не означает, что вирус может вызывать рак груди у женщин, но убедительно подтверждает, что ВЛКРС может быть онкогеном [13].

Актуальность молекулярно–генетического анализа геновариантов ВЛКРС, циркулирующих на территории РФ, обусловлена сочетанием трех факторов: высокой распространенностью ЭЛКРС при отсутствии актуальных данных о молекулярно–генетических особенностях современных вариантов ВЛКРС, значимыми прямыми и косвенными экономическими потерями в молочном и племенном секторах хозяйств и потребности в доказательной эпизоотологической аналитике для элиминации цепочек передачи вируса с минимальным риском для стада. Генотипирование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) ВЛКРС в связке с количественной оценкой провирусной нагрузки животного обеспечивает максимальную информативность для трассировки заносов, оптимизации диагностических панелей, приоритизации ВЛКРС–положительных животных к изоляции/выбраковке и оценки эффективности биобезопасности.

Выбор двух исследуемых территорий – Новосибирской области и Республики Дагестан, обусловлен их географической удалённостью друг от друга и принципиально различными характеристиками отрасли животноводства, что в совокупности позволяет охватить наиболее контрастные эпизоотические условия циркуляции ВЛКРС на территории Российской Федерации.

Новосибирская область является одним из крупнейших животноводческих регионов Сибири. По состоянию на конец 2024 года поголовье КРС в хозяйствах всех категорий составляло 351,8 тыс. голов, из них основная часть сосредоточена в крупных сельскохозяйственных организациях промышленного типа [14]. Регион занимает второе место в Сибирском федеральном округе по поголовью КРС и

входит в первую десятку субъектов РФ по производству молока, а доля крупных товарных предприятий в структуре стада определяет высокую интенсивность технологических и диагностических контактов между животными.

Республика Дагестан, напротив, представляет альтернативную модель животноводства. По итогам 2025 года общее поголовье КРС в регионе достигло 914,3 тыс. голов, при этом 714,4 тыс. голов (около 78%) содержится именно в частных хозяйствах населения и крестьянско–фермерских хозяйствах [15]. Республика Дагестан занимает первое место по поголовью КРС в России, а преобладание личных подсобных и крестьянско–фермерских хозяйств формирует принципиально иные условия передачи и поддержания инфекции. Таким образом, сочетание крупного индустриального региона Западной Сибири и южного региона с традиционно высокой долей хозяйств населения обеспечивает достаточную географическую и структурную репрезентативность исследуемой выборки для характеристики генетического разнообразия ВЛКРС, циркулирующего в различных регионах России.

Цель исследования: изучить особенности географического распределения, генетическое разнообразие и эволюционные связи вариантов ВЛКРС, циркулирующих на отдельных территориях России.

Задачи исследования:

1. Провести анализ пораженности скота ВЛКРС в частных подворьях и крупных хозяйствах Новосибирской области и Республике Дагестан;
2. Изучить представленность геновариантов и охарактеризовать генетическое разнообразие циркулирующих вариантов ВЛКРС в Новосибирской области и Республике Дагестан;
3. Изучить филогенетические отношения ВЛКРС внутри хозяйств, отдельных территорий и между регионами России;

4. Для изученных геновариантов ВЛКРС описать особенности нуклеотидных/аминокислотных последовательностей фрагмента гена env–gp51, являющегося критической мишенью для нейтрализующих антител;

5. Описать структуру и особенности аминокислотных последовательностей расшифрованных полных геномов российских геновариантов ВЛКРС G4 и G7;

6. На основе созданной базы данных нуклеотидных последовательностей ВЛКРС разработать лабораторные тесты на основе ПЦР для диагностики ВЛКРС и оценки провирусной нагрузки;

7. На основе данных, полученных при проведении мониторинга ВЛКРС в хозяйствах различных типов, разработать практические рекомендации по ключевым мероприятиям по контролю и элиминации инфекции.

Научная новизна

Комплексное молекулярно–генетическое исследование, проведённое в период с 2020 по 2025 гг., позволило получить новые данные о генетическом разнообразии вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на территориях Новосибирской области и Республики Дагестан Российской Федерации. Исследование позволило установить доминирование генотипа G4 и значительный вклад генотипа G7 в структуру популяции ВЛКРС среди поголовья молочного скота, а также выявить их неравномерное географическое распределение по хозяйствам региона.

Существенно пополнена международная база данных GenBank последовательностями env ВЛКРС, депонировано 417 новых последовательностей ВЛКРС, что расширило базу депонированных последовательностей из России вдвое.

Впервые на основании анализа 547 нуклеотидных последовательностей гена env–gp51 ВЛКРС, выделенных от инфицированных животных Новосибирской области и Республики Дагестан, проведено филогенетическое исследование

популяции вируса и описаны внутригенотипические филогенетические связи генотипов вируса G4 и G7. Впервые с использованием методов Maximum Likelihood, Median Joining Network и SplitNetwork проанализированы 154 полногеномные последовательности ВЛКРС, что позволило получить новые знания о встречаемости ВЛКРС в России.

Впервые получены полногеномные последовательности ВЛКРС генотипов G4 для геновариантов, циркулирующих на территории России. Впервые в мире получены последовательности полных геномов для генотипа G7, который не имеет в международной базе данных GenBank депонированных полногеномных последовательностей.

Впервые на основании анализа полногеномных последовательностей ВЛКРС генотипов G4 и G7, охарактеризованы мутации во всех основных генах вируса (gag, pro, pol, env, tax/reg, R3, G4). Выявлены и функционально аннотированы мутации, специфичные для генотипов G4 и G7, в том числе в ключевых функциональных доменах белков: рецептор–связывающем домене (RBD), нейтрализующих детерминантах (ND1–ND3), эпитопах CD4⁺ и CD8⁺ Т–клеток гликопротеина gp51, а также в домене активации (LAD) белка Tax и областях R3/G4 рамки считывания pX.

Впервые проведено сравнительное определение уровня провирусной нагрузки (PVL – proviral load) ВЛКРС генотипов G4 и G7 в различных возрастных группах крупного рогатого скота на территории Российской Федерации, что позволило установить достоверно более высокую провирусную нагрузку у животных, инфицированных генотипом G4, по сравнению с инфицированными генотипом G7.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные в ходе выполнения настоящего исследования, существенно дополняют имеющуюся информацию о молекулярно–генетических особенностях вируса лейкоза крупного рогатого скота на территориях Российской

Федерации и расширяют представления мирового научного сообщества о генетическом разнообразии ВЛКРС генотипов G4 и G7, включая их мутационные профили, рекомбинационный потенциал и различия в уровне провирусной нагрузки.

В практике ветеринарной службы на основе результатов генотипирования была разработана и внедрена стратегия поэтапного формирования ВЛКРС–свободного стада, включающая разделение поголовья по статусу инфицирования с двойным тестированием молодняка в 3 месяца и 6 месяцев и систематический мониторинг методом ПЦР в реальном времени.

Разработан и апробирован метод на основе цифровой ПЦР (цПЦР) с использованием праймеров к генам *pol* ВЛКРС (полимеразный ген вируса лейкоза крупного рогатого скота) и *DRA* (*BoLA*–*DRA*, ген α -цепи молекул главного комплекса гистосовместимости класса II у крупного рогатого скота) для одновременного определения провирусной нагрузки ВЛКРС генотипов G4 и G7 с нормализацией по числу клеток хозяина продемонстрировал аналитическую чувствительность (Limit of Detection (LoD) – предел обнаружения 7 копии; Limit of Quantitation (LoQ) – предел количественного определения 10 копий, Limit of Blank (LoB) – предел холостого опыта 5 копий), превосходящую таковую у стандартных методов ПЦР–РВ и гнездовую–ПЦР. Данная система может быть рекомендована для использования в ветеринарных лабораториях для мониторинга провирусной нагрузки и оценки эффективности оздоровительных мероприятий.

Разработанная система цПЦР может быть использована для поиска генетических маркеров ВЛКРС в образцах лейкоцитарной массы, образцах биопсии и аутопсии с целью подтверждения взаимосвязи их выявления и онкологических заболеваний у человека.

В ходе исследования были расшифрованы и проанализированы 634 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *env* (804 п.н.) ВЛКРС и 154 полногеномные нуклеотидные последовательности ВЛКРС (кодирующих областей

gag, pro, pol, env, рХ, 8214 п.н.). Полученные нуклеотидные последовательности (в количестве 417 штук) депонированы в международную базу данных GenBank (NCBI), что обеспечивает их доступность для мирового научного сообщества и расширяет базу референсных последовательностей ВЛКРС генотипов G4 и G7, циркулирующих на территориях Российской Федерации.

Методология и методы исследования

Для выполнения диссертационной работы методологическая основа была спланирована в соответствии с поставленными для достижения цели задачами исследования. В работе применялись современные молекулярно–биологические и вирусологические методы: выделение ДНК из лимфоцитов, амплификация нуклеиновых кислот в ПЦР, очистка ДНК, определение первичной структуры ДНК методом Сэнгера [16], определение первичной структуры ДНК полного генома ВЛКРС с использованием технологий NGS. Для диагностики ВЛКРС были использованы ПЦР с регистрацией результата в режиме реального времени и методы цифровой ПЦР. Полученные данные были проанализированы с использованием современных биоинформатических методов: множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей, филогенетический, рекомбинационный, мутационный и статистический анализы. Визуализация данных была выполнена с использованием современных программ (таких как MEGA11, Jalview, SplitsTree и других).

Основные положения выносимые на защиту

1. В Новосибирской области и Республике Дагестан существуют стада КРС с высокой долей инфицированных ВЛКРС животных и одновременно сохраняющихся внутри этих же территорий серологически и молекулярно–генетически благополучных групп скота. Это свидетельствует об активной внутрихозяйственной передаче инфекции и указывает на необходимость внедрения целевых программ мониторинга и контроля ЭЛКРС в регионе.

2. Популяция циркулирующих ВЛКРС в хозяйствах Новосибирской области и Республики Дагестан в 2020–2025 годах является генетически неоднородной с доминированием генотипа G4 и существенной долей генотипа G7. Встречаемость в регионах России варианты ВЛКРС характеризуются различиями не только на уровне отдельных генотипов вируса, но и внутри одного генотипа, что имеет принципиальное значение для разработки актуальных диагностических тестов, основанных на методе ПЦР. Описанные филогенетические отношения ВЛКРС позволяют установить связи циркулирующих в России геновариантов ВЛКРС и могут быть использованы для трассировки источников распространения инфекции.

3. Различия по спектру нуклеотидных и аминокислотных замен в гене *env*, включая области белка *gp51*, ассоциированные с рецепторным связыванием, нейтрализующими и Т-клеточными эпитопами, между генотипами ВЛКРС G4 и G7 отражают генотип–специфические особенности антигенной организации и молекулярной эволюции вируса под селективным давлением иммунной системы хозяина, а совокупность выявленных структурных и регуляторных молекулярно–генетических отличий уточняет представления об эволюции, патогенетическом потенциале и адаптационных возможностях этих генотипов.

4. Цифровая ПЦР обладает более высокой аналитической чувствительностью и воспроизводимостью при количественной оценке провирусной нагрузки ВЛКРС по сравнению с ПЦР в реальном времени и гнездовой ПЦР, особенно при низком содержании провируса, что обосновывает её применение не только для совершенствования противоэпизоотических мероприятий, но и для вирусологических исследований ВЛКРС, изучения особенностей биологии отдельных геновариантов вируса, оценки репродукции ВЛКРС в клетках и поиска связей ВЛКРС с развитием онкологии у человека.

5. Более высокая провирусная нагрузка животных, инфицированных ВЛКРС генотипа G4 по сравнению с инфицированными генотипом G7, позволяет рассматривать генотипическую принадлежность ВЛКРС как один из факторов,

определяющих интенсивность вирусной персистенции и эпизоотологический риск инфицированных животных.

6. Результаты внедрения молекулярно–генетического скрининга телят в систему противоэпизоотических мероприятий в ООО «Раздольное» демонстрируют эффективность этого подхода для поэтапного формирования стада, свободного от ВЛКРС, в условиях крупного молочного хозяйства.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертация отвечает требованиям, предъявляемым к научной специальности 1.5.10 «Вирусология» (биологические науки). Её содержание соответствует пунктам 4, 8 и 10 паспорта специальности.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов проведенного автором исследования обусловлена репрезентативным объемом выборки, а также использованием современных молекулярно–биологических, биоинформатических и статистических методов исследования. Надежность и валидность полученных результатов была обеспечена величиной уровня значимости не более 0,05 (5,0%). Сравнение пропорций между группами выполняли с применением критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера при малых ожидаемых частотах. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 3 конференциях и конгрессах различного уровня: Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio 2022» (27–30 сентября, Кольцово); Международная конференция «Ломоносов 2023» (10–21 апреля, Москва); XXV международная конференция с элементами научной школы молодых ученых «Влияние изменения климата на биологическое разнообразие и распространение вирусных инфекций в Черноморско–каспийском регионе» (2–4 ноября 2023, Махачкала). Материалы данного исследования также были представлены в виде доклада на кафедре молекулярной биологии Института Химической Биологии И Фундаментальной Медицины СО РАН.

Декларация личного участия автора

Основная часть теоретической и экспериментальной работы выполнена лично автором, в том числе проведён анализ литературы, изучена степень разработанности проблемы с определением цели, задач и дизайна исследования, выполнены выделение провирусной ДНК из клеток крови, реакции гнездовой ПЦР, ПЦР в реальном времени и цифровой ПЦР, очистка продуктов амплификации, электрофоретическая детекция, расшифровка нуклеотидных последовательностей методом Сэнгера и технологией NGS, осуществлено депонирование нуклеотидных последовательностей в базу данных GenBank, проведены филогенетический, медианного объединения, рекомбинационный и мутационный анализы, выполнено написание разделов обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение и заключение, а также статистическая обработка полученных данных. Суммарное личное участие автора в работе составило не менее восьмидесяти процентов. Работа выполнена в 2020–2026 гг. под руководством заведующей отделом ретровирусов, к.б.н. Н.М. Гашниковой.

При участии автора проводилась разработка структур специфических олигонуклеотидных праймеров для ПЦР совместно с сотрудником отдела ретровирусов А.В. Тотмениным. Загрузка образцов и прогон реакций на секвенирующем оборудовании осуществлялись сотрудниками отдела геномных исследований Б.С. Малышевым и Т.В. Трегубчак. Забор образцов крови у крупного рогатого скота, а также сбор эпидемиологических и зоотехнических характеристик на территории Республики Дагестан проводились сотрудниками Комитета ветеринарии РД и Дагестанского государственного университета, а на территории Новосибирской области – при поддержке Управления ветеринарии Новосибирской области совместно с работниками агрохолдинга ООО «Раздольное».

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 16 научных публикаций в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 3 статьи в ведущих

рецензируемых научных журналах рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертации по специальности 1.5.10 Вирусология, 2 статьи в других рецензируемых журналах и 11 тезисов, докладов на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, раздела материалы и методы, собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и двух приложений. Работа изложена на 222 страницах, иллюстрирована 21 рисунком, содержит 20 таблиц и 2 приложения. Библиографический указатель содержит 243 источника отечественных и зарубежных авторов.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Общая характеристика ВЛКРС и лейкоза КРС

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) – онкогенный вирус, являющийся причиной лимфопролиферативного заболевания. ВЛКРС относится к семейству Retroviridae, подсемейству Orthoretrovirinae, роду Deltaretrovirus [17,18]. Род Deltaretrovirus также включает в себя Т–лимфотропные вирусы приматов I, II и III типов, вызывающие сходные по клинической картине заболевания у представителей отряда приматов [17]. Вирус ассоциируется только с лейкозом крупного рогатого скота, однако он может быть экспериментально передан свиньям, овцам, лошадям, обезьянам и кроликам. У овец, экспериментально инокулированных ВЛКРС, В–клеточные опухоли развиваются с большей частотой и с более коротким латентным периодом, чем у естественно инфицированного крупного рогатого скота. Примечательно, что трансформированные В–лимфоциты у крупного рогатого скота представляют собой CD5⁺ IgM⁺ В–клетки, тогда как у овец они представляют собой CD5[–] IgM⁺ В–клетки, что позволяет предположить, что механизмы лейкемогенеза, индуцированного ВЛКРС, могут существенно различаться между видами [19–21].

В клинической картине ВЛКРС различают две формы лейкоза: sporadическую и энзоотическую [22]. Sporadическая форма является крайне редко регистрируемой формой, в основном поражает животных до 3 лет и зачастую передаётся от заражённой коровы через молоко телёнку. Она характеризуется увеличением лимфатических узлов, инфильтрацией костного мозга, увеличением тимуса, а также лейкемической инфильтрацией кожи [22,23]. При энзоотическом лейкозе наблюдается достаточно продолжительный латентный период, после которого происходит пролиферация неопластических клеток и, как следствие, формирование множественных опухолей. Эта форма характеризуется хроническим характером течения благодаря встройке вирусной кДНК в геном хозяина и развивается по нескольким последовательным стадиям. Время с момента инфицирования крупного рогатого скота ВЛКРС и до появления выраженных

симптомов заболевания может сильно варьировать в зависимости от индивидуальных особенностей животного, что затрудняет своевременную постановку диагноза [24–26]. Заболевание развивается в четыре стадии:

На бессимптомной стадии происходит интеграция вирусной кДНК в клетки хозяина без клинических проявлений [4,7]. Инфицирование животного ВЛКРС приводит к выработке антител, начиная с первых недель после заражения [7]. Особенностью инфекционного процесса, вызываемого вирусом лейкоза крупного рогатого скота, является подавление продукции вирусных частиц в организме животного и, как следствие, отсутствие свободных вирионов вируса в периферической крови [27]. Образование вирусных частиц, а также продукция р24 и gp51 антигенов происходит только после культивирования инфицированных периферических мононуклеарных клеток крови *in vitro*, что значительно усложняет серологическую и молекулярную диагностику на ранних этапах [28]

Персистентный лимфоцитоз развивается примерно в 30% случаев инфицирования и характеризуется постоянным и относительно стабильным увеличением числа В–лимфоцитов в периферической крови до 20–30 тысяч клеток в 1 мкл [29,30]. Персистентный лимфоцитоз считается доброкачественной формой заболевания, возникающей в результате клональной экспансии нетрансформированных CD5+IgM+В–лимфоцитов [24]. На стадии персистентного лимфоцитоза у животных формируется функциональная иммуносупрессия, проявляющаяся нарушением фагоцитарной активности и миграции иммунных клеток, сдвигами цитокинового профиля и повышенной восприимчивостью к вторичным инфекциям [31].

Персистентный лимфоцитоз может сохраняться до 8 лет с временными колебаниями числа циркулирующих лимфоцитов [29]. При прогрессировании заболевания могут появляться в крови лимфобласты, что свидетельствует о развитии злокачественной трансформации [32].

Опухолевая стадия развивается в 1–5% случаев, иногда минуя стадию персистентного лимфоцитоза [33]. На этой стадии происходит клональная трансформация В–лимфоцитов и формирование лимфосарком в различных органах [21]. Клинически опухолевая (терминальная) стадия характеризуется выраженной кахексией, снижением молочной продуктивности, генерализованной слабостью, увеличением лимфатических узлов, нарушениями со стороны пищеварительной и нервной систем [34].

Гематологически терминальная стадия характеризуется значительным повышением количества лейкоцитов в крови (более 30 тысяч на 1 мкл), наличием в лейкоцитарной формуле свыше 5% атипичных опухолевых клеток, умеренной или сильной метаплазией костного мозга [35]. При этом животные могут иметь алейкемический или нормальный состав крови (30,2% случаев), сублейкемический (39,5%) и лейкемический (27,9%) статус [36]. Смертность особенно высока у крупного рогатого скота старше 4–5 лет при развитии опухолей во внутренних органах [35].

Существует два основных пути передачи вируса в популяции крупного рогатого скота: горизонтальная и вертикальная передача [4,24].

Горизонтальная передача является основным механизмом передачи ВЛКРС в стадах [24]. Вирус передаётся через биологические жидкости, содержащие инфицированные В–лимфоциты, преимущественно ятрогенно – при использовании нестерильных игл, хирургических инструментов, при процедурах дебикирования, кастрации, искусственного осеменения и переноса эмбрионов [37]. Роль кровососущих насекомых в вопросе передачи вируса исследована не окончательно и требует дополнительного изучения [38,39].

Вертикальная передача – внутриутробно и через молозиво/молоко, составляет меньшую долю первичных инфекций, однако в отдельных исследованиях её доля достигала 40% среди телят от серопозитивных матерей, что свидетельствует о существенном вкладе этого пути в поддержание инфекции в

стаде [40]. Пастеризация молозива и молока не всегда полностью элиминирует ВЛКРС–инфицированные клетки и рассматривается как дополнительная, но не абсолютная мера профилактики [40].

ВЛКРС причиняет серьёзный ущерб врожденному и адаптивному иммунитету инфицированного животного. Инфекция подавляет миграцию нейтрофилов, снижает их фагоцитарную способность, нарушает выработку активных форм кислорода и образование нейтрофильных экстраклеточных ловушек (NETs), которые играют важную роль в неспецифической защите организма [41]. При высокой провирусной нагрузке наблюдается избыточная воспалительная реакция с повышением про–воспалительных цитокинов (IL–8, TNF– α) и молекул адгезии (CD18), что парадоксально усугубляет патологию [41]. Установлена положительная ассоциация между ВЛКРС–инфекцией и сероконверсией к другим инфекционным болезням, в частности к бычьему герпесвирусу 1 (BoHV–1) и лептоспирозу [42]. Это означает, что инфицированные ВЛКРС животные чаще болеют и тяжелее переносят другие инфекции, что косвенно увеличивает общее бремя инфекционных болезней в стаде. За счёт иммуносупрессивного действия ВЛКРС–инфицированные животные становятся более подвержены маститу, особенно при высокой провирусной нагрузке (количество поражённых ВЛКРС клеток): исследования показывают стойкую ассоциацию между ВЛКРС и спорадическим маститом, при этом тяжесть клинических проявлений и продолжительность мастита коррелирует с уровнем провируса в крови [43].

Экономический ущерб от заболевания лейкозом, вызванным ВЛКРС, является обширным и многогранным, затрагивая множество аспектов молочного скотоводства. В Соединённых Штатах Америки исследовательская группа Мичиганского государственного университета оценила годовые прямые потери примерно в \$283 на дойную корову, что в масштабах всей страны составляет приблизительно \$2,7 миллиардов дефицита ежегодно [44]. Другие расчёты

указывают на потери в размере около \$520 млн в США только из-за снижения молокоотдачи и сокращения продуктивной жизни коров [45].

В Канаде экономический анализ показал, что инфицированные ВЛКРС коровы генерируют годовой средний частичный чистый доход в размере канадских \$7,641, в то время как неинфицированные коровы – канадских \$8,276, что отражает различие в \$635 за одну корову в год [46]. При стандартном размере стада в 146 животных внедрение программ контроля ВЛКРС обеспечивает чистую выгоду от \$785 до \$1,594 на корову в течение 10 лет, в зависимости от применяемой стратегии (тест и выбраковка, тест и сегрегация) [46].

В Японии, в частности в префектуре Хоккайдо, экономический анализ выявил значительные потери, связанные с ВЛКРС. Экономические потери, связанные с повышенной заболеваемостью субклинической формы мастита у инфицированных ВЛКРС коров, оценивались в \$418,59 на одну корову с общей суммой убытков для всей префектуры Хоккайдо в размере \$6,097,255 в год [47]. Кроме того, потеря веса туш молочного скота, вызванная инфицированием ВЛКРС, привела к оценённым экономическим потерям в размере примерно \$1,3 млн в 2017 году [48].

Снижение продукции молока представляет один из ключевых источников убытков. По мере старения ВЛКРС–инфицированные коровы дают существенно меньше молока по сравнению с неинфицированными сверстницами в одном стаде. Показано, что повышенная распространённость ВЛКРС в стаде коррелирует с более низким средним удоем (rolling herd average) и снижением предполагаемой молочной продуктивности на 305 дней лактации, особенно для генетически предрасположенных к высокой производительности животных [49]. Сокращение продолжительности пребывания в стаде означает, что инфицированные животные выбраковываются раньше, чем неинфицированные соседи, что снижает общую окупаемость инвестиций в племенное улучшение стада.

Нарушения воспроизводства приводят к увеличению числа осеменений на беременность, удлинению межотельного периода и, в редких случаях, при развитии опухолей матки, полной невозможности забеременеть. Одно исследование показало, что годовой процент зачатия в стаде с начальной распространённостью ВЛКРС 45% составил лишь 39,8%, а к концу периода наблюдения, когда серопозитивность выросла до 73,6%, произошло сокращение уровня зачатия на 27% при втором периоде осеменения [50]. Торговые ограничения и потеря рынков являются дополнительным косвенным убытком: многие страны и регионы ограничивают импорт ВЛКРС–позитивного скота и молочных продуктов из них, что затрудняет международную торговлю и снижает конкурентоспособность производителей на мировых рынках. Несмотря на наличие чувствительных и специфичных диагностических тестов, ВЛКРС продолжает широко циркулировать в популяции крупного рогатого скота вследствие асимптоматичного течения у большинства инфицированных животных, отсутствия эффективной вакцины и универсального лечения, экономических ограничений для реализации программ эрадикации, а также высокой эффективности горизонтальной передачи при тесном содержании животных. Дополнительным фактором является генетическое разнообразие вируса, которое в отдельных случаях может снижать чувствительность молекулярных тестов из-за несовпадения праймеров и проб с циркулирующими геновариантами.

1.2 Структура и особенности генома ВЛКРС

Большинство вирионов ВЛКРС имеют сферическую форму диаметром 80 – 100 нм с выраженным полиморфизмом размеров и состоят из трёх основных структурных компонентов: центральной сердцевины (нуклеоида), окружённой внутренней белковой мембраной (матриксом), и липидосодержащей наружной оболочки вирусного происхождения [17,51]. На поверхности вирусной оболочки выступают пепломеры (шипики) размером 8–11 нм с характерной пуговкообразной структурой на конце. Эти пепломеры образованы тримерными комплексами двух типоспецифичных гликопротеинов: gp51 (поверхностный, ~51 кДа) и gp30

(трансмембранный, ~30 кДа), которые предварительно синтезируются в виде единого полипротеина–предшественника, а затем процессируются специфической клеточной протеазой [52,53].

Ключевая особенность структуры ВЛКРС: центральный нуклеоид расположен эксцентрично (смещён от центра вириона) и имеет размер 60–90 нм. Эта локализация нуклеоида отличает ВЛКРС от некоторых других ретровирусов и связана с особенностями упаковки геномной РНК [17,54]. Структура вириона представлена на рисунке 1.

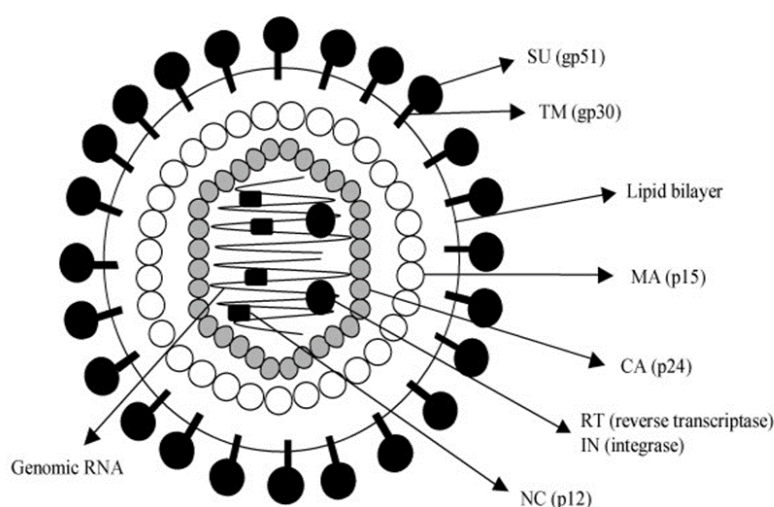


Рисунок 1 – Структура вириона ВЛКРС (SU (gp51) – поверхностный гликопротеин, обеспечивающий прикрепление вируса к рецептору клетки-хозяина, TM (gp30) – трансмембранный гликопротеин, опосредующий слияние вирусной и клеточной мембран, Lipid bilayer – липидный бислой – наружная оболочка вириона, MA (p15) – матриксный белок, связывающий нуклеокапсид с оболочкой, CA (p24) – капсидный белок, формирующий белковый каркас вириона, RT (обратная транскриптаза) и IN (интеграза) – ферменты, обеспечивающие синтез вирусной ДНК и её интеграцию в геном клетки-хозяина, NC (p12) – нуклеокапсидный белок, обеспечивающий упаковку геномной РНК, Genomic RNA – геномная РНК вируса) [21]

Геном вируса состоит из двух идентичных молекул позитивно–смысловой одноцепочечной РНК размером примерно 8714 нуклеотидов каждая, которые находятся внутри нуклеокапсиды в тесной ассоциации друг с другом (образуя геномный димер) и с вирусными ферментами репликации (обратная транскриптаза, интеграза) [7,52]. Эта диплоидная организация генома является фундаментальной

особенностью всех ретровирусов и обеспечивает механизм рекомбинации при коинфекции одной клетки несколькими вирусными частицами (см. рисунок 2) [55].

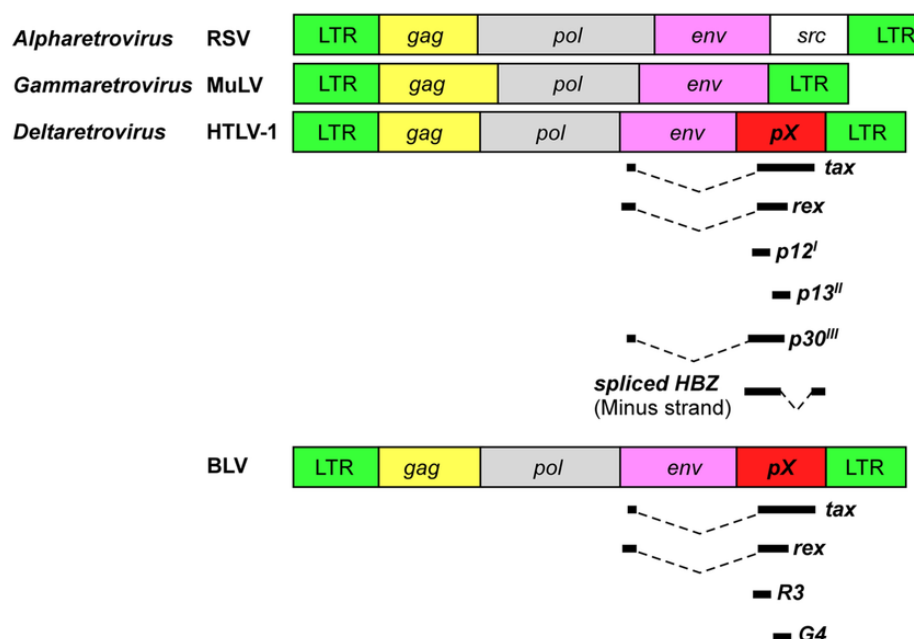


Рисунок 2 – Структура провируса ВЛКРС (BLV) (LTR – длинные концевые повторы, содержащие промоторные и регуляторные элементы; gag – ген структурных белков вириона; pol – ген вирусных ферментов, обеспечивающих репликацию провируса; env – ген оболочечных гликопротеинов вируса; pX – регуляторная область, кодирующая белки Tax, Rex, R3 и G4; Tax – транскрипционный активатор вирусных и клеточных генов; Rex – регулятор экспорта и сплайсинга вирусных РНК; R3 и G4 – аксессуарные белки, способствующие персистенции и распространению вируса в организме хозяина) [24]

Ген gag ВЛКРС имеет размер 1182 нуклеотида и кодирует полипротеиновый предшественник (Gag–полипротеин), который служит источником трёх критических структурных белков вириона [52]. При трансляции мРНК благодаря механизму программируемого рамочного сдвига (–1) образуются две основные формы полипротеинов: большинство рибосом (~90%) синтезируют простой Gag–полипротеин (Pr45), в то время как меньшая часть рибосом (~5–10%) осуществляют рамочный сдвиг и продуцируют слитый белок Gag–Pro–Pol, обеспечивая оптимальное соотношение структурных белков и вирусных ферментов репликации в составе вириона [1,17].

Вирусная протеаза последовательно расщепляет слитый полипротеин Gag–Pro (Pr66), содержащий домены структурных белков и вирусной протеазы на

предшественника Gag (Pr45) ещё до завершения трансляции, что обеспечивает ко-трансляционный процессинг [56]. Впоследствии Pr45 подвергается протеолитическому расщеплению вирусной аспартатной протеазой ВЛКРС на три функциональных структурных компонента [56]:

Матричный белок p15 (~15 кДа): расположен непосредственно под липидной оболочкой вириона, образуя матричный слой толщиной несколько нанометров. В отличие от представлений, долгое время принятых в литературе, у ВЛКРС матричный белок p15 (МА) распознаёт упаковочный сигнал на РНК (ψ), а не нуклеокапсидный белок p12 [7,57]. Исследования показали, что иммунозрелая форма p15 связывается с двумя сегментами геномной РНК в 5' области генома [57]. Первый сегмент находится в области димеризации генома [58]. Вторым сегментом охватывает упаковочный сигнал (ψ), простирающийся от 5' лидерной последовательности в начальные 60 оснований гена gag [54]. МА (p15) связывается преимущественно с димером 5'-лидерной РНК – это связывание, инициирует последующую димеризацию генома, обеспечивая механизм, при котором ровно две копии одного генома селективно упаковываются в вирион [59]. Более того, полностью зрелая форма МА (p10), образующаяся после протеолитического расщепления, теряет специфичность к упаковочному сигналу, указывая на то, что специфическое узнавание упаковочного сигнала осуществляется именно Gag – полипротеином в процессе сборки, а не зрелым белком в составе вириона [58,59].

Капсидный белок p24 (~24 кДа): самый консервативный и численно доминирующий компонент Gag, образует икосаэдральный или полиэдральный каркас внутри вириона. Благодаря высокой консервативности между различными генотипами ВЛКРС p24 служит основным серологическим маркером инфекции и основной мишенью при разработке диагностических систем [4,60]. Высокий консерватизм отражает строгие функциональные ограничения: изменения в этом белке приводят к дефектам формирования капсида и снижению жизнеспособности вируса.

Нуклеокапсидный белок p12 (~12 кДа): содержит две консервативных области цинковых пальцев, но в отличие от других ретровирусов, где нуклеокапсид является основным узнавателем упаковочного сигнала (ВИЧ, ТЛВЧ), у ВЛКРС p12 связывается с РНК неспецифично [1,57]. Данный белок выполняет несколько важных функций:

1. Разворачивает высоко структурированные вторичные структуры РНК, позволяя другим компонентам (особенно обратной транскриптазе) получить доступ к РНК–матрице.
2. Облегчает правильное позиционирование тРНК, используемой в качестве праймера для инициации синтеза ДНК.
3. Защищает геномную РНК от деградации РНКазами как внутри вириона, так и при попадании в цитоплазму целевой клетки.

Уникальный механизм упаковки ВЛКРС, при котором МА (а не NC) является основным связывающим белком ψ , может отражать адаптацию к специфическим свойствам дельтаретровирусов и быть связан со способностью вируса к персистентной инфекции CD5+ В–лимфоцитов [57,58].

Протеаза (Pro): аспартил–протеаза (молекулярная масса ~15 кДа), функционирующая как гомодимер с двумя каталитическими центрами, в каждом из которых находится консервативный остаток аспарагиновой кислоты [58,61]. Протеаза проявляет высокую специфичность к сайтам расщепления между доменами полипротеинов и является критичной для созревания вириона и его инфекционности [61].

Обратная транскриптаза (RT): многофункциональный фермент (~80–100 кДа) с двумя основными каталитическими активностями:

1. Синтезирует однонитевую ДНК на РНК–матрице (процесс называется обратной транскрипцией), затем вторую цепь ДНК, создавая двухнитевую провирусную ДНК [21].

2. Разрушает РНК в составе гибридов РНК/ДНК после синтеза первой цепи ДНК, что критично для завершения обратной транскрипции [21].

RT организована в структурные субдомены (fingers, palm, thumb), каждый выполняет определённые функции [62]:

- Fingers: позиционирует входящие нуклеотиды в активный центр.
- Palm: содержит активный центр с консервативными мотивами (A–G), образующими координационное место для посадки ионов металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+}).
- Thumb: обеспечивает процессивность синтеза ДНК.

Филогенетическое сравнение различных ретровирусов показало, что ВЛКРС, как представитель рода *Deltaretrovirus*, обладает уникальной двухфазной системой генетической вариабельности, включающей ранний период интенсивной RT–зависимой репликации с высокой частотой мутаций и последующий период соматической вариабельности, что принципиально отличает его от лентивирусов и простых ретровирусов [20,63,64]. При этом соматическая вариабельность необходима для долгосрочного выживания вируса в условиях сильного иммунитета хозяина, позволяя инфицированным клонам избегать распознавания Т–клетками и антителами через накопление мутаций в ключевых генах (*env*, *tax*), в то время как в ранней фазе RT–репликации вирус генерирует разнообразие для прорыва первичного иммунного ответа (первые волны НК– и Т–клеток), а затем вирус переходит к вертикальной репликации, где соматические мутации обеспечивают селекцию устойчивых клонов под давлением адаптивного иммунитета [24,65,66]. Данная особенность объясняет низкую общую мутагенность ВЛКРС по сравнению с другими ретровирусами и способствует латентности и лейкемогенезу (энзоотический лейкоз).

Интеграза (IN): фермент, ответственный за встраивание провирусной ДНК в хромосому хозяина (~32 кДа). Интеграза действует как гомополимер и совершает двухэтапный процесс с отщеплением 3'–оснований с концов провирусной ДНК и внедрение провирусных концов в целевую хромосомную ДНК, инициируя двухнитевые разрывы в хромосоме хозяина [67]. После встраивания клеточные

репарационные механизмы заполняют промежутки между концами провируса и расщепленной хромосомной ДНК, интегрируя провирус в геном хозяина [68].

Ген *env* кодирует предшественник оболочечных гликопротеинов размером примерно 1548 нуклеотидов и синтезируется в виде полипротеина–предшественника (Pr72, ~72 кДа) [21]. Этот полипротеин содержит три функциональных компонента в линейном порядке: N–терминальный сигнальный пептид (аминокислоты 1–33) → поверхностный белок gp51 (аминокислоты 34–301) → трансмембранный белок gp30 (аминокислоты 302–515) [69]. Процессирование Pr72 происходит на стенках эндоплазматического ретикулума, сигнальная пептидаза отщепляет N–концевой сигнальный пептид, удаляя первые 33 аминокислоты [70].

Зрелый полипротеин (gp51–gp30, ~81 кДа, удерживаемые дисульфидными мостиками между остатками цистеина) подвергается специфическому протеолитическому расщеплению клеточной эндопротеазой фурин (также называемой PC1/PC3) [21,71]. Фурин распознаёт консервативный мотив (furin cleavage motif / cleavage site) и расщепляет связь между gp51 и gp30 [72]. Эти два компонента остаются связанными дисульфидными мостиками между цистеинами и находятся в метастабильной конформации, готовой к конформационным изменениям при взаимодействии с рецептором целевой клетки [53].

Гликопротеин gp51 (~51 кДа) образует внешнюю поверхность триммера пепломера, прямо контактируя с окружающей средой и антителами хозяина. Рецептор–связывающий домен (RBD, аминокислоты 1–173) расположенный в N–терминальной трети молекулы и осуществляющий первичное взаимодействие с клеточным рецептором ВЛКРС–R (также именуемым cationic amino–acid transporter 1, CAT1; ген SLC7A1) [73,74]. Рецептор ВЛКРС–R экспрессируется преимущественно на CD5⁺ IgM⁺ В–лимфоцитах, хотя также может быть обнаружен на других типах клеток с меньшей аффинностью [23].

Сам процесс рецептор–лиганд взаимодействия вызывает конформационное изменение триммерного комплекса gp51/gp30, в результате которого происходит внедрение пептида gp30 в клеточную мембрану и осуществляется слияние вирусной и клеточной мембран [53,70]. Gp51 содержит множественные антигенные и функциональные домены. Восемь конформационных эпитопов (A–H) обозначены на основе взаимодействия с моноклональными антителами. Данные конформационные эпитопы являются основными мишенями гуморального иммунного ответа. Три нейтрализующих домена (ND1, ND2, ND3) индуцируют нейтрализующие антитела у инфицированных животных [75]. Эти домены критичны для функции рецептор–связывания и слияния мембран. Антитела, направленные против ND1, ND2 и ND3, способны блокировать инфекцию на уровне адсорбции вируса или слияния мембран. CD4⁺ и CD8⁺ Т–клеточные эпитопы локализованы в позициях 61–70 для CD4⁺ и 73–92, 131–140 для CD8⁺ специфически узнаваемы молекулами главного комплекса гистосовместимости (BoLA–DRB3 MHC класс I) [76,77]. Два цинк–связывающих региона (остатки 104–123) способны взаимодействовать с ионами цинка и могут модулировать структурную целостность RBD или опосредовать внеклеточные взаимодействия с другими молекулами [78]. В центральной части молекулы А расположен пролин–богатый регион (PRR), функция которого остаётся частично не выясненной, но предполагается его роль в динамике конформационных изменений при взаимодействии с рецептором и подготовке к слиянию мембран [21,78].

Последовательность gp51 содержит десять потенциальных сайтов N–связанного гликозилирования, однако фактически гликозилируются только шесть из них: N129, N203, N230, N251, N256, N271 [79]. Гликаны в этих позициях образуют трёхмерную структуру "щита", который физически экранирует нейтрализующие эпитопы от антител, способствуя иммунному уклонению вируса [70,80]. Потеря гликозилирования в одной позиции обычно не влияет существенно на функциональность белка. Однако, одновременная мутация нескольких сайтов гликозилирования может существенно снизить или полностью нейтрализовать

инфекционность вируса в организме. Данный факт подчёркивает критичную важность гликозилирования для вирусного выживания.

Гликопротеин gp30 (~30 кДа) – трансмембранный белок, пронизывающий вирусную оболочку один раз и контактирующий с цитоплазмой инфицированной клетки через цитоплазматический хвост. Gp30 содержит четыре функциональных домена. Внеклеточный гидрофобный пептид слияния (fusion peptide) состоит из богатых аланином и глицином остатков [53,70]. После разрыва дисульфидных мостиков между gp51 и gp30 этот пептид становится экспонирован на поверхности мембраны и может внедряться в липидный бислой целевой клетки, образуя гидрофобный градиент, который инициирует процесс слияния мембран [21]. Две–три гептад–повторяемые спирали (coiled–coil структуры, аминокислоты 366–437) образуют двойную спираль типа "leucine zipper", которая физически сжимает противопоставленные мембраны вируса и клетки, приближая их на критическое расстояние (~1 нм) для слияния липидных бислоев [53]. Иммуносупрессивный домен (SID), находящийся во внеклеточной области, локально подавляет клеточный иммунный ответ и облегчает персистенцию вируса в организме хозяина [53]. Трансмембранный домен (аминокислоты 438–456) закрепляет белок в вирусной оболочке и обеспечивает правильную ориентацию остальных доменов [70].

Цитоплазматический хвост gp30 (аминокислоты 457–515) содержит три копии мотива YXXL (где X – любая аминокислота), функционально аналогичные мотивам ITAM (immunoreceptor tyrosine–based activation motif) и ITIM (immunoreceptor tyrosine–based inhibition motif), обнаруживаемым в натуральных клеточных иммунорецепторах [81]. Эти YXXL–мотивы критичны для трёх ключевых процессов:

- Успешного входа вируса в клетку: YXXL–мотивы содействуют слиянию мембран благодаря взаимодействиям с адаптивными белками и киназами [81].

- Эффективного включения gp51–gp30 комплекса в собирающиеся вирионы на плазматической мембране [24].
- Физического взаимодействия с клеточной фосфатазой SHP–1 (Src homology 2 domain–containing phosphatase–1), что опосредованно влияет на сигнальные пути инфицированной В–клетки и синергистически усиливает трансформацию клетки в лейкемическое состояние [24].

После гена env расположены вспомогательные гены, организованные в рХ–регион, который содержит гены tax, rex, r3, g4 и другие.

Ген tax кодирует транс–активатор транскрипции (Tax, ~40 кДа), вносящий ключевой вклад в онкогенный потенциал ВЛКРС. Tax активирует вирусную транскрипцию через взаимодействие с Tax–response Element (TxRE) – тройным энхансерным мотивом (21 п.н.) в области U3 5'–LTR [21,82]. Tax связывается с клеточными белками, включая компоненты CREB–binding protein (CBP) комплекса, и стимулирует трансактивацию вирусного генома при помощи взаимодействия с основными клеточными транскрипционными факторами (CREB, NF–κB, AP–1) [83].

Примечательно, что ВЛКРС Tax и ТЛВЧ–1 Tax обладают общими клеточными мишенями. Оба белка взаимодействуют с тристетрапролином (TTP), посттранскрипционным модулятором стабильности мРНК (TNFα) [84]. Tax способствует накоплению TTP в ядре и восстанавливает экспрессию TNFα путём ингибирования его деградации, что может усиливать воспалительные процессы и поддерживать трансформацию клеток [85].

Ген rex кодирует регулятор экспорта мРНК (Rex, ~27 кДа), функциональный аналог Rex белка ТЛВЧ–1. Rex связывается с Rex–response element (RxRE) в составе неполностью сплайсированной вирусной мРНК и облегчает ядерный экспорт несплайсированных и частично сплайсированных мРНК (содержащих интроны), включая мРНК для структурных белков [86].

Гены *g3* и *g4* кодируют небольшие белки (~12–13 кДа каждый), функции которых включают модуляцию иммунного ответа хозяина и регуляцию репликативной способности вируса, по аналогии с вспомогательными белками (*p12/p13/p30*) вирусов ТЛВЧ [87]. Продукты *g3* и *g4* способствуют поддержанию высокого вирусного титра через различные механизмы, включая ингибирование апоптоза инфицированных клеток и модуляцию цитокинового окружения [87].

Уникальная особенность ВЛКРС – наличие кластера вирусных миРНК, кодируемого в интронной области между генами *g3* и *g4* [88]. Идентифицировано пять вирусных пре-миРНК (обозначаемых как BLV-miR-B1 – B5), которые подвергаются ферментативному процессингу специализированными нуклеазами клетки *Drosha* и *Dicer*, генерируя не менее десяти зрелых функциональных миРНК [89,90].

Зрелые миРНК функционируют в цитоплазме инфицированной клетки через RISC-комплекс (RNA-Induced Silencing Complex), связываясь с комплементарными или частично комплементарными последовательностями в 3'-нетранслируемых регионах (3'-UTR) мРНК и подавляя их трансляцию или индуцируя их деградацию [88,90,91].

Мишени ВЛКРС-миРНК включают:

- Собственные вирусные мРНК, что приводит к тонкой регуляции уровней вирусных белков и балансированию между репликацией и скрытностью инфекции.
- Клеточные мРНК, кодирующие компоненты врожденного иммунного ответа (например, интерфероны, цитокины), что способствует иммунному ускользанию.
- мРНК, контролирующие апоптоз и пролиферацию, что усиливает выживание инфицированных лимфоцитов и способствует их неконтролируемому размножению.

ВЛКРС–миРНК считаются важнейшим фактором персистенции инфекции, позволяя вирусу длительно циркулировать в организме, минуя эффективное уничтожение его инфицированных клеток иммунной системой [88]. Вариации в последовательностях генов пре–миРНК ВЛКРС могут существенно влиять на количество лейкоцитов в крови (вирусная нагрузка) и прогрессирование заболевания у инфицированных животных [92]. Это делает миРНК ВЛКРС перспективной мишенью как для терапевтических вмешательств, так и для углубленного изучения молекулярных механизмов хронической вирусной инфекции.

На обоих концах провируса расположены идентичные длинные концевые повторы (LTR) длиной приблизительно 520 нуклеотидов. LTR не кодируют белки, но выполняют критическую регуляторную функцию и действуют как мощные промоторы для экспрессии генов вируса [93]. Сегменты LTR подразделяются на области U3, R и U5 [93].

U3 регион содержит множество сайтов связывания клеточных транскрипционных факторов, включая PU.1/Spi-B, NF-κB, CREB и другие, опосредующие промоторную активность при различных сигналах активации клеток [1].

R регион представляет собой повторяющуюся последовательность, которая присутствует на обоих концах LTR: между U3 и U5 на 5'–конце провируса и между U5 и U3 на 3'–конце [94].

U5 регион содержит сайты связывания интегразы, необходимые для встраивания провируса в хромосому хозяина, а также мотивы, участвующие в взаимодействии с клеточными импортинами и другими факторами ядерного импорта [94].

1.3 Патогенез, молекулярные механизмы онкогенеза и механизмы уклонения ВЛКРС от иммунного ответа

Жизненный цикл ВЛКРС включает этапы прикрепления к рецептору на CD5+ IgM+ В–лимфоцитах, слияния мембран, обратной транскрипции и интеграции провирусной ДНК в геном хозяина, что обеспечивает пожизненную персистенцию вируса в виде латентно инфицированных клеток. Клиническое развитие инфекции условно разделяют на бессимптомную стадию, стадию персистентного лимфоцитоза и опухолевую стадию, однако в контексте настоящей работы принципиальное значение имеет переход от латентной инфекции к клональной трансформации В–лимфоцитов и формированию лимфосарком. (см. раздел 1.1) [24].

Молекулярные механизмы трансформации В–клеток опосредованы несколькими факторами. Вирусный белок Tax инактивирует p53 (белок–супрессор опухолей, осуществляющий транскрипционный контроль генов репарации ДНК и апоптоза) и Rb (ретинобластомный белок, ключевой регулятор перехода клеточного цикла из фазы G1 в S), активирует пролиферативные сигнальные пути (CREB, NF-κB, AP-1) и модулирует продукцию цитокинов, в том числе TNFα, что способствует нарушению контроля клеточного цикла и апоптоза. YXXL–мотивы в цитоплазматическом хвосте gp30 взаимодействуют с фосфатазой SHP-1, изменяя сигнальные пути в инфицированных В–лимфоцитах и усиливая их трансформацию, а вирусные миРНК подавляют экспрессию проапоптотических и иммунорегуляторных генов, способствуя выживанию и накоплению трансформированных клонов (см. раздел 1.2) [21].

При формировании адаптивного иммунного ответа в течение 1–4 недель после инфицирования развивается сероконверсия к gp51 и p24, однако эффективность контроля инфекции зависит от аллельного варианта комплекса BoLA–DRB3, определяющего уровни провирусной нагрузки и риск опухолевой трансформации [7]. Основным механизмом иммунного ускользания связан с латентным существованием провируса без значимой экспрессии вирусных

антигенов, в то время как дополнительные механизмы включают антигенный дрейф в иммунодоминантных регионах env и участие иммуносупрессивных доменов белков оболочки, что в совокупности позволяет вирусу длительно персистировать на фоне активного гуморального и клеточного ответа [95].

В условиях хронической инфекции селективное давление нейтрализующих антител и цитотоксических Т-лимфоцитов способствует возникновению мутантных вариантов вируса с изменённой антигенностью [64]. Филогенетические исследования генома ВЛКРС выявляют положительную селекцию ($dN/dS > 1$, где dN/dS – отношение частот несинонимичных к синонимичным нуклеотидным заменам, используемое как индикатор направления естественного отбора) в антигенных доменах gp51, указывая на то, что антиген изменяющие мутации благоприятствуют выживанию, тогда как функционально критичные регионы (RBD, каталитические центры) демонстрируют отрицательную селекцию ($dN/dS < 1$) [64,75]. Аналогичное давление выявлено в генах tax и gag (особенно p15). Специфические гаплотипы вирусных мРНК коррелируют с географическими геновариантами, предполагая адаптацию к локальным иммунным условиям [96]. На ранних этапах острой инфекции формируются квазивиды – популяции близкородственных мутантов, позволяющие быстро адаптироваться к меняющемуся иммунному окружению.

Провирусная нагрузка (PVL) – копии провируса на 10^6 лимфоцитов – предсказывает течение инфекции. Точная совокупность молекулярных механизмов, определяющих уровень провирусной нагрузки, до конца не расшифрована, однако считается, что он отражает баланс между вирулентностью конкретного варианта ВЛКРС и эффективностью иммунного ответа хозяина. Животные подразделяются на две группы: LPVL (< 100 копий/ 10^6) vs HPVL (> 1000 копий/ 10^6) [97]. На PVL влияют генотип BoLA-DRB3 хозяина, возраст животного (молодые часто имеют более высокие начальные уровни), генотип вируса и стадия инфекции (острая $>$ персистентный лимфоцитоз $>$ опухолевая прогрессия) [77]. HPVL животные (с высокой провирусной нагрузкой) имеют более быструю

прогрессию к персистентному лимфоцитозу, более высокий риск опухолевой трансформации, тогда как LPVL животные (с низкой нагрузкой) имеют более долгий латентный период и более низкий риск трансформации [98]. Факторы стресса, коинфекции или ослабление иммунитета с возрастом могут нарушить баланс персистенции и иммунного контроля.

Вопрос о различиях в патогенном потенциале между генотипами ВЛКРС остаётся дискуссионным. Ряд исследований предполагает ассоциацию между генотипом G4 и более высокой провирусной нагрузкой, однако в мультивариативном анализе эта корреляция не достигла статистической значимости [99]. Генотип G7, циркулирующий преимущественно в Восточной Европе, ассоциирован с умеренной PVL в ряде наблюдений [4]. Генотипы G5, G6, G9 и более новые геноварианты (G10–G12) изучены недостаточно для достоверных выводов об их вирулентности. Различия в клиническом течении инфекции в разных регионах могут быть обусловлены не только генотипом вируса, но и генетическими особенностями хозяина (прежде всего гаплотипами BoLA–DRB3), возрастом, условиями содержания и уровнем коинфекций [2,4]. Прямые экспериментальные сравнения патогенности генотипов ВЛКРС на крупном рогатом скоте до настоящего времени не опубликованы, и выстраивание иерархии вирулентности генотипов преждевременно.

Механизмы различий в патогенности между генотипами обусловлены мутациями в генах вспомогательных белков (r3, g4) и мРНК (см. раздел 1.2), различиями в консервативных регионах (особенно в гене *tax*, где различия в коротких мотивах могут существенно влиять на трансформирующий потенциал) и адаптацией к локальным иммунным условиям хозяина, включая частоту BoLA–DRB3 аллелей в популяции. Географически циркулирующие генотипы адаптированы к иммунным особенностям локальной популяции хозяев, что приводит к региональной вариабельности в клиническом течении. Например, в регионах с высокой частотой «защитных» BoLA–DRB3 аллелей циркулирующие генотипы часто имеют более высокую мутационную нагрузку в антигенных

доменах, отражая длительное селективное давление со стороны иммунной системы хозяина [77,98]. В регионах с преобладанием «восприимчивых» гаплотипов BoLA–DRB3 циркулирующие генотипы могут сохранять консервативную структуру, поскольку в условиях слабого иммунного давления антигенный дрейф менее критичен для выживания вируса [77,98]. Эти региональные различия в генотипическом составе и адаптивных профилях имеют практическое значение для разработки локальных программ контроля и профилактики ВЛКРС.

1.4 Встречаемость и генетическое разнообразие ВЛКРС

ВЛКРС встречается на всех континентах с существенными вариациями по регионам, отражающими эффективность региональных программ контроля и современные паттерны международной торговли скотом. На основе актуальных исследований 2015–2026 гг. вирус остаётся глобальной проблемой животноводства несмотря на успешные программы эрадикации в отдельных странах [4]. За исключением Европейского Союза встречаемость ВЛКРС во всем мире колеблется от 30% до 90% [100] (см. рисунок 3).

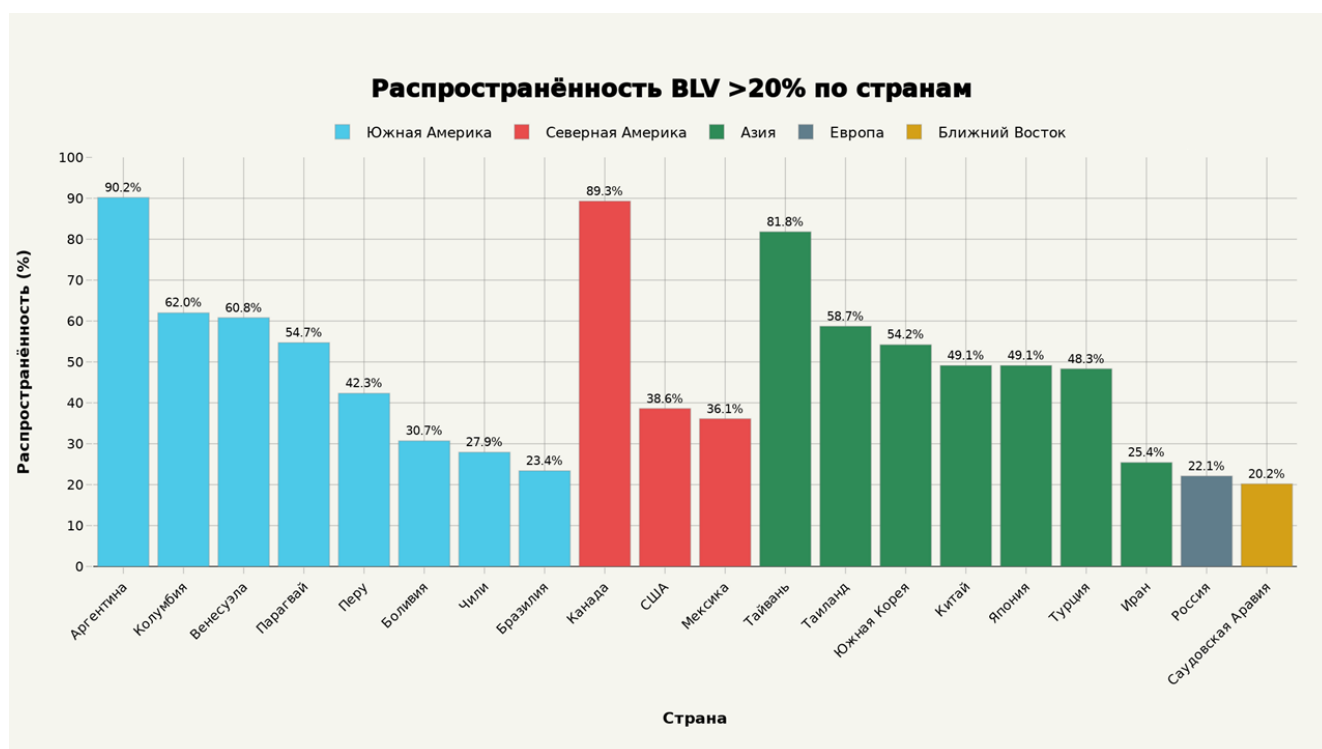


Рисунок 3 – Индивидуальные показатели распространённости ВЛКРС в странах с уровнем инфицирования более 20%

В Соединённых Штатах Америки по данным общенационального обследования NAHMS (USDA–APHIS, 2018–2019 гг.) ВЛКРС выявлен как минимум у одной коровы в 94,2% молочных стад, при этом средняя внутрискотная распространённость составляет около 46,5% животных [101]. В коммерческих молочных хозяйствах этот показатель нередко достигает 60–100%, тогда как среди мясного скота распространённость существенно ниже – 18–32% в зависимости от типа содержания [101].

В Канаде, по данным мониторинговых программ CFIA (2016–2024 гг.), ВЛКРС регистрируют в 86,9–89,4% молочных хозяйств при средней индивидуальной серопозитивности 37% [102].

В большинстве государств–членов ЕС (15 из 27) достигнут официальный статус свободы от энзоотического лейкоза КРС в рамках Директивы 64/432/ЕЕС [34]. Однако в ряде стран Восточной Европы инфекция продолжает активно циркулировать: распространённость на уровне животных составляет от 15 до 61%, с наиболее высокими показателями в Украине (28–61%), Румынии (26–52%) и Молдове (35–58%) [103,104].

Австралия и Новая Зеландия успешно реализовали национальные программы эрадикации ВЛКРС, начатые в конце 1980–х – 1990–х годах, и к настоящему времени сохраняют статус практически свободных от инфекции стран с остаточной распространённостью менее 0,5% [4,7,105].

В Южной Америке регистрируют одни из самых высоких в мире уровней распространённости ВЛКРС. В Аргентине серопозитивность достигает 77,4% на уровне животных и 90,9% на уровне стад; в Бразилии – 48–72% в зависимости от региона; в Уругвае – 46–68% [7,100,106].

В странах Азии распространённость ВЛКРС среди молочного скота, как правило, составляет 15–45%. В Японии серопозитивность молочного скота

оценивается в 34,7%, в Южной Корее – 28–45%, в Китае – 18–42% в интенсивных мясомолочных комплексах северных провинций [7,107,108].

В Африке и на Ближнем Востоке данные ограничены, однако имеющиеся исследования указывают на распространённость от 8 до 54% на уровне животных, с наиболее высокими показателями в южноафриканских молочных стадах (32–54%) [4,7,109].

В Российской Федерации по данным Департамента ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (2015–2024 гг.) распространённость ВЛКРС в целом по стране составляет 6–7% от общего поголовья крупного рогатого скота (animal-level – примерно 924 тысячи из 15,5 миллионов животных) [110]. Эта цифра скрывает значительную региональную вариабельность: Сибирский федеральный округ (включая Новосибирскую область) демонстрирует 12–22% поражённости животных, в Уральском федеральном округе – 8–15%, в Приволжском федеральном округе – 5–11%, в Центральном федеральном округе – 3–8%, в европейской части – 2–6% [110,111]. В молочных стадах Свердловской и Кировской областей показатели поражённости лейкозом коров выше – 15–25% поголовья [110]. Немаловажно что, ВЛКРС остаётся одной из наиболее экономически значимых инфекций крупного рогатого скота в Российской Федерации.

Генетическая изменчивость ВЛКРС относительно невелика по сравнению с другими РНК-вирусами: вирус реплицируется преимущественно путем клонирования провируса вместе с делящимися лимфоцитами, что ограничивает частоту мутаций (см. раздел 1.1 и 1.2) [7]. Тем не менее, длительная эволюция ВЛКРС привела к формированию нескольких филогенетических линий (генотипов) вируса, которые выявляются при сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей вируса из разных географических регионов.

На основании анализа последовательностей гена gp51 ВЛКРС Rodriguez с коллегами продемонстрировали, что циркулирующие в мире штаммы ВЛКРС

можно разделить на 7 различных генотипов [112]. Впоследствии на основании филогенетического анализа последовательностей гена *gp51* был выявлен генотип 8 в образцах ВЛКРС из Хорватии [111]. Генотипы 9 и 10 были выявлены в Боливии, Таиланде и Мьянме [106]. В 2018 году в Китае был описан 11 генотип ВЛКРС [108]. В январе 2022 года появилось сообщение о наличии нового, 12 генотипа, выделенного в Казахстане [99] (см. рисунок 4).

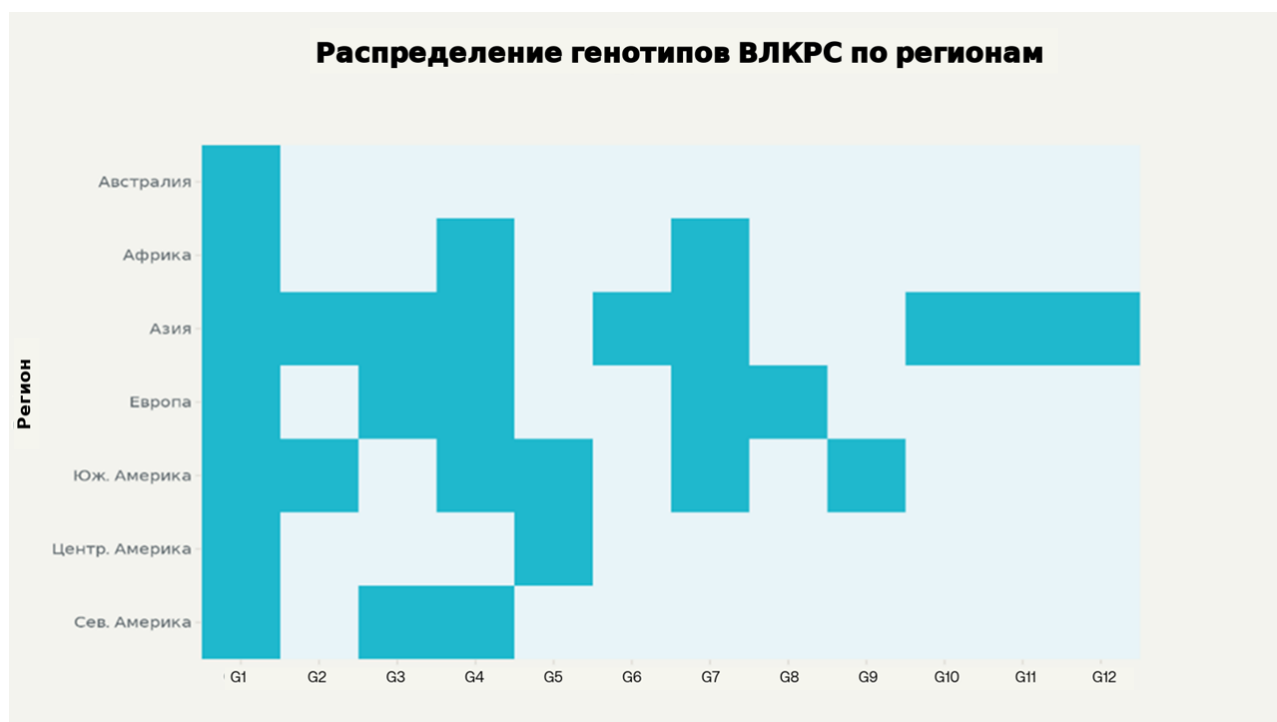


Рисунок 4 – Глобальное распределение генотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) по континентам и регионам

Ниже в Таблице 1 обобщено встречаемость 12 известных генотипов ВЛКРС по регионам мира:

Таблица 1 – Распределение всех известных генотипов ВЛКРС по регионам мира

Генотип ВЛКРС	Основные регионы
G1 (генотип 1)	Всемирно встречающийся и доминирующий генотип; выявляется на всех обитаемых континентах, включая Европу, Северную и Южную Америку, Азию, Африку и Океанию. G1 – наиболее древняя и широко встречающаяся клада, к которой принадлежит референсный штамм FLK–ВЛКРС.
G2 (генотип 2)	Преимущественно Южная Америка (аргентинские, бразильские штаммы и др.); редко встречается в Азии (отмечен в Японии как единичный случай).
G3 (генотип 3)	Южная Америка (некоторые штаммы в Аргентине, Бразилии) и Восточная Азия (выявлен в Японии, Республике Корея).
G4 (генотип 4)	Восточная Европа и Северная Азия: характерен для России, Украины, Беларуси, стран Балтийского бассейна. Также выявлен в Монголии и некоторых соседних регионах. Недавно обнаружен в Китае (Нинся, Хэнань) ввиду завоза скота с территории России. По актуальным данным G4 – второй по встречаемости генотип ВЛКРС в мире после G1.
G5 (генотип 5)	Центральная и Южная Америка: обнаружен преимущественно в Бразилии и Центральной Америке (Коста-Рика). В других регионах встречается редко.
G6 (генотип 6)	Широко представлен в Азии: зафиксирован в Китае, Японии, Юго-Восточной Азии (Таиланд, Филиппины, Мьянма) и на Ближнем Востоке (Иордания). Также встречается в некоторых странах Южной Америки (Перу, Боливия).
G7 (генотип 7)	Восточная Европа: эндемичен для Балканского и Причерноморского региона, преобладает в Молдавии, встречается в Украине, Румынии, а также в западной части России. Обнаружен в Монголии (импорт из Восточной Европы). Первоначально генотип G7 был описан в Италии, однако наиболее широкую встречаемость получил на востоке Европы.
G8 (генотип 8)	Восточная Европа: выявлен в Польше, Хорватии и в соседних странах; присутствует также в некоторых популяциях скота в России. Редко зафиксирован за пределами Европы.
G9 (генотип 9)	Южная Америка: генотип, обнаруженный в Боливии. Позже штаммы G9 выявлены также в Перу и Парагвае; встречаемость ограничена андским регионом.
G10 (генотип 10)	Центральная и Восточная Азия: зафиксирован в Китае, Мьянме, Таиланде, а также в отдельных случаях на Ближнем Востоке (например, в Иордании).
G11 (генотип 11)	Восточная Азия: обнаружен только в Китае (описан в 2018 г. в провинции Синьцзян у яков). Вне Китая генотип G11 не выявлен.
G12 (генотип 12)	Центральная Азия: выявлен только в Казахстане (новейший генотип, описан в 2022 г. в северном Казахстане). Случаев G12 за пределами Казахстана пока не зарегистрировано.

Геновариантное разнообразие ВЛКРС демонстрирует выраженную географическую структуру, отражающую исторические пути миграции скота, локальную эволюцию вируса и эффект географической изоляции популяций.

Наиболее универсальный G1 присутствует практически на всех континентах, выявляясь во всех обитаемых регионах [113]. В то же время ряд геновариантов проявляют выраженную региональную локализацию: G8 ограничен Восточной Европой, G5 и G9 – Латинской Америкой, G11 выявлен исключительно в Китае (провинция Синьцзян), G12 – только в Казахстане [4,7,99,106,108,111].

В Европе циркулирует пять различных геновариантов ВЛКРС (G1, G3, G4, G7, G8), что отражает сложные торговые потоки скота и исторические контакты между регионами [7]. В Австралии и Новой Зеландии в редких случаях обнаруживают только геновариант G1, что является результатом успешных программ эрадикации и строгого контроля импорта. В Северной Америке регистрируют преимущественно геноварианты G1 и G4 (реже G3), в Центральной Америке – геноварианты G1 и G5 [2]. Наибольшее геновариантное разнообразие выявляется в Азии (G1, G3, G4, G6, G10, G11 – до 6 различных линий ВЛКРС одновременно, особенно в Китае) и Южной Америке (G1, G2, G4, G5, G7, G9), что указывает на эти регионы как на потенциальные центры генотипической диверсификации ВЛКРС [8,9].

Молекулярные исследования вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) в России по-прежнему опираются в основном на анализ отдельных фрагментов провирусного генома, прежде всего участка гена env. В большинстве работ усилия сосредоточены на сравнительно коротких отрезках длиной примерно 300–450 пар нуклеотидов, а более протяжённые фрагменты порядка 800–1000 пар нуклеотидов используются заметно реже [111]. Эти последовательности позволяют уверенно решать задачи базового генотипирования и сравнивать российские геноварианты с зарубежными, но всё же дают лишь фрагментарное представление о геномном разнообразии ВЛКРС внутри страны. В международной базе GenBank российские данные представлены главным образом частичными последовательностями; в период с 2010 по 2023 было депонировано 414 образцов от сторонних организаций, длина данных фрагментов в основном была представлена последовательностями 300–450 пар нуклеотидов (82,5% от общего

числа) и 800 пар нуклеотидов и более (17,5%, данные последовательности были депонированы в период с 2010 по 2012) [114]. Полноразмерных провирусных геномов, однозначно аннотированных как генотипы из России, там сейчас практически нет, и это заметно ограничивает возможности для более глубокого сравнительного и эволюционного анализа [115]. Для диагностики ВЛКРС в Российской практике применяются преимущественно ПЦР–тест–системы в реальном времени, которые обеспечивают надёжное качественное, но не количественное выявление провирусной ДНК ВЛКРС, тогда как опубликованные данные об использовании цифровой ПЦР (цПЦР) именно для генотипов ВЛКРС, происходящих от крупного рогатого скота в хозяйствах РФ, отсутствуют, так же как и разработанные и внедрённые в рутинную ветеринарную практику отечественные цПЦР–тест–системы для количественной оценки провирусной нагрузки при ВЛКРС [116].

На территории Российской Федерации и стран СНГ описана циркуляция не менее 6–ти геновариантов ВЛКРС, при этом наблюдается значительная вариабельность их представленности внутри страны [7]. В Центральном федеральном округе РФ выявлены геноварианты G1, G2 и G4, которые на основании молекулярно–генетического анализа разделены на субтипы с различной степенью гомологии к провирусам из Казахстана, США, Аргентины и Бразилии [117]. В Уральском регионе исследованные ВЛКРС отнесены к геновариантам G1, G4 и G7, в Республике Татарстан помимо G1 и G4 выявлен также и G7 [118]. В Ставропольском крае были выделены генотипы G4 и G6, а в Московской области помимо широко встречающихся G1 и G4 были обнаружены штаммы G8 генотипа [119]. Эти работы позволили охарактеризовать географическое распределение генотипов на основе короткого (около 400–450 п.н.) фрагмента гена *env–gp51*, но не дают представления о полном геномном разнообразии ВЛКРС в России.

Эта структура встречаемости генетических вариантов ВЛКРС может быть связана с импортом крупного рогатого скота: основными поставщиками крупного рогатого скота в Россию остаются страны Южной Америки – Бразилия, Парагвай

и Аргентина, а также ЕАЭС–партнёры, в первую очередь Беларусь[120]. Кроме того, важным источником генетического материала исторически были поставки из США и Австралии (в меньшем объёме).

Совокупные филогенетические данные подтверждают решающее влияние географической изоляции на эволюцию ВЛКРС: вирусные линии формировались в отдалённых и географически обособленных популяциях крупного рогатого скота независимо друг от друга в течение длительного периода времени. Однако глобализация торговли скотом в период после 2000 г привела к заметному смещению геновариантов в некоторых регионах, особенно в странах с активным импортом скота (например, в Китае в настоящее время циркулирует до 6 различных геновариантов одновременно, что отражает импорт животных из разных стран).

1.5 Особенности аминокислотных последовательностей и структуры белков ВЛКРС различных генотипов

Все известные геноварианты ВЛКРС сохраняют одинаковую организацию генома и функциональный набор белков (см. раздел 1.2). Однако в процессе глобальной эволюции вируса, особенно под давлением локальных иммунных систем хозяев, накопились генотип–специфичные аминокислотные замены, преимущественно в иммунодоминантных регионах гена *env*. Эти замены отражают адаптивную эволюцию вируса и объясняют, почему различные генотипы имеют различную патогенность и эпизоотологические характеристики.

Ген *env*, кодирующий поверхностные гликопротеины *gp51* и *gp30*, демонстрирует наивысшую степень полиморфизма среди всех регионов генома и служит основной мишенью для генотипирования ВЛКРС. Напротив, гены структурных белков (*gag*, *pol*) и регуляторные элементы (*LTR*) сохраняют относительно высокую консервативность, отражая строгие функциональные ограничения.

Генотип G4, один из доминирующих в Европе и странах Восточной Европы (Польша, Украина, Россия, Казахстан), а также широко представленный в Азии и

Южной Америке, характеризуется умеренной внутригенотипической вариабельностью env-гена при высокой консервативности иммунодоминантных участков gp51. Анализ последовательностей gp51 полевого генотипа G4 показал, что вариации аминокислот преимущественно локализуются в нейтрализующих доменах и В-клеточных эпитопах, однако для большинства позиций соотношение dN/dS указывает на преобладание отрицательного отбора, что согласуется с ключевой ролью этих участков в связывании рецептора и распознавании антителами [121]. В то же время ряд исследований отмечает наличие точечных замен в CD4+ и CD8+ Т-клеточных эпитопах gp51 и в цитоплазматическом хвосте трансмембранного белка gp30, которые рассматриваются как потенциальные маркеры адаптации отдельных линий G4 к иммунному давлению хозяина и могут ассоциироваться с различиями в клиническом течении инфекции и эффективности серологической диагностики [121].

Генотип G7, встречающийся в Восточной Европе (Балканский и Причерноморский регион, Молдавия, Украина, Румыния, Россия), несмотря на относительно низкую внутригенотипическую вариабельность (до 3% нуклеотидных различий между геновариантами), демонстрирует адаптивные замены в конформационном эпитопе G gp51, выявленные филогенетическими методами (dN/dS) как сайты положительной селекции [103,111]. Это указывает на активную эволюцию генотипа G7 под иммунным давлением локальных популяций хозяев, хотя выраженной лейкозогенности, подобной G4, вирус не демонстрирует.

Ген tax кодирует главный онкогенный фактор и демонстрирует высокую консервативность в целом, однако отдельные точечные мутации оказывают существенное влияние на клинический фенотип инфекции. Замена L233P коррелирует с повышенной лейкозогенностью у крупного рогатого скота, усиливая способность вируса трансформировать В-лимфоциты; E303K приводит к полной потере инфекционности *in vivo* из-за снижения транскрипционной активности промотора LTR и индукции провируса; E51G в цинковых пальцах Tax ассоциирована с повышенным количеством лейкоцитов у инфицированных

животных, что может отражать усиленную пролиферацию инфицированных В-клеток [83,122].

Мутации в 5'-LTR влияют на репликацию вируса через изменение способности взаимодействия клеточных транскрипционных факторов с регуляторными элементами: T175C внутри ТАТА-бокса связана с повышенной вирусной продуктивностью *in vitro* и трансмиссивностью ВЛКРС в естественных условиях; G148A в элементе PU.1/ETS приводит к снижению активности LTR и коррелирует с более низкой провирусной нагрузкой у инфицированных животных, демонстрируя прямую связь между регуляторными вариациями и клиническим фенотипом [83,123].

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в генах вирусных миРНК (пре-миРНК-B2, -B3, -B4 и -B5) существенно влияют на клиническое течение инфекции, особенно на количество лейкоцитов у инфицированного скота, так как показано, что даже незначительные вариации в некодирующих регуляторных элементах могут модулировать патогенез ВЛКРС [123].

Долгое время ВЛКРС рассматривался как относительно гомогенный вирус с низкой внутрихозяйственной вариабельностью, однако определение первичной структуры ДНК методом Сэнгера фрагмента гена *env* (примерно 800 п.н. участка *gp51*) показало квазивидовую организацию вирусной популяции [64]. При анализе 16 провирусов из Западной Сибири и Южного Урала у 14 животных выявлена практически гомогенная популяция (0–0,1% нуклеотидных различий внутри *env*-фрагмента), тогда как у двух животных отмечена гетерогенность 2,0–2,1%, соответствующая межгенотипическому уровню расхождений, что свидетельствует о наличии внутривидовых квазивидов и возможной коинфекции различными геновариантами ВЛКРС на разных стадиях инфекции [64].

Присутствие квазивидов в этих двух случаях характеризовалось множественными независимыми кластерами последовательностей, отражающими высокий уровень внутрихозяйственной гетерогенности, потенциально связанной с

ранней фазой инфекции, когда активная обратная транскрипция генерирует высокую мутационную нагрузку (см. пункт 1.2).

Экспериментальные исследования на овцах показали, что во время первичной инфекции мутации, генерируемые обратной транскриптазой, составляют до 69% провирусной генетической variability на внутрихозяйственном уровне. По мере развития адаптивного иммунного ответа варианты вируса с мутациями в иммунодоминантных эпитопах (G и H в gp51) подвергаются положительной селекции, формируя адаптированные формы, способные ускользать от иммунного надзора [63].

В стадах с высокой серопревалентностью ВЛКРС (около 75%) и совместной циркуляцией нескольких генотипов животные могут быть инфицированы одновременно или последовательно геновариантами разных генотипов. Ранние исследования выявили восемь случаев рекомбинации между генотипами G4 и G7, при этом точки рекомбинации локализованы в функционально значимых доменах gp51: CD4⁺ Т-клеточный эпитоп (позиция 240 п.н.), нейтрализующий домен ND3 (позиция 542 п.н.), CD8⁺ Т-клеточный эпитоп (позиция 400 п.н.) [64,76,124]. Рекомбинация между генотипами может привести к возникновению новых генотипов или субгенотипов с уникальными антигенными свойствами и потенциально изменённой вирулентностью, что требует постоянного мониторинга циркулирующих вариантов.

1.6 Диагностика инфекции, вызываемой вирусом лейкоза крупного рогатого скота

Для диагностики каждой из стадий инфекции применяют два основных подхода: непрямые методы (серологические тесты – реакция иммунодиффузии РИД и иммуноферментный анализ ИФА), выявляющие специфические антитела против антигенов ВЛКРС. И прямые методы (молекулярно-генетические тесты – ПЦР, ПЦР в реальном времени РВ-ПЦР, цифровая ПЦР цПЦР), детектирующие провирусную ДНК ВЛКРС непосредственно в геномной ДНК инфицированных лимфоцитов. Успех мероприятий по оздоровлению неблагополучных хозяйств во

многим определяется чувствительностью, специфичностью, точностью и практичностью методов диагностики.

Исторически, до широкого внедрения серологических методов, диагностика лейкоза КРС базировалась на клинико–гематологических и патоморфологических методах, которые включали обнаружение увеличенных поверхностных и внутренних лимфатических узлов, опухолевых разрастаний, изменений селезёнки и оценку лейкоцитарной формулы крови [35]. Однако эти методы не способны распознать заболевание на ранних стадиях, так как клинические признаки и гематологические изменения проявляются лишь при развитии персистентного лимфоцитоза или опухолевой стадии, и в большинстве случаев схожи с другими заболеваниями, что не позволяет достоверно выявить всех инфицированных животных.

Согласно Приказу Министерства сельского хозяйства РФ от 24.03.2021 № 156 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий», для установления наличия или отсутствия ВЛКРС у животного рекомендуется использовать методы РИД, ИФА и ПЦР [125]. Выбор метода диагностики зависит от целей тестирования, стадии инфекционного процесса, возраста животных, экономических факторов и доступности лабораторного оборудования.

Реакция иммунодиффузии в геле агара (AGID – agar gel immunodiffusion) является одним из наиболее простых, легко воспроизводимых и удобных для практического применения серологических методов диагностики ВЛКРС и на протяжении десятилетий служила основой программ контроля лейкоза во многих странах мира [126,127]. Метод основан на взаимодействии антигена и антител, которые, диффундируя в плоском слое 0,8–1,0% геля агара (приготовленного на трис–HCl или боратном буфере с pH 7,2–8,6 и содержащем 8,0–8,5% NaCl), образуют преципитат, проявляющийся в виде чёткой линии преципитации [128].

Преимущества РИД включают: простоту постановки и интерпретации результатов (результат оценивается визуально по наличию или отсутствию линий преципитации); низкую стоимость реагентов и отсутствие необходимости в специализированном оборудовании; высокую специфичность (при правильной стандартизации антигена ложноположительные результаты редки); стабильность реагентов при хранении.

Однако метод РИД обладает существенными ограничениями. Во-первых, низкая аналитическая чувствительность: РИД не позволяет выявлять инфицированных ВЛКРС животных на ранних стадиях заболевания, так как уровень антител в крови может быть ниже порога чувствительности метода [23]. Исследования показывают, что диагностическая чувствительность РИД составляет лишь 57,9–83,7% при сравнении с более чувствительными методами, такими как ИФА и ПЦР [129]. Во-вторых, длительность получения результата (24–72 часа) затрудняет быстрое принятие решений в эпизоотологических ситуациях. В-третьих, РИД демонстрирует низкую воспроизводимость результатов: в одном исследовании 22 из 410 образцов (5,4%) показали несогласованные результаты при двух независимых измерениях РИД [130]. Наконец, субъективность визуальной оценки линий преципитации может приводить к разночтениям между операторами, особенно при слабых положительных реакциях.

Сравнительные исследования показали, что использование РИД в качестве единственного метода для программ оздоровления стад нецелесообразно, поскольку при истинной распространённости ВЛКРС 28–100% этот тест выявлял лишь 0 – 86% инфицированных животных и пропускал значительную часть носителей вируса [128]. Таким образом, процесс оздоровления поголовья с использованием исключительно РИД будет длительным из-за встречаемости инфекции среди носителей, демонстрирующих ложноотрицательные результаты РИД-анализа.

Иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay) основан на связывании специфических антител из сыворотки крови или

молока животного с иммобилизованными на твёрдой фазе (микропланшете) рекомбинантными или нативными антигенами ВЛКРС (преимущественно gp51 или p24), с последующей детекцией комплекса антиген–антитело с помощью фермент–меченых вторичных антител и хромогенного субстрата.

Ключевые преимущества ИФА включают: высокую аналитическую чувствительность – ИФА способен детектировать антитела в значительно более низких концентрациях, чем РИД, что позволяет выявлять инфекцию на более ранних стадиях сероконверсии; объективность и автоматизацию – результаты оцениваются количественно с помощью спектрофотометра по оптической плотности (OD), что исключает субъективность визуальной оценки и позволяет автоматизировать все этапы диагностики; высокую пропускную способность – возможность одновременного тестирования большого количества образцов (обычно 96–384 на один планшет) делает ИФА оптимальным для массового скрининга стад; малый объём исследуемого материала (обычно 10–50 мкл сыворотки) позволяет проводить тестирование даже при ограниченном количестве биоматериала; быстроту получения результата [4,60,131].

Производители коммерческих наборов для ИФА заявляют диагностическую чувствительность 91,1–98% и специфичность 100% при тестировании на отобранных контрольных панелях сывороток [132,133]. Сравнительные исследования подтверждают значительное преимущество ИФА перед РИД: в болгарском исследовании 410 образцов ИФА выявил 57 серопозитивных животных (13,9%), тогда как РИД – лишь 33 животных (8,0%), демонстрируя чувствительность РИД всего 57,9% относительно ИФА [134]. В другом исследовании ИФА детектировал 58,2% (193 из 332) животных как позитивных, тогда как РИД – только 29,2–45,2% [128].

Несмотря на значительные преимущества, ИФА обладает рядом ограничений. Положительный результат ИФА не является достаточным доказательством интеграции провирусной ДНК ВЛКРС в геном клеток животного, так как метод детектирует лишь присутствие антител. ИФА не применим для

тестирования молодняка младше 6 месяцев, поскольку телята получают колостральные (материнские) антитела при рождении через молозиво, которые могут циркулировать в крови до 6–9 месяцев, что приводит к ложноположительным результатам у неинфицированных телят. Вакцинация (в частности, вирусной диареи КРС и сибирской язвы) животных также может индуцировать неспецифическую конъюгацию антител с антигеном набора вследствие высокого уровня IgG в периферической крови, приводя к ложноположительным результатам [135,136].

Кроме того, особенности патогенеза ВЛКРС, включающие волнообразное изменение уровня антител у одного и того же животного в процессе развития заболевания, а в некоторых случаях полное отсутствие их образования (серонегативные носители, составляющие примерно 5–10% инфицированных животных), значительно затрудняют серологическую диагностику [4,137,138]. Серонегативность может быть обусловлена толерантностью организма к возбудителю вследствие внутриутробного заражения плода до развития иммунокомпетентности, либо инфицированием генетическими вариантами ВЛКРС, не вызывающими образование антител из-за отсутствия продукции вирусных частиц и выхода вируса в кровотоки [139,140].

Специфичность ИФА также может быть проблематичной в определённых ситуациях: в исследовании 97 стад специфичность ИФА составила 62%, но после коррекции на чувствительность и специфичность РИД (используемого как референс) истинная специфичность снизилась до 44%, что указывает на высокую частоту ложноположительных результатов и необходимость подтверждающего тестирования стад с положительным результатом ИФА [141].

Сравнительный анализ двух серологических методов демонстрирует, что ИФА существенно превосходит РИД по чувствительности, но оба метода имеют общие фундаментальные ограничения, связанные с невозможностью детекции инфекции на ранних стадиях (до сероконверсии) и неспособностью выявлять серонегативных носителей. Согласованность между РИД и ИФА варьирует от

73,8% до 91,93% с коэффициентом Каппа 0,48–0,62 (умеренное согласие), что отражает значительные различия в чувствительности методов [134,136].

Молекулярно–генетические методы диагностики ВЛКРС, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), открывают новые возможности для совершенствования диагностики и профилактики лейкоза, так как позволяют выявлять провирус ВЛКРС на ранних стадиях инфекционного процесса до образования антител в диагностических титрах, а также детектировать серонегативных носителей, которые остаются невыявленными серологическими методами.

Классическая ПЦР (обычно nested–PCR – двухраундовая ПЦР с двумя парами праймеров, гнездовая–ПЦР) с детекцией результатов методом гель–электрофореза была одним из первых молекулярных подходов к диагностике ВЛКРС. Метод основан на амплификации специфических участков провирусной ДНК ВЛКРС (преимущественно фрагментов генов env, pol или tax) с последующей визуализацией ПЦР–продуктов в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием или другими интеркалирующими красителями.

Преимущества ПЦР включают: прямую детекцию провирусной ДНК независимо от наличия антител, что позволяет тестировать телят младше 6 месяцев на фоне персистирующих колюстральных антител, выявлять серонегативных носителей и тестировать животных, предназначенных на экспорт/импорт; относительно низкую стоимость реагентов по сравнению с ПЦР в реальном времени; возможность визуального подтверждения специфичности ПЦР–продукта по его размеру и, при необходимости, секвенирования или рестрикционного анализа [142–144].

Исследования показали, что гнездовая–ПЦР демонстрирует более высокую чувствительность, чем серологические методы. В болгарском исследовании две версии гнездовой–ПЦР выявили 56 позитивных животных из 409, тогда как РИД – лишь 33, при почти полной согласованности гнездовой–ПЦР с ИФА (56 против 57

позитивных образцов, $\kappa = 0,99$). В российском исследовании ПЦР с праймерами на гены *gp51* и *p24* превзошла РИД на 13,5–14,4% и ИФА на 6,1–7,0% по частоте выявления позитивных животных [134,145].

ПЦР в реальном времени (real-time PCR, qPCR, РВ–ПЦР) является наиболее распространённым методом молекулярной диагностики ВЛКРС и представляет собой значительное технологическое усовершенствование классической ПЦР. Метод позволяет объединить этапы амплификации и детекции результатов в одном замкнутом цикле, что исключает необходимость проведения гель–электрофореза и снижает риск контаминации.

Преимущества РВ–ПЦР включают: количественный анализ – возможность определения абсолютного или относительного числа копий провирусной ДНК ВЛКРС в образце, что критически важно для оценки стадии инфекции, прогнозирования риска развития лимфомы и мониторинга эффективности контрольных мероприятий; высокая чувствительность – современные коммерческие тест–системы способны обнаруживать от 2–20 копий ДНК ВЛКРС в пробе; быстрота – время проведения анализа составляет 1,5–3 часа; закрытый формат – отсутствие необходимости открывать пробирки после амплификации значительно снижает риск контаминации; автоматизация – возможность программирования термоциклеров и автоматической обработки данных специализированным программным обеспечением [146–149].

Однако РВ–ПЦР не лишена ограничений. Межлабораторная вариабельность количественной оценки PVL остаётся значимой проблемой: в сравнительном исследовании шести протоколов, используемых в лабораториях Аргентины, Бельгии, Германии, Японии, Польши и Великобритании, коэффициенты согласия (каппа) варьировали лишь от 0,220 до 0,575, а корреляция количественных результатов была умеренной (τ Кендалла = 0,514). К ключевым факторам такой вариабельности относятся выбор целевого гена (*pol* versus *tax*, причём *tax*–основанная РВ–ПЦР демонстрировала наименьшую чувствительность), различия в последовательностях участков праймеров и зондов между генотипами ВЛКРС,

особенности нормализации по референсным генам (BoLA–DRA, RPP30, GAPDH), а также влияние ПЦР–ингибиторов, присутствующих в клинических матриксах и снижающих эффективность амплификации [147,150].

Для преодоления проблемы генетической вариабельности были разработаны усовершенствованные РВ–ПЦР протоколы, использующие вырожденные (дегенеративные) праймеры и смешанные зонды (CoCoMo – Consensus–Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers), сконструированные на основе выравнивания последовательностей всех известных генотипов ВЛКРС. Такие тест–системы демонстрируют значительно более высокую чувствительность (на 5,4% больше детектированных позитивных образцов) по сравнению с традиционной гнездовой–ПЦР и способны выявлять мутантные геноварианты, которые ранее оставались незамеченными [149,151].

Цифровая ПЦР (digital PCR, dPCR, цПЦР) представляет собой революционное развитие технологии ПЦР и в настоящее время начинает вытеснять РВ–ПЦР для количественной оценки нуклеиновых кислот. Основной особенностью цифровой ПЦР является проведение реакции амплификации в тысячах или миллионах ультрамалых объёмов (капель размером $\geq 0,34$ нл для droplet digital PCR, ddPCR, или нанолитровых реакционных ячеек для chip–based dPCR) и детекция ПЦР–продуктов в этих объёмах независимо друг от друга.

Принцип работы цифровой ПЦР основан на предельном разведении (limiting dilution): образец геномной ДНК, содержащий целевые молекулы (провирусная ДНК ВЛКРС), смешивается с ПЦР–реагентами (праймеры, зонд, полимеразы, dNTP, буфер) и разделяется на десятки тысяч индивидуальных микролунок (капель в эмульсии масло–в–воде или микрокамер на чипе) таким образом, что каждая микролуночка содержит либо 0, либо 1, либо несколько копий целевой молекулы. После проведения ПЦР–амплификации каждая микролуночка анализируется индивидуально на наличие флуоресцентного сигнала: позитивные микролуночки (содержавшие хотя бы одну копию целевой ДНК) демонстрируют высокую

флуоресценцию, тогда как негативные (не содержавшие целевую ДНК) остаются нефлуоресцентными [152].

Ключевые преимущества цифровой ПЦР перед классической ПЦР и РВ–ПЦР включают исключительно высокую эффективность детекции редких молекул–мишеней (LoD 3–3,3 копии/мкл, что позволяет выявлять ВЛКРС уже через 6 дней после экспериментального заражения и обнаруживать низкую PVL, недоступную для РВ–ПЦР), абсолютную количественную оценку без внешних стандартных кривых (PVL по цПЦР для одних и тех же образцов в среднем в 2 – 4 раза выше, чем по РВ–ПЦР), высокую точность и воспроизводимость (коэффициент вариации <10% и объективная интерпретация результатов на основе распределения Пуассона), устойчивость к ингибиторам ПЦР (сохраняется высокая корреляция результатов для очищенной и непурифицированной ДНК, $r \approx 0,906$), а также возможность детектировать минорные варианты, проводить мультиплекс–анализ и снижать риск контаминации за счёт закрытого формата реакций [152–154].

Сравнительные исследования демонстрируют следующую иерархию диагностической чувствительности при ВЛКРС: цифровая ПЦР > РВ–ПЦР > гнездовая–ПЦР > ИФА > РИД; при этом чувствительность цПЦР достигает 100%, РВ–ПЦР – 93–98%, гнездовая–ПЦР – 87–99%, ИФА – 91–98%, тогда как РИД обеспечивает лишь 58–84% [129,133,153,155]. Предел детекции и диапазон количественного определения также наиболее благоприятны для цПЦР (LoD 3,3 копии/мкл, LoQ 11 копий/мкл) по сравнению с РВ–ПЦР (6–20 копий/мкл) и гнездовая–ПЦР (15–50 копий/реакцию). На текущий момент применение цифровой ПЦР для диагностики ВЛКРС остаётся в основном предметом научных разработок, но её высокая чувствительность и точность открывают перспективы для выявления ранних и малосимптомных носителей с крайне низкой PVL, которые ускользают от серологических методов и РВ–ПЦР [4,151,153].

1.7 Современные методы профилактики и контроля ВЛКРС

Профилактика и контроль распространения лейкоза крупного рогатого скота основываются на комплексном подходе, включающем различные стратегии в

зависимости от эпидемиологической ситуации в регионе. В настоящее время не существует коммерчески доступной вакцины против ВЛКРС, поэтому основой борьбы с инфекцией является выявление и элиминация/изоляция инфицированных животных.

Основные подходы к контролю ВЛКРС включают три стратегии: "тест и выбраковка" (test and eliminate), "тест и сегрегация" (test and segregate) и "тест и менеджмент" (test and manage) [156]. Выбор стратегии зависит от уровня инфицированности стада, экономических возможностей хозяйства и целей производства.

Стратегия "тест и выбраковка" является наиболее эффективной для достижения статуса свободного от ВЛКРС стада. Она включает регулярное тестирование всех животных и немедленную выбраковку положительных животных. Эта стратегия требует минимальных инвестиций в инфраструктуру и позволяет достичь свободного от ВЛКРС статуса в относительно короткие сроки. Однако она может стать экономически неэффективной при высоких уровнях инфицированности и требует официальной компенсационной политики для успешного внедрения [46,156].

Стратегия "тест и сегрегация" предполагает выявление и изоляцию инфицированных животных в отдельные группы с отдельным содержанием инфицированного и неинфицированного поголовья. Это позволяет сохранить инфицированных животных для производства, но требует значительных инвестиций в дублирование помещений и оборудования, а также постоянного мониторинга [26,156].

Стратегия "тест и менеджмент" основана на принятии биобезопасных мер для минимизации передачи инфекции без выбраковки инфицированных животных. Она является наиболее экономически эффективной, но требует строгого соблюдения профилактических мер и долгосрочной приверженности программе [5,156,157].

Ключевые элементы профилактики включают контроль за передачей инфекции через кровь и биологические жидкости. Необходимо использование одноразовых игл и инструментов, дезинфекция оборудования между животными, контроль за переливанием крови [156].

Особое внимание уделяется предотвращению вертикальной передачи инфекции от матери к потомству. Рекомендуется использование молозива и молока от неинфицированных коров, искусственное вскармливание телят от инфицированных матерей, контроль за трансплацентарной передачей инфекции [156].

Молекулярно–генетические подходы к профилактике включают селекцию на устойчивость к ВЛКРС. Установлено, что определенные аллели гена BoLA–DRB3 ассоциированы с повышенной устойчивостью к развитию персистентного лимфоцитоза. Использование генотипирования по локусу BoLA–DRB3 позволяет создавать более устойчивые к лейкозу популяции крупного рогатого скота (см. раздел 1.3) [77,158,159].

Создание эффективной вакцины против ВЛКРС осложняется ретровирусной природой возбудителя нужно полностью предотвратить первичную инфекцию, поскольку удалить интегрированный провирус из организма практически невозможно. За последние десятилетия были испытаны инактивированные вакцины (на основе FLK–культур), белковые и пептидные препараты, ДНК–и векторные вакцины, а также живая аттенуированная вакцина pBLV6073ΔX, показавшая высокую эффективность и безопасность в условиях эндемичного стада, однако ни один из этих подходов не получил широкого внедрения из-за неполной или непродолжительной стимуляции иммунного ответа, требований биобезопасности для живого модифицированного вируса и отсутствия коммерческого интереса со стороны производителей [160–163]. Тем не менее, вакцинация остаётся потенциально ключевым инструментом контроля ВЛКРС, особенно в странах с высокой распространённостью инфекции и ограниченными возможностями для программ тестирования и выбраковки, но её практическая

реализация сдерживается высокими затратами на производство по стандартам GMP/GLP, сложными регуляторными процедурами и юридическими рисками, а также тем, что в ряде развитых стран заболевание уже контролируется без вакцин за счёт строгих санитарных программ [2,49,161,164].

Практическая значимость разработки коммерчески успешной вакцины против ВЛКРС колоссальна: внедрение такой вакцины может сократить сроки оздоровления хозяйств от нескольких лет до нескольких месяцев за счёт выявления и эффективной защиты от инфекции всех животных, включая серонегативных носителей и животных на ранних стадиях инфекции. Отсутствие эффективной коммерчески доступной вакцины делает развитие альтернативных методов диагностики и контроля (включая молекулярные методы высокой чувствительности, такие как цифровая ПЦР) критически важными для снижения экономических потерь от ВЛКРС.

1.8 ВЛКРС как фактор возникновения онкологических заболеваний человека

Рак молочной железы остаётся вторым по распространённости видом онкологии среди женщин в мире, с ежегодной заболеваемостью 2,1 миллиона случаев и смертностью 685 000 человек [165]. По данным различных исследований вирусы играют существенную роль в развитии опухолевых процессов, будучи связанными с 15–20% всех злокачественных новообразований [166,167].

Несмотря на то, что Всемирная организация здравоохранения признаёт онкогенный потенциал ряда вирусов (вирусы папилломы человека, вирусы герпеса, гепатитов В и С), вопрос о потенциальной роли вируса лейкоза крупного рогатого скота как фактора возникновения онкологических заболеваний у человека вызывает активные научные дискуссии и требует тщательного анализа накопленных данных [168–170].

Экспериментальные исследования последних десятилетий убедительно демонстрируют способность ВЛКРС инфицировать различные типы клеток

человека *in vitro*. Ещё в 1976 году было показано, что ВЛКРС способен инфицировать клеточные линии, полученные от человека, приматов, собак, овец и коз, с наблюдаемой продукцией полноценных вирусных частиц. В более современных исследованиях, проведённых методом сокультивирования клеток животных с подтверждённой ВЛКРС, было продемонстрировано, что семь из девяти протестированных линий человеческих клеток были подвержены инфицированию ВЛКРС, о чём свидетельствовали положительные результаты гнездовой–ПЦР на протяжении трёхмесячного периода культивирования [171,172].

Особенно значимым результатом было установление способности ВЛКРС к стабильной длительной инфекции в двух человеческих клеточных линиях: iSLK (эндотелиальные клетки) и MCF–7 (клетки аденокарциномы молочной железы), обе из которых демонстрировали наличие как цитоплазматической, так и ядерной вирусной ДНК по данным *in situ* ПЦР после трёхмесячного периода культивирования и даже после процедур замораживания–оттаивания [171]. Интересно, что в то время как, обе линии (MCF–102A – немалигнизированные клетки и MCF–7 – раковые клетки молочной железы) были восприимчивы к инфицированию ВЛКРС, только MCF–7 клетки способны были поддерживать стабильную продуктивную инфекцию, сопровождаемую образованием синцития и многоядерных клеток, что указывает на видо– и типоспецифичность репликативной способности вируса в различных клеточных культурах [171].

В отличие от экспериментальных моделей, прямое обнаружение ВЛКРС в тканях человека стало возможным благодаря молекулярно–генетическим методам диагностики. Группа исследователей под руководством G. Buehring первой в 2006 году сообщила об идентификации ДНК ВЛКРС в образцах ткани молочной железы человека. Используя гнездовую ПЦР с последующим определением первичной структуры ДНК методом Сэнгера, исследователи выявили ВЛКРС ДНК в 44% образцов парафиноэмбедированной ткани молочной железы. *In situ* ПЦР и иммуногистохимическое тестирование чётко локализовали вирус в секреторном эпителии молочной железы, и примечательно, что распределение ВЛКРС ДНК и

вирусного белка р24 было протоково– и доле–специфичным – практически все клетки в пределах конкретного протока или доли были позитивны на ВЛКРС, тогда как соседние протоки или доли могли быть полностью негативны, указывая на очаговую репликацию вируса в специфических анатомических компартментах молочной железы [173].

Обнаружение вирусных белков также подтверждало наличие активной вирусной инфекции: 6% из 215 образцов ткани молочной железы демонстрировали положительные результаты при иммуногистохимии на вирусный капсидный белок р24. Определение первичной структуры ДНК методом Сэнгера обнаруженных ДНК–последовательностей показало, что вариации от эталонной бычьей последовательности (G1 в данном случае) были редкими и ограничивались только точечными мутациями, что подтверждало генетическое тождество обнаруженных последовательностей известным штаммам ВЛКРС [173].

Впоследствии ВЛКРС ДНК была обнаружена в дополнительных биологических материалах от человека. В 2019 году впервые был сообщен случай обнаружения ВЛКРС ДНК в образцах человеческой крови, содержащих лейкоциты и тромбоциты, что имело важные последствия для понимания потенциальных маршрутов трансмиссии вируса между организмами. Это открытие предполагает, что циркулирующие заражённые лейкоциты могут служить эффективными переносчиками вируса для доставки в различные типы тканей и органов, что в контексте ВЛКРС–инфекции аналогично его хорошо задокументированному поведению в организме крупного рогатого скота (см. раздел 1.3) [174].

Одним из наиболее ярких эпидемиологических находок была серия исследований, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию между наличием ДНК ВЛКРС в ткани молочной железы и диагнозом рака молочной железы. В одном фундаментальном исследовании ДНК ВЛКРС была обнаружена в 59% образцов молочного эпителия женщин с раком молочной железы, по сравнению с 29% в контрольных образцах от здоровых женщин, что соответствовало отношению шансов (OR) 3,24 с 95% доверительным интервалом

(CI: 2,18–4,82). Особенно интересно, что в 69% образцов рака молочной железы была обнаружена провирусная ДНК ВЛКРС не только в самой опухолевой ткани, но и в сопровождающей немалигнизированной ткани эпителия [175].

Исследования, проведённые в разных странах, показали вариабельную, но воспроизводимую ассоциацию ВЛКРС с раком молочной железы: в Австралии ВЛКРС–ДНК выявляли у 80% пациенток с раком против 41% в контроле, при этом у 60,4% ВЛКРС–позитивных женщин без исходного рака он развился позже, тогда как среди ВЛКРС–негативных заболевание возникло лишь у 14,6%. В Колумбии ВЛКРС обнаруживали в 61,3% опухолей и в 48,2% контролей, в Бразилии – в 30,5% опухолевой ткани и 13,9% здоровых образцов (OR = 2,73; 95% CI 1,18–6,29; $p = 0,027$), в другом бразильском исследовании – в 95,9% опухолей против 59% контролей, в Пакистане – в 26,8% случаев рака (728/2710) против 10% в контроле (8/80), а в Иордании – в 18,4% образцов рака и 0% контрольных тканей, преимущественно в люминальных подтипах А и В [12,169,176–178].

Мета-анализ 12 исследований с моделью фиксированных эффектов показал объединённое отношение шансов (OR) 2,12 (95% ДИ 1,77–2,54), что соответствует примерно двукратному повышению риска рака молочной железы у ВЛКРС–инфицированных женщин; после исключения шести исследований, дававших наибольший вклад в гетерогенность (I^2 снижено с 72 до 22%), пересчитанное OR увеличилось до 3,92 (95% ДИ 2,98–5,16), указывая на более сильную и устойчивую ассоциацию в более однородной подгруппе работ [169]. Дополнительным аргументом служит продемонстрированный градиент позитивности ВЛКРС от нормальной ткани к предопухолевым изменениям и далее к DCIS (19,6%, 34,0% и 54,4% соответственно по данным Baltzell et al.), что согласуется с возможной ролью вируса в прогрессии ранних поражений [179]. Тем не менее, как и у крупного рогатого скота, где лишь 1–5% инфицированных животных при пожизненной провирусной инфекции развивают явную лимфому, ВЛКРС–инфекция у человека, вероятно, является иницирующим, но недостаточным фактором канцерогенеза и требует дополнительных генетических и микросредовых событий. Большинство

доступных исследований имеют перекрёстный или ретроспективный дизайн и не позволяют однозначно установить причинно—следственную связь, а единственное проспективное исследование в Австралии (60,4% против 14,6% последующего рака у ВЛКРС—позитивных и негативных женщин) нуждается в подтверждении в более масштабных когортных работах [178]. В ряде работ не выявлено связи между ВЛКРС и классическими прогностическими маркерами (ER/PR, HER-2, размер опухоли, метастазы, степень злокачественности), тогда как другие исследования описывают ассоциации с повышенной пролиферацией ($p = 0,014$), экспрессией HER-2 ($p = 0,042$) и более высокой степенью инвазивной карциномы [176,180,181].

В этом контексте особую актуальность приобретают современные молекулярные технологии, прежде всего высокочувствительные варианты ПЦР, включая цифровую ПЦР, способные надёжно детектировать низкую провирусную нагрузку и малые клональные популяции, ранее остававшиеся за пределами диагностических возможностей.

Критически важно отметить, что официально зарегистрированных случаев заражения человека ВЛКРС нет, и ВЛКРС не включён в перечень патогенов, опасных для человека, по классификации Всемирной организации здравоохранения. Все имеющиеся данные о ВЛКРС в человеческих тканях остаются на уровне молекулярных находок (обнаружение ДНК и антител) без документированных клинических заболеваний, атрибутируемых ВЛКРС—инфекции.

В заключение, текущие данные свидетельствуют о том, что ВЛКРС имеет потенциальное, но ещё не доказанное значение для развития рака молочной железы у человека. Вирус продемонстрировал способность к инфицированию человеческих клеток *in vitro* и обнаруживается в тканях человека, что указывает на потенциальный зоонозный риск. Однако переход от молекулярных находок к доказанной роли в канцерогенезе человека требует дополнительных исследований, включая крупномасштабные проспективные исследования со стандартизированными методами детекции, тщательную гигиеническую оценку

путей передачи и уточнение молекулярных механизмов потенциального онкогенеза у человека. До получения более дефинитивных доказательств целесообразно применение принципа предосторожности, включающего усиление ветеринарно–санитарного контроля ВЛКРС в животноводческих стадах, адекватную обработку пищевых продуктов и дальнейшее рассмотрение этого потенциально важного зоонозного агента в контексте общественного здравоохранения [181,182].

Глава 2 Материалы и методы

2.1 Материалы

Агароза ЕЕО 0,14–0,16 (Хеликон, Россия); Lr–полимераза (Сибэнзим, Россия); Hs–pol (Сибэнзим, Россия); BigDye (AppliedBiosystems, США); бромистый этидий (Serva, Германия); бромфеноловый синий (Sigma, США); вакуумированные пробирки типа «Vacutainer» (BectonDickinson, США); DNA ladder от 200 п.н. до 3000 п.н. (Сибэнзим, Россия), DNA ladder 10000 п.н. (Сибэнзим, Россия).

Буфер нанесения для агарозного геля (5х): 0,5% бромфеноловый синий, 0,5% ксиленцианоловый, 50 % глицерин.

2.1.1 Коммерческие наборы

Набор для лизиса эритроцитов Гемолитик (AmpliSens, Россия); набор для выделения суммарной клеточной ДНК «Литех» (НПФ Литех, Россия); Набор для очистки полногеномной ДНК The PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific, США); набор для определения лейкоза крупного рогатого скота методом realtime–ПЦР РеалБест–Вет ДНК вируса лейкоза КРС V–5441 (ВекторБест, Россия); набор для выделения ДНК из цельной крови (diaGene, Россия).

2.1.2 Оборудование

Амплификатор T100 ThermalCycler (Bio–Rad, США); амплификатор MastercyclerClassic (Eppendorf, Германия); центрифуга 5418R с охлаждением (Eppendorf, Германия); центрифуга 5810R с охлаждением (Eppendorf, Германия); центрифуга «Beckman Coulter» (Beckman, США); центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия); компактный персональный вортекс V–3 SkyLine (ELMI, Латвия); спектрофотометр Nanodrop 2000с (ThermoScientific, США); электрофоретическая камера Vari–Gel SystemUnit (ThermoScientific, США); трансиллюминатор Vilber Lourmat (Vilber, Франция); система документации гелей и блотов ChemiDoc (Bio–Rad, США); автоклав Systec DB–23 (Systec, Германия); микробиологические ламинарные системы Modernclass 3 (Lamsystems, Россия); низкотемпературный и обычные холодильники для хранения образцов и реагентов; система очистки воды

Arium pro (Sartorius, Германия); 8–капиллярный секвенатор 3130xl (Applied Biosystems, США); ДНК–Амплификатор в "реальном времени", 6 каналов, 96×0,2 мл, CFX96 Touch (Bio–Rad, США); Амплификатор для цифровой ПЦР QIAcuity Digital PCR System (Qiagen, Нидерланды).

2.1.3 Сбор эпизоотологических данных встречаемости ВЛКРС в Республике Дагестан

Эпизоотологические данные по встречаемости ВЛКРС в районах Республики Дагестан были предоставлены Комитетом ветеринарии Республики Дагестан (РД) и Дагестанским государственным университетом в сотрудничестве с ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

2.1.4 Отбор образцов крови КРС

Животные для исследования были отобраны на основе желания их владельцев предоставить образцы скота для анализа на наличие ВЛКРС. Возраст животных составлял от 3 месяцев до 11+ лет. Образцы крови коров были собраны сотрудниками управления ветеринарии по Новосибирской области (НСО) и Республики Дагестан в строгом соответствии с документом СанПиН 3.3686–21 [183]. Забор образцов крови от крупного рогатого скота осуществляли из хвостовой вены с использованием одноразовых стерильных систем в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА). Забор крови осуществлялся в период с октября 2020 года по август 2025.

2.1.5 Олигонуклеотидные пробы

Структура праймеров и зондов приведена в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика праймеров и зондов на ген env

Название олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность (5`–3`)	Позиции в геноме ВЛКРС
4787f	TGTGGGTTCCTGGCGTTT	4792–4810
4821f	ATGCCYAARGAACGACGG	4826–4843
4855f	AACCGATCATCAGATGGGTAAGT	4860–4882
5042f	GTCTCCCAGATACACCTTGGACT	5047–5069
5608r	AACAACAACCTCTGGGAAGGGT	5613–5634
5798r	GAGGTGAGTCTCTGATGGCTAAGG	5803–5826
5472r	GGAGCCCAGGGAGGGGAAG	5478–5496
TMR	TCAAGGGCAGGGTCGRAGG	6355–6373
TMR2	AGGCCTGATAATCAGRATCGGGT	6271–6293
BLV–f	GTACCTCAATTCCTTTAACTAGAACGC	2323–2351
BLV–r	ACCGGGAATACTGGATTATTGCCTG	2419–2443
BLV–r2	GGAGATATAACCTGCCTCCAGAGA	2382–2405
BLV–z	FAM–CTCCAGGCCCTTCAAGACCTGGTCCATC– BHQ1	2352–2379
DRA643–f	CCCAGAGACCACAGAGAATGC	–
DRA744–r	TGCAATGATGCCCACCAGAG	–
DRA–z	HEX–CACAATCAGGCCAGGGCACACA–BHQ2	–

Позиция праймеров в геноме ВЛКРС представлена на рисунке 5.

71

2.2 Методы

2.2.1 Получение нативной ДНК из Т–лимфоцитов периферической крови коровы

Лейкоциты периферической крови выделяли из цельной крови с использованием коммерческого набора для предобработки цельной крови «Гемолитик» (AmpliSens, Россия). Полученные образцы клеток сохраняли при температуре -70°C для последующего выделения ДНК.

Выделение геномной ДНК из мононуклеарных клеток животных проводили методом сорбции на силика–мембране в присутствии хаотропных солей с использованием коммерческого набора для выделения ДНК из цельной крови (DiaGene, Россия). Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивали методом УФ–спектрофотометрии по оптической плотности при 260 и 280 нм на микромолярном спектрофотометре Nanodrop (Thermo Scientific, США), рассчитывая концентрацию исходя из того, что единица A_{260} соответствует 50 мкг/мл двуцепочечной ДНК. Оценку чистоты ДНК проводили по соотношению A_{260}/A_{280} и форме спектральных пиков.

2.2.2 Постановка полимеразной цепной реакции

1. ПЦР–смесь включала в себя по 1 мкл каждого из праймеров (4821f и TMR), 10–50 нг ДНК–матрицы (геномная ДНК), 12,5 мкл 2х–мастер–микса Taq–полимеразы. Реакции проводили в объеме 22 мкл. ДНК амплифицировали 3 цикла $94^{\circ}\text{C} - 15 \text{ с}$, $56^{\circ}\text{C} - 30 \text{ с}$ и $72^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин } 30 \text{ с}$, и 30 циклов $94^{\circ}\text{C} - 15 \text{ с}$, $59^{\circ}\text{C} - 30 \text{ с}$ и $72^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин } 40 \text{ с}$, этап финальной элонгации – 4 мин при 72°C .

2. Вторая ПЦР–смесь включала в себя по 0,6 мкл каждого из праймеров (4855f и TMR2), 10–50 нг ДНК–матрицы (полученной после первой ПЦР), 12,5 мкл Taq–полимеразы. Реакции проводили в объеме 24 мкл. ДНК амплифицировали 3 цикла $94^{\circ}\text{C} - 15 \text{ с}$, $56^{\circ}\text{C} - 30 \text{ с}$ и $72^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин } 20 \text{ с}$, и 30 циклов $94^{\circ}\text{C} - 15 \text{ с}$, $59^{\circ}\text{C} - 30 \text{ с}$ и $72^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин } 30 \text{ с}$, этап финальной элонгации – 4 мин при 72°C .

2.2.3 Постановка электрофореза в агарозном геле

Для анализа размера и качества продуктов ПЦР использовали 1% агарозный гель с бромистым этидием в буфере TAE: 50 mM Трис, 0,02 M уксусная кислота, 1 mM EDTA (pH 8,4). Для оценки длины ДНК-фрагмента использовали ДНК-маркер молекулярного веса – «3 п.н.». Электрофорез проводили при напряжении ~ 7 В/см.

2.2.4 Определение первичной структуры ДНК методом Сэнгера

Реакционная смесь содержала 50 нг ДНК, 2 мкл 5x BigDye буфера, 2 мкл праймера, 1 мкл BigDye и воду до финального объёма – 10 мкл.

Условия для проведения реакции секвенирования были следующие:

ДНК амплифицировали 1 цикл 95°C – 1 мин, и 30 циклов 95°C – 10 с, 50°C – 10 с и 60°C – 2 мин 30 с.

После проведения секвенирующей реакции ДНК переосаждали следующим образом: к 10 мкл реакции добавляли 12 мкл 2,5 % SDS, 10 мкл воды. Инкубировали в амплификаторе при 98°C – 5 мин, 25°C – 10 мин. Sephadex G50 добавляли в колонки и промывали дистиллированной водой два раза с центрифугированием при 2000 g по 3 минуты. Добавляли смесь ДНК на колонки и центрифугировали при 2000 g в течение 3 мин, высушивали при 40–50°C, и затем растворяли в 15 мкл раствора деионизованного формамида «HiDi». Образцы наносили в лунки 96-луночного планшета, который затем загружали в автоматический 8-канальный 8-капиллярный секвенатор 3130xl.

После получения результатов последовательности редактировали в программе Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>) и сравнивали с референс-последовательностями различных генотипов ВЛКРС из международной базы данных Genbank [184].

2.2.5 Определение первичной структуры ДНК полного генома ВЛКРС с использованием технологий NGS

Реакционная смесь содержала 50 нг ДНК, 12,5 мкл LR-полимеразы, 1,2 мкл праймера прямого (Bf1), 1,2 мкл праймера обратного (Br1) и воду до финального объёма – 24 мкл.

Условия для проведения реакции секвенирования были следующие:

ДНК амплифицировали 1 цикл 93°C – 3 мин, 10 циклов 93°C – 15 с, 60°C – 30 с и 68°C – 6 мин 50 с и 21 цикл 94°C – 15 с, 63°C – 30 с и 68°C – 7 мин, 1 цикл 68°C – 10 мин.

Очистка продуктов проводилась с помощью набора The PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific, США) по протоколу.

Очищенные продукты реакции секвенирования подвергались автоматическому секвенированию на платформе Illumina MiSeq (Illumina, США).

2.2.6 ПЦР в реальном времени

Праймеры (для гена полимеразы BLV-f – прямой праймер, BLV-r, BLV-r2 – обратные праймеры, для гена DRA DRA643-f – прямой, DRA744-r – обратный), и флуоресцентные метки (DRA-z и BLV-z) были разработаны с помощью ПО SnapGene (Dotmatics, snapgene.com). До этапа синтеза последовательности праймеров были проверены методом виртуальной ПЦР в ПО SnapGene и UGENE [185]. Для способности амплификации фрагментов разных субтипов ВЛКРС использовали последовательности, депонированные в открытой базе нуклеотидных последовательностей GenBank.

Все реакции проходили с использованием реакционной смеси Биомастер HS–Taq ПЦР 2х (Биолабмикс, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрация праймеров составляла 0,6 мкмоль/мл, концентрация зонда 0,3 мкмоль/мл. Амплификатор программировался на соблюдение температурных режимов: 95°C – 5 минут; 95°C – 10 секунд, 55°C – 20 секунд – 50 циклов. Регистрацию флуоресценции проводили на этапе отжига при 55 °C в FAM

– канале. При необходимости дополнительной амплификации можно добавить еще один этап элонгации цепи – 60°C на 20 секунд, сохранив общее число циклов в 50 единиц.

Амплификатором для ПЦР–РВ реакции выступал BioRad CFX96. Анализ полученных данных проводили в программном обеспечении Bio–Rad CFX Manager (Bio–Rad Laboratories, Hercules, USA, <https://www.bio-rad.com>).

2.2.7 Цифровая ПЦР

Цифровая ПЦР проводилась с помощью технологии нанопланшетов производства Qiagen (Qiagen, Германия).

В реакциях использовался оригинальный мастер микс QIAcuity Probe PCR Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрация праймеров (для гена полимеразы BLV–f – прямой праймер, BLV–r, BLV–r2 – обратные праймеры, для гена DRA DRA643–f – прямой, DRA744–r – обратный) составляла 0,6 мкмоль/мл, концентрация зонда (DRA–z и BLV–z) 0,25 мкмоль/мл. Для фрагментирования длинных цепочек хозяйской ДНК использовалась рестриктаза EcoRI, рестрикционный сайт которой отсутствовал в нуклеотидных последовательностях праймеров, зонда и искомой ДНК.

Амплификатор программировался на соблюдение температурных режимов: 37°C – 15 минут (инкубация для обеспечения работы рестриктазы), 95°C – 5 минут; 95°C – 10 секунд, 55°C – 20 секунд – 50 циклов. Для возбуждения флуоресценции мощность лазера была выставлена на 6 единиц из 20 возможных в соответствии с рекомендациями производителя, экспозиция проводилась в течение 500 мс или 0,5 сек. Амплификация проводилась на приборе QIAcuity One (Qiagen, Германия) с использованием планшетов QIAcuity Nanoplate 26k 8–well (Qiagen, Германия).

Анализ данных проводился в ПО QIAcuity Software Suite (Qiagen, Германия).

2.2.8 Филогенетический анализ и анализ точечных мутаций

Множественное выравнивание последовательностей гена env проводилось с использованием алгоритма MUSCLE в программе MEGA11 [186]. Выравнивание

было протестировано на предмет свидетельств внутригенной рекомбинации с использованием PHI–теста, реализованного в программе SplitsTree v6 [187]. $P < 0,05$ рассматривалось как статистически значимое свидетельство рекомбинации.

Филогенетический анализ был проведён методом максимального правдоподобия в онлайн–программе IQ–TREE v1.6.12 [188]. Оптимальная модель замены нуклеотидов (K2P+G4) была выбрана с использованием алгоритма ModelFinder на основе байесовского информационного критерия (BIC). Статистическая поддержка топологии филогенетического дерева оценивалась с помощью минимум 1000 репликаций бутстреппирования. Филогенетические деревья были визуализированы с использованием iTOL v6.

Фрагмент из 804 п.н., охватывающий полный регион gp51 (без сигнальной последовательности), был отобран для анализа вариабельности аминокислот и мутаций, обеспечивая покрытие всех ключевых функциональных доменов и эпитопов.

Попарное выравнивание проводилось для фрагмента из 804 п.н. гена env ВЛКРС, так как этот регион оказался наиболее информативным для анализа мутаций. Значения попарной идентичности для последовательностей ВЛКРС рассчитывались с использованием программного обеспечения Sequence Demarcation Tool (SDT v1.2) [189].

Аминокислотные последовательности были выведены путём трансляции полученных нуклеотидных последовательностей с использованием программы Geneious Pro v.5.3 (Biomatters, Auckland, New Zealand., <https://www.geneious.com>).

Для проверки результатов максимальной экономичности проводился анализ байесовского вывода с использованием MrBayes с моделью замены GTR в программе Geneious Pro v.5.3. Идентичные последовательности были выявлены и удалены с использованием функции «Remove Redundancy» в Jalview v2.11.5.0 [190].

Селективное давление оценивалось с использованием codon–based Z–теста селекции, реализованного в MEGA 11. Метод Nei–Gojobori был применён для

оценки уровней несинонимичных (dN) и синонимичных (dS) замен для всех попарных сравнений последовательностей. Отношение dN/dS (ω) значительно менее 1,0 указывает на очищающую селекцию, в то время как $\omega > 1,0$ свидетельствует о положительной селекции. Анализ нуклеотидного разнообразия в скользящем окне (значение π) выполнялся в программе DNASP v.6.1.

Полногеномные последовательности ВЛКРС были проанализированы с использованием аналогичных программ и методов. Также для анализа филогенетических сетей и прогнозирования предковых форм и взаимодействий использовалась программа SplitsTree v6 [187].

2.2.9 Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием биномиальной модели. Сравнение пропорций между группами выполняли с применением критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера при малых ожидаемых частотах [191]. Сравнение долей между двумя независимыми выборками выполняли с использованием Z-теста для двух пропорций.

Для анализа временной динамики встречаемости ВЛКРС и тенденций изменения долей инфицированных животных использовали методы анализа тренда, включая линейную регрессию с оценкой значимости коэффициента наклона.

Количественные показатели провирусной нагрузки анализировали как непрерывные величины, из-за ненормального распределения значений и анализировали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни с расчётом медиан и межквартильных интервалов. При необходимости рассчитывали 95% доверительные интервалы для долей и количественных показателей.

Расчёты проводили в программной среде R, (R Foundation for Statistical Computing, Австрия), с использованием стандартных функций пакета «stats». Значения $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимые.

Глава 3 Результаты собственных исследований

3.1 Генетическое разнообразие ВЛКРС, циркулирующих на территории Новосибирской области

3.1.1 Встречаемость ВЛКРС среди КРС в индивидуальных и коммерческих хозяйствах Коченевского района Новосибирской области

На начальном этапе исследования требовалось определить хозяйства какого масштаба (частные или коммерческие) имеют наибольшую долю инфицированных животных. Эти данные были важны для корректного планирования дальнейшего развития исследований.

С целью оценки встречаемости вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) в хозяйствах Новосибирской области был выбран Коченевский район, так как данный район является одним из крупнейших по производству мясо – молочной продукции. В рамках исследования одномоментно было собрано 317 образцов крови, включая 200 проб от животных из крупного животноводческого хозяйства ООО «Раздольное» и 117 проб среди частного поголовья малых индивидуальных хозяйств в отдаленных друг от друга населенных пунктах Коченевского района. Животные для анализа отбирались случайным образом. Из образцов цельной крови крупного рогатого скота (КРС) была выделена популяция моноклеарных клеток, из которых выделялась суммарная клеточная ДНК, используемая в дальнейшем для ПЦР–диагностики животных на выявление ДНК ВЛКРС. Результаты ПЦР–анализа приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Доля животных–носителей ВЛКРС в крупных и индивидуальных хозяйствах Коченёвского района Новосибирской области России

Локация	п образцов	Возраст, лет M± SD	ДНК ВЛКРС (+)	ДНК ВЛКРС (–)	Инфицированность, %	Генотип G4 (n)	Генотип G7 (n)
Коченево*	12 [#]	3,5 ± 0,4	1	11	8,3	1	0
Шагалово*	18 [#]	3,2 ± 0,3	0	18	0,0	0	0
Казаково*	19 [#]	4,4 ± 0,5	13	6	68,4	13	0
Прокудское*	38	3,0 ± 0,2	30	8	79,0	21	9
Светлый*	30	4,1 ± 0,4	4	26	13,3	4	0
Раздольное*	200	6,4 ± 0,8	143	57	71,5	126	17
Всего	317	4,1 ± 0,6	191	126	60,3	165	26
* индивидуальные хозяйства ** крупное животноводческое хозяйство в крупном мясо–молочном хозяйстве поражённость ВЛКРС была статистически значимо выше, чем в совокупности индивидуальных подворий Коченёвского района (p < 0,00001)							

В индивидуальных хозяйствах, расположенных в пяти отдаленных населенных пунктах Коченевского района (посёлки Коченево, Шагалоно, Казаково, Прокудское, Светлый), были обнаружены существенные отличия в поражённости животных. Положительный ПЦР–тест на присутствие ДНК ВЛКРС был получен для КРС в 4 из 5 населенных пунктах, показатель выявляемости ДНК ВЛКРС варьировал от 0 до 79%. Индивидуальные хозяйства с близкими показателями поражённости скота ВЛКРС были найдены как в крупных населенных пунктах, где находится много индивидуальных животноводческих хозяйств, так и в небольших поселках. Наибольшая поражённость скота была зарегистрирована в индивидуальных подворьях поселка Казаково (230 жителей; 19 протестированных животных; 68,4% поражённости скота) и Прокудское (5,9 тысяч жителей; 38 протестированных животных; 79% поражённости скота).

В посёлке Шагалоно ни в одном из собранных 18 образцов не была обнаружена ДНК ВЛКРС. Шагалоно является наиболее географически изолированным населенным пунктом, имеющим плохую транспортную связь с населенными пунктами Новосибирской области. Возможно, экономико – географические условия могут отчасти объяснить отсутствие ВЛКРС среди КРС в

данном поселке. Из случайной выборки 200 животных крупного мясо – молочного хозяйства Раздольное, имеющего большое поголовье (10 тыс. животных; 200 протестировано), в 71.5% исследованных образцов была обнаружена ДНК ВЛКРС.

Поражённость ВЛКРС в крупном мясо–молочном хозяйстве ООО «Раздольное» (143/200; 71,5%) была статистически значимо выше, чем в совокупности индивидуальных подворий Коченёвского района (48/117, 41,0%, $p < 0,00001$; критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса), что подтверждает более высокий уровень циркуляции ВЛКРС в крупном хозяйстве по сравнению с частными подворьями.

3.1.2 Генетическое разнообразие ВЛКРС, встречающихся в Новосибирской области

Выполненный скрининг КРС выявил высокую пораженность лейкозом скота, содержащегося в крупном мясо – молочном хозяйстве. Поэтому для изучения генетического разнообразия ВЛКРС было решено провести сбор образцов крови от КРС с ранее диагностированной инфекцией ВЛКРС методом РИД дополнительно в пяти отдаленных друг от друга крупных хозяйствах Новосибирской области Болотнинского, Татарского, Тогучинского, Барабинского и Доволенского районов.

Суммарно из 543 собранных в период с ноября 2020 по февраль 2021 в Новосибирской области образцов крови коров для 417 были успешно получены и просеквенированы фрагменты env ВЛКРС, в том числе, 191 – для образцов животных из хозяйств Коченевского района, 60 – из Болотнинского, 60 – из Татарского, 54 – из Тогучинского, 35 – из Барабинского и 17 из Доволенского районов (см. рисунок 6).



Рисунок 6 – Территории Новосибирской области, вовлеченные в исследование (на карту цифрами красного цвета нанесено количество образцов крови коров, собранных для каждого из 6 районов Новосибирской области, принимавших участие в исследовании)

Для анализа генетического разнообразия выделенных ВЛКРС использовали полученные нуклеотидные последовательности гена *env*-gp51 протяженностью около 1000 п.н. Для построения филогенетического дерева на основе метода ML использовали 417 расшифрованных нуклеотидных последовательностей гена *env* ВЛКРС и референсные последовательности других геновариантов ВЛКРС, ранее классифицированных в известные генотипы G1–G12. Дополнительно в филогенетическое дерево были включены максимально идентичные нуклеотидные последовательности ВЛКРС из GenBank, отобранные с помощью ресурса Blast.

Филогенетический анализ, выполненный на основе фрагмента гена *env* протяженностью 804 п.н. показал, что все выделенные в Новосибирской области последовательности ВЛКРС группируются с высоким уровнем поддержки в две отдельные клады с референсными образцами генотипов G4 и G7 (см. рисунок 7).

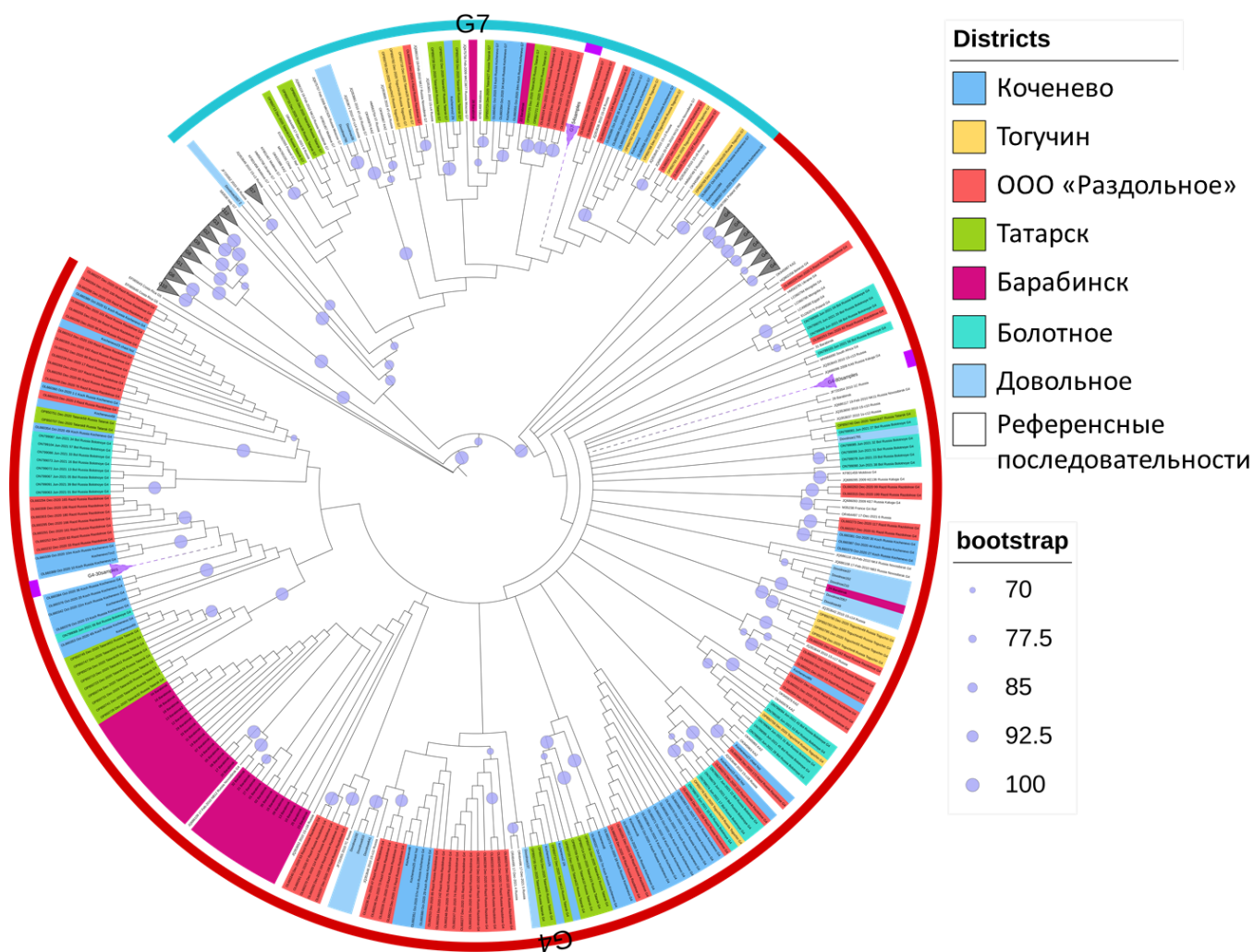


Рисунок 7 – Филогенетическое дерево, построенное для исследованных фрагментов гена env ВЛКРС, выделенных в НСО (дерево масштабировано, при этом длины ветвей представляют количество замен на сайт. Происхождение образцов обозначено цветовой кодировкой следующим образом: синий цвет – частные хозяйства Коченевского района; красный – ООО «Раздольное» (Коченевский район); зелёный – Татарский район; бирюзовый – Болотнинский район; светло-синий – Доволенский район; фуксия – Барабинский район; жёлтый – Тогучинский район. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank, фиолетовый цвет обозначает кладу образцов, которые были секвенированы в исследовании. Филогенетический анализ проведён методом максимального правдоподобия (модель замены K2P + G4), реализованным в онлайн-программе IQ-TREE v1.6.12. Для моделирования вариации скорости эволюции среди сайтов применено дискретное гамма-распределение. Размер кружков у внутренних узлов отражает величину бутстреп-поддержки ветвей (большой кружок соответствует более высокому значению бутстрепа); отображены только значения $\geq 70\%$)

В совокупной выборке последовательностей ВЛКРС из Новосибирской области доля генотипа G4 (313/416; 75,2%) статистически значимо преобладала над долей генотипа G7 (104/416; 24,8%; критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса G4/G7, $p < 0,00001$), что указывает на доминирование генотипа G4 в регионе. Можно говорить о том, что в Новосибирской области преимущественно встречается G4, так как данный генотип вируса существенно преобладает в 5 из 6 исследованных районов Новосибирской области (см. таблица 4). Генотип G7 ВЛКРС преобладал только в Тогучинском районе (45/54; 83,3% инфицированных животных; критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса G4/G7, $p < 0,00001$).

Таблица 4 – Результаты генотипирования вариантов ВЛКРС, выделенных в отдельных районах Новосибирской области

Район	n	Порода	Возраст, лет M± SD	Генотип G4, n (%)	Генотип G7, n (%)
Доволенский (Dov)	17 [#]	Степная	4,3±0,7	11 (64,7)	6 (35,3)
Барабинский (Bar)	35	Чёрно–белая	4,7±2,4	33 (94,3)	2 (5,7)
Татарский (Tat)	60	Степная, чёрно– белая	4,5±0,5	39 (65,0)	21 (35,0)
Тогучинский (Tog)*	54	Симментальская, чёрно–белая	3,8±0,8	9 (16,7)	45 (83,3)
Болотнинский (Bol)	60	Степная, чёрно– белая	4,6±1,1	60 (100,0)	0 (0,0)
Коченевский (Koch, Razd)	191	Чёрно–белая, степная, Симментальская	7,0±5,0	161 (84,7)	30 (15,3)
Всего	417	–	–	313 (75,2)	104 (24,8)
* В Тогучинском районе доля генотипа G7 статистически значимо превышала долю генотипа G4 (p <0,00001). Доля генотипа G4 в НСО статистически значимо преобладала над долей генотипа G7 (p <0,00001).					

Вирусы генотипа G7 кластеризовались с вирусами G7 ВЛКРС, выделенными в различных регионах Российской Федерации, а также на территории Украины, Казахстана и Молдовы. Популяция G7 ВЛКРС, исследованная в данной работе, демонстрировала высокую степень однородности. Филогенетический анализ G7 ВЛКРС не выявил статистически значимого объединения образцов на основе принадлежности к хозяйству. Вместе с тем в хозяйствах выявлялись статистически значимые отдельные небольшие группы генетически близких вариантов ВЛКРС: в Татарске (кластеры с уровнем поддержки от 74 до 100, по 2–3 образца), в Раздольном (кластеры с уровнем поддержки от 90 до 100, по 2–4 образца), в

Тогучине (кластеры с уровнем поддержки от 74 до 100, по 2–4 образца). Практически в каждом хозяйстве регистрировались пары–тройки образцов G7 ВЛКРС, которые формировали филогенетические ветви с показателем поддержки 100, что может свидетельствовать о распространении инфекции ВЛКРС внутри хозяйств.

Среди изученных ВЛКРС G7 только 5 вариантов вируса – 2 из Доволенского и 3 из Татарского района (расстояние между данными районами около 400 км, см. рисунок 6), формировали отдельный статистически достоверный кластер последовательностей ВЛКРС с коэффициентом поддержки 90. При этом они группировались совместно с семью другими последовательностями генотипа G7 из Российской Федерации (2 шт), Молдавии (1 шт) и Казахстана (1 шт), депонированными в GenBank.

Результаты диагностики образцов из Коченевского района Новосибирской области показали, что генотип G7 был найден в двух из шести поселков: 30% протестированных животных Прокудского поселка и 12% животных из хозяйства «Раздольное» были носителями данного генотипа ВЛКРС (см. таблица 3 и рисунок 6).

Вирусы G4, выделенные в Новосибирской области, были кластеризованы с геновариантами G4 ВЛКРС, полученными из Украины, Молдовы, Казахстана, Южной Африки, Чили, Беларуси, Монголии, Польши, Бельгии и Аргентины. В Коченевском районе Новосибирской области генотип G4 был обнаружен во всех исследуемых хозяйствах, где была найдена инфекция ВЛКРС.

В ходе исследования ВЛКРС было выявлено значительное количество пар–четверок генетически близких вирусов G4, объединенных в ветви с коэффициентом поддержки 100, которые были выделены в одном хозяйстве. Это подтверждает факт распространения вируса лейкоза между животными внутри одного хозяйства.

Встречаемость генотипов G4 и G7 ВЛКРС имела существенные различия (см. таблица 4). Диапазон доли инфицированных животных в хозяйствах составлял от 16,7% до 100% для G4; диапазон доли животных–носителей ВЛКРС G7 от 0 до 83,3%.

3.1.3 Анализ вариабельности ВЛКРС гена env, выделенных на территории Новосибирской области

Анализ нуклеотидной и аминокислотной вариабельности проводили для расшифрованных фрагментов ВЛКРС протяженностью 804 п.н. с началом в области белка gp51, захватывающей все конформационные эпитопы и наиболее значимые области гена env, который кодирует белки оболочки вириона.

В сравнительный анализ нуклеотидной вариабельности были включены фрагменты ВЛКРС, выделенные из 417 образцов. В сформированную выборку были добавлены 38 последовательностей гена env из международной базы GenBank, включающих ту же область гена env. В качестве последовательностей для сравнения были выбраны референсные штаммы всех известных на данный момент генотипов ВЛКРС, представленных в международной базе данных GenBank. Попарная идентичность последовательностей в сравнении с генотипами G1 – G12 варьировала от 91,2% до 100%. Попарная идентичность последовательностей в сравнении с генотипами G4 и G7 из нашей выборки с референс последовательностями из GenBank варьировала от 94,5% до 100% и от 95,6% до 100% соответственно (см. рисунок 8).

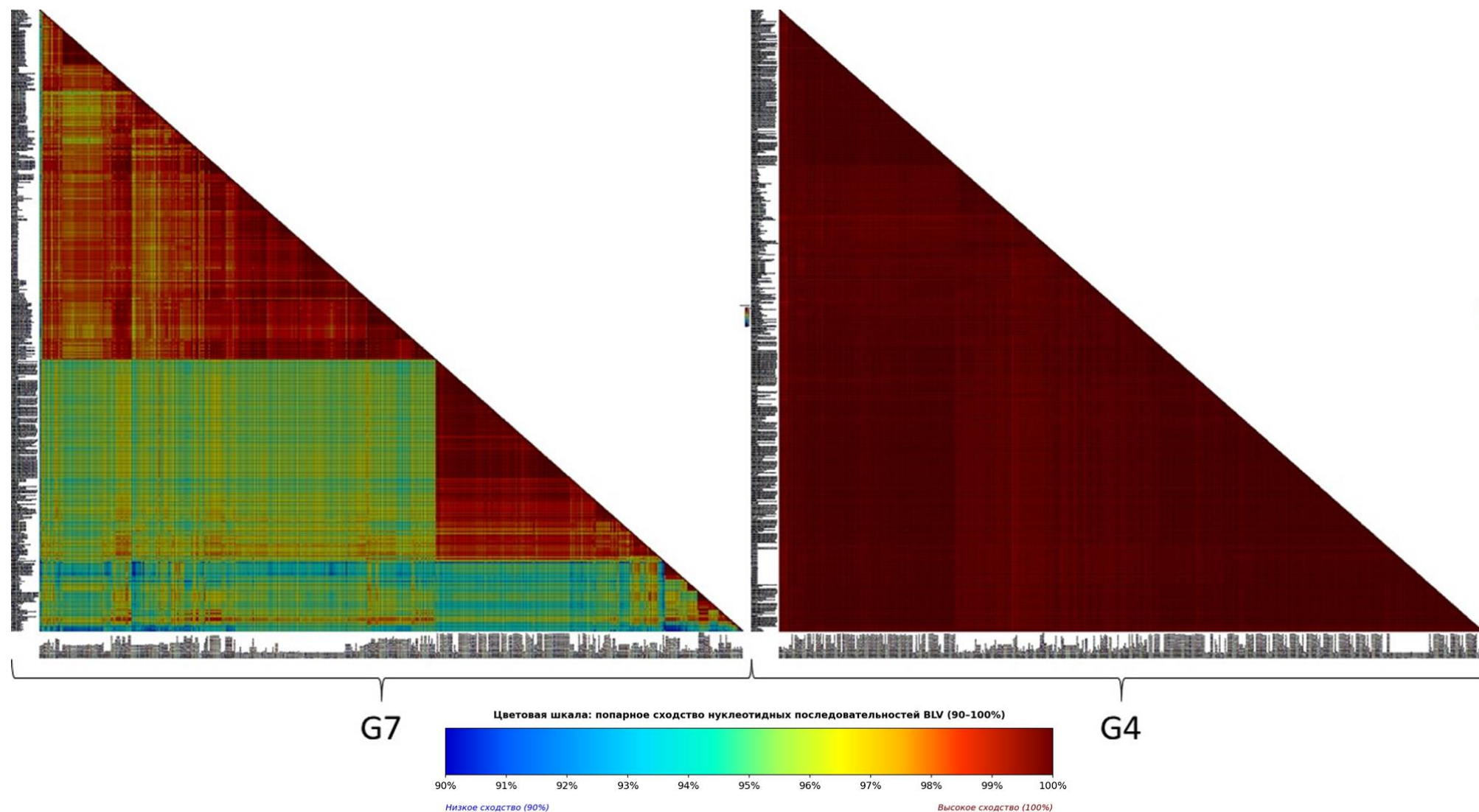


Рисунок 8 – Матрица SDT с цветовой кодировкой парных показателей идентичности, полученная путем выравнивания набора нуклеотидных последовательностей гена env ВЛКРС генотипа G4 и G7 референсных последовательностей из базы данных GenBank (длина используемых для построения графика последовательностей – 804 п.н. Данные по идентичности для каждого генотипа представлено в Приложении А)

На основании матрицы попарной идентичности были обнаружены последовательности ВЛКРС, имеющие между собой 100% идентичность. Идентичность для большинства образцов наблюдалась среди проб ВЛКРС, собранных на одной территории, в одном хозяйстве, но встречались и образцы со 100% идентичностью, собранные на разных территориях НСО. Например, 3 образца генотипа G4, собранных в Коченёвском районе и 3 образца того же генотипа, собранных в Татарском районе, имели 100 % идентичность (расстояние между фермами около 400 км).

3.2 Создание здорового стада на основании ПЦР диагностики

В ООО «Раздольное» поголовье крупного рогатого скота насчитывает 10000 голов, из них 2000 молодняка (телят возрастом до 1 года) и 8000 голов всех возрастов.

В данном хозяйстве в соответствии с нормативными требованиями № 13–7–2/2130, Приказ Минсельхозпрода РФ от 11.05.1999 N 359" «Об утверждении правил по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота» проводятся серологические исследования животных на ВЛКРС методами иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции иммунодиффузии (РИД–анализ) [192]. Для установления стадии инфекционного процесса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота применяют гематологические исследования крови (ГЕМ).

В 2022 году впервые в хозяйстве было выполнено исследование 200 образцов крови КРС на наличие ДНК провируса вируса лейкоза с применением методов РВ–ПЦР с использованием тест–системы РеалБест–Вет ДНК вируса лейкоза КРС V–5441 производства ВекторБест и углубленного ПЦР–анализа на ВЛКРС с последующим определением фрагментов ДНК методом Сэнгера провируса ВЛКРС и оценкой филогенетических связей выявленных геновариантов вируса.

Выполненные исследования показали, что поражённость скота в хозяйстве по данным ПЦР–диагностики составила 71,5%. Сопоставление результатов, полученных с использованием разных методов диагностики ВЛКРС в ООО «Раздольное», выявило существенные различия в доле животных, у которых

обнаруживаются маркеры инфекции (см. таблица 5). На этапе ПЦР–обследования была зарегистрирована наиболее высокая доля ВЛКРС–положительных животных, что отражает как высокую чувствительность метода, так и более поздний этап развития эпизоотического процесса в хозяйстве. Дополнительно проведенный филогенетический анализ расшифрованных последовательностей генома ВЛКРС, выделенных от животных, показал наличие генетически близких кластеров вирусов, что указывает на распространение лейкоза коров внутри одного хозяйства.

Таблица 5 – Данные по выявлению маркеров ВЛКРС у животных при диагностических исследованиях с применением разных методов

Методы диагностики	РИД	ГЕМ+	ПЦР
Кол-во протестированных животных, n	1584	3951	200
Средний возраст животных, лет (M±SD)	5,0±0,5	5,0±0,5	6,0±0,8
ВЛКРС «+» животных, n (%)	158 (9,9)	50 (1,3)	143 (71,5)
ВЛКРС «-» животных, n (%)	1426 (90,1)	3901 (98,7)	57 (28,5)
провирус ВЛКРС при анализе методом ПЦР выявлялся статистически значимо чаще, чем при РИД и ГЕМ+ методах (p <0,00001).			

На основании анализа методов ведения хозяйственной деятельности, выполненного в ООО «Раздольное», были сделаны выводы о существовании в хозяйстве нескольких возможных путей передачи инфекции. Широкая встречаемость вируса среди животных со средним возрастом 6 лет может быть связано с совместным выпасом заражённых животных и здоровых, так как из 10000 коров только для 4200 применяется привязное содержание, а 5800 голов содержится без привязи. В данном хозяйстве закупка племенного скота производится в ограниченном количестве (например, в 2023 году закупили 80 голов племенных нетелей и 4 быка), животные проходят предварительную диагностику и имеют сертификат здоровья, что минимизирует вклад привозных животных в инфицирование стада лейкозом.

Наиболее вероятной причиной перекрёстного заражения крупного рогатого скота ВЛКРС в хозяйстве может быть недостаточная обработка медицинских инструментов и инвентаря, используемых при содержании и уходе за животными, в том числе, при проведении дойки, ветеринарных процедур, татуирования, проколов ушей крупного рогатого скота и других процедур.

Выявленная при ПЦР–диагностике высокая пораженность КРС является негативным прогнозом экономического развития хозяйства, в связи с чем в ООО «Раздольное» был разработан план мероприятий по формированию свободного от ВЛКРС стада.

Ведущие специалисты ООО «Раздольное» прошли курс стажировки по организации ведения хозяйственной деятельности, направленной на создание здорового стада и повышение эффективности производства молочной продукции. Кроме того, в хозяйстве был разработан план ПЦР–диагностики телят и поэтапной модернизации хозяйства, включающий комплекс ветеринарно–зоотехнических мероприятий и строительства новых помещений для содержания скота.

Формирование здорового стада было начато на основе результатов тестирования молодняка (до 3 месяцев) методом ПЦР в реальном времени. Схема включала в себя тестирование телят на инфекцию ВЛКРС в первые три месяца жизни и разделение на «–» и «+» ВЛКРС молодняка. После чего следовало повторное тестирование на ВЛКРС в возрасте до 6 месяцев и окончательная постановка статуса «ВЛКРС +» или «ВЛКРС –».

Для отделения, где содержатся животные от 0 до 3–х месяцев, был разработан новый регламент ухода за телятами, включающий:

- реализацию плана–графика забора проб крови телят на ПЦР–диагностику ВЛКРС;
- выпаивание новорожденных телят молозивом от здоровых, безлейкозных первотелок;
- обязательное биркование здоровых телят зеленой биркой после получения результатов ПЦР;

- перемещение телят в отдельную базу безлейкозных животных и в телятник безлейкозных телок;
- осуществление двойного контроля в безлейкозном телятнике за соблюдением графиков чистки, дезинфекции помещений и рабочего инструмента, смены перчаток и т.д.;
- содержание телят в индивидуальных клетках до повторного обследования и перемещения на следующую базу;
- повторный забор крови телят отделения от 3 до 6 мес. для ПЦР–диагностики ВЛКРС;
- перевод телят в следующее отделение для здоровых животных после получения результатов повторной ПЦР–диагностики согласно разработанной схеме.

В соответствии с планом в период 2023–2025 года было собрано 642 образца крови от телят в возрасте 2–3 месяцев. Группы для исследования формировались поэтапно, по мере рождения телят и достижения ими 2–месячного возраста. Для скрининга животных на наличие ВЛКРС использовался набор для детекции ДНК провируса лейкоза КРС в реальном времени, прошедший ранее успешное испытание в нашей работе.

Из 642 образцов положительными на наличие ВЛКРС оказались 87 телят (см. таблица 6). Для подтверждения ВЛКРС–инфекции для выявленных в скрининге и части отрицательных по лейкозу животных выполняли дополнительный анализ ПЦР с лабораторным набором праймеров на детекцию ДНК ВЛКРС. ПЦР–анализ с лабораторным набором праймеров показал 100 % совпадение результатов как с контрольными положительными на ВЛКРС образцами, так и с отрицательными, что говорит о чувствительности и специфичности данной системы тестирования.

Таблица 6 – Данные по выявлению маркеров ВЛКРС у телят при исследовании методами ИФА и ПЦР

Методы диагностики	ИФА	ПЦР
Кол-во протестированных животных	1584	642
Средний возраст животных	от 3 до 9 месяцев	до 3 месяцев
ВЛКРС «+» животных, n (%)	393 (24,8)	87 (13,6)
ВЛКРС «-» животных, n (%)	1191 (75,2)	555 (86,4)
Различия в выявляемости ВЛКРС методом ПЦР и ИФА были статистически значимыми ($p < 0,00001$).		

Данные по выявлению маркеров ВЛКРС у телят при исследовании методами ИФА и ПЦР демонстрируют примерно двукратное расхождение доли ВЛКРС–положительных животных (24,8% при ИФА у телят в возрасте 3–9 месяцев и 13,6% при ПЦР у телят до 3 месяцев). Различия в доле ВЛКРС–положительных телят, выявленных этими методами, были статистически значимыми ($p < 0,00001$; критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса) Большие показатели по выявляемости ВЛКРС–положительных телят в ИФА связаны с несколькими причинами. У телят могут сохраняться колостральные антитела к ВЛКРС после рождения, что может давать ложноположительный результат. Также выпаивание телят молозивом от ВЛКРС–положительных коров может увеличивать не только риски заражения инфекцией, но и может давать ложноположительный результат при ИФА–диагностике лейкоза.

В этой связи в ООО «Раздольное» был разработан комплекс ветеринарно–зоотехнических мероприятий и логистики перемещения животных при выращивании телят, нетелей, стельных коров и других категорий животных с тщательной регистрацией и учетом КРС, прошедших и не прошедших ПЦР–диагностику. Несмотря на то, что животные, положительные на ВЛКРС по результатам исследования, подлежали выбраковке в течение недели после получения результатов, в хозяйстве оставались коровы, для которых не была проведена ПЦР–диагностика, такие животные считались потенциальными носителями лейкоза.

С целью соблюдения разработанных требований для минимизации рисков пересечения здорового и не диагностированного скота был запланирован ввод

аллей для перегона животных. Особое внимание было уделено контролю за проведением дезинфекционных мероприятий, стерилизации ветеринарного инструментария с ведением ежедневных журналов учета проводимых обработок.

Благодаря реализации комплекса совместно разработанных оздоровительных мероприятий в хозяйстве «Раздольное» в период с 2021 по 2026 год доля ПЦР-положительных животных снизилась с 71,5% до 13,6%. Снижение поражённости носило статистически значимый характер как по результатам анализа временного тренда методом тест–Кохрана–Армитажа (применённого к годовым данным мониторинга, $p < 0,00001$), так и при непосредственном сравнении начальной и конечной долей инфицированных животных (с использованием критерия χ^2 Пирсона, $p < 0,00001$). Таким образом, благодаря взаимодействию научного учреждения и сельскохозяйственного предприятия впервые в Сибири начато формирование стада крупного рогатого скота, свободного от лейкоза.

3.3 Анализ ВЛКРС, циркулирующих на территории Республики Дагестан (РД)

3.3.1 Характеристика хозяйств, вовлеченных в исследование КРС на ВЛКРС на территории Республики Дагестан

На территории Республики Дагестан за последнее десятилетие регистрировались такие инфекционные заболевания животных, как бешенство, сибирская язва, бруцеллез, туберкулез, лейкоз крупного рогатого скота, эмкар, сальмонеллез, колибактериоз, хламидиоз, африканская чума свиней, оспа овец, нодулярный дерматит, вирусная диарея и другие. Возникновение и распространение этих заболеваний имеют серьезные социально–экономические последствия для Республики Дагестан и вызывают сильную тревогу и опасения. Так как ВЛКРС делает животных более восприимчивыми к заболеваниям, упомянутым выше (см. раздел 1.1). Важным становится комплексное изучение вируса лейкоза для понимания факторов, способствующих его распространению в хозяйствах среди крупного рогатого скота.

В Республике Дагестан проводится скрининг животных на ВЛКРС в соответствии с нормативными рекомендациями. Однако для этой цели

используются методы анализов РИД и ИФА. Применение ПЦР для диагностики лейкоза коров и расшифровка геномов вируса или его фрагментов до настоящего времени не проводились.

На начало 2024 года в Республике Дагестан (РД) было официально объявлено 96 пунктов не благополучных по ВЛКРС, в том числе на сельхозпредприятиях – 26 (из них 7 племхозы), в крестьянских (фермерских) – 17 и личных подсобных хозяйствах – 53. За последние три года (с 2021 по 2023 гг.) динамика распространения ВЛКРС шла по снижению процента инфицированности ВЛКРС поголовья по всей республике. Если в 2021 г. инфицированность ВЛКРС поголовья составила в 2021 г. 0,96% (6851), то в последующие годы она динамично снижалась: в 2022 г. 0,51% (4444); в 2023 г. 0,25% (2778) (см. таблица 7) [193,194].

Таблица 7 – Данные о распространении ВЛКРС в пунктах Республики Дагестан

Показатель	2021	2022	2023
Неблагополучные пункты на начало года	116	95	138
Выявлено неблагополучных пунктов в текущем году	18	88	35
Оздоровлено в текущем году	39	45	77
Осталось неблагополучных пунктов на конец года	95	138	96
Всего исследовано голов КРС на вирус лейкоза	720811	875854	1104224
Выявлено инфицированного скота, голов	6851	4444	2778
Выявлено инфицированного скота, %	0,96	0,51	0,25

По данным Комитета ветеринарии РД в 2023 году наибольшее количество неблагополучных пунктов по присутствию ВЛКРС зафиксировано в Кизлярском (18), Тарумовском (17), Бабаюртовском (16), Гунибском (15), Тляратинском (10) районах и г. Махачкале (9). В Бежтинском участке, Буйнакском, Дербентском, Казбековском, Каякентском, Кизилюртовском, Хасавюртовском районах и городах Хасавюрте и Южно-Сухокумске регистрировалось по 1 очагу, в Рутульском, Унцукульском районах – по 2; в Гергебильском, Лакском, Новолакском, Цумадинском – по 3; в Сергокалинском – 4; в Чародинском – 5, в Ахвахском, Дахадаевском, Карабудахкентском – по 6; в Ботлихском, Кумторкалинском и Шамильском районах – по 7 очагов [195,196].

В Республике с учетом природно–климатических условий и сезонных особенностей выпаса скота созданы ветеринарные станции, где проводятся диагностические исследования перегнанных животных из горных и предгорных зон на равнину в зимний период, в летний период их перегоняют обратно. По данным ветеринарных станций в 2023 г. на предмет присутствия ВЛКРС были исследованы 25827 пробы крови крупного рогатого скота методом РИД, в 287 (1,1%) из них были обнаружены антитела к ВЛКРС [195].

Распространение ВЛКРС в муниципальных районах и городских округах по данным комитета ветеринарии РД за 2023 г. приведено в таблице 8.

Таблица 8 – Данные о распространении ВЛКРС в муниципальных районах и городских округах в Республике Дагестан за 2023 г

1	2	3	4
Города и районы (неблагополучные)	Иssl–но проб по серологии	РИД (+)	% в РИД (+)
Неблагополучные районы			
Кизлярский	19696	388	2,0
Тляратинский	26570	341	1,3
Ботлихский	36435	450	1,2
Бабаюртовский	17556	188	1,1
Гунибский	28913	228	0,8
г. Махачкала	19156	180	0,9
Тарумовский	32090	105	0,3
Цумадинский	37562	120	0,3
Чародинский	29365	90	0,3
Кумторкалинский	14908	26	0,2
Гумбетовский	26880	58	0,2
Сергокалинский	15570	36	0,2
Шамильский	67821	165	0,2
Рутульский	23003	42	0,2
Дахадаевский	23726	29	0,1
Карабудахкентский	23333	5	0,02
Новолакский	11412	2	0,02
Ногайский	19676	5	0,03
Акушинский	90164	16	0,02
г. Хасавюрт	8876	6	0,07
Бежтинский	12284	7	0,06
Буйнакский	35339	3	0,008
Хасавюртовский	53430	1	0,002

Окончание таблицы 8

1	2	3	4
Благополучные районы			
г. Каспийск	1445	—	—
Казбековский	28028	—	—
Кайтагский	13493	—	—
Кизилюртовский	22921	—	—
Каякентский	15583	—	—
Кулинский	9681	—	—
Курахский	11799	—	—
Гергебельский	23143	—	—
Дербентский	23045	—	—
Докузпаринский	6992	—	—
Лакский	41762	—	—
Левашинский	26842	—	—
Магарамкентский	20797	—	—
С.Стальский	14438	—	—
Ахтынский	13594	—	—
Табасаранский	26255	—	—
Унцукульский	20146	—	—
Агульский	7751	—	—
Хивский	10913	—	—
Хунзахский	32216	—	—
Цунтинский	6401	—	—
Ахвахский	24852	—	—
ИТОГО:	1075862	2491	0,23

В рамках данного исследования был проведен сбор 643 пробы крови, взятых у молочного и мясного скота в хозяйствах Кизлярского, Кумторкалинского, Табасаранского, Унцукульского, Карабудахкентского, Буйнакского и Бабаюртовского районов.

Точки отбора проб представлены на рисунке 9, а данные по хозяйствам представлены в таблице 9.

1. Кизлярский район – с. Некрасовка, с. Кардоновка.
2. Кумторкалинский район – с. Алмало, с. Уллубиевка.
3. Табасаранский район – с. Хучни, с. Дюбек, с. Джули, с. Ерси, с. Гуми.
4. Карабудахкентский район – с. Карабудахкент (две точки в разных концах села).
5. Унцукульский район – с. Унцукуль, с. Бетли.
6. Буйнакский район – с. Халимбекаул, с. Чиркей, с. Эрпели.

7. Бабаюртовский район – Бабаюрт (СПК Агрокавказ), с. Мужукай, с. Герменчик.

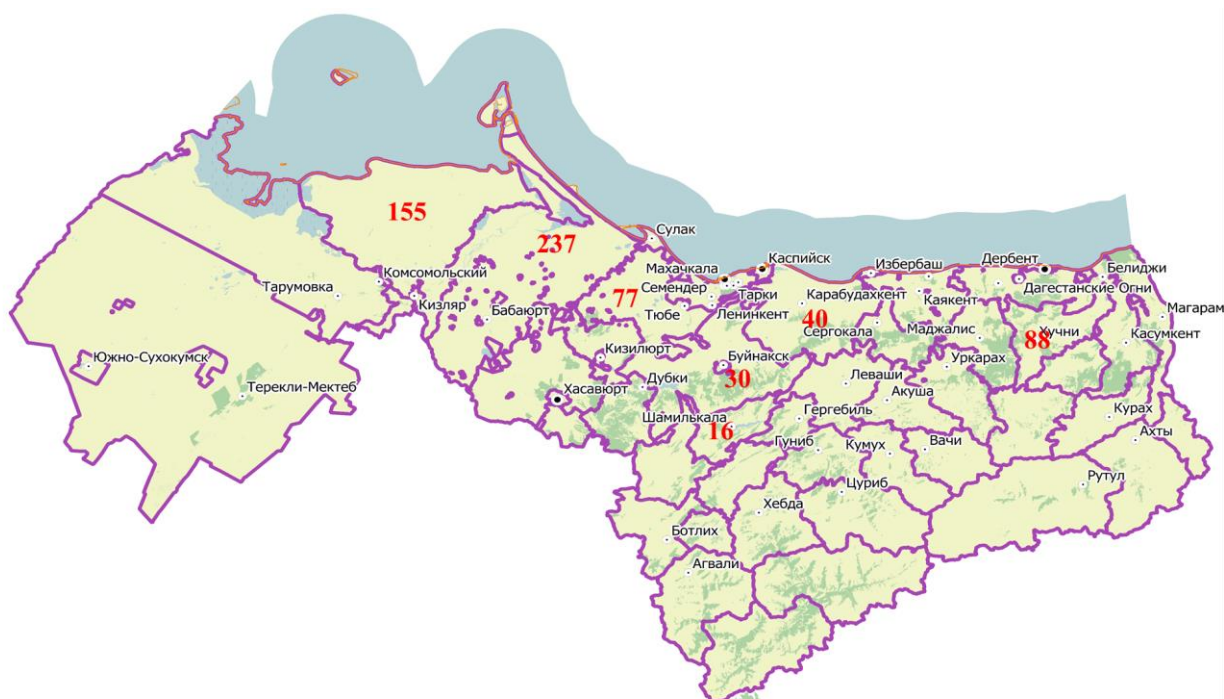


Рисунок 9 – Территории Республики Дагестан, вовлеченные в исследование (на карту цифрами красного цвета нанесено количество образцов крови коров, собранных для каждого из 7 районов РД, принимавших участие в исследовании)

Таблица 9 – Характеристика обследованных хозяйств Республики Дагестан

Район	Населённый пункт	Название хозяйства	Поголовье в районе	Поголовье в населённом пункте	Поголовье в хозяйстве	Способ осеменения	Преобладающая порода	Возраст лет M± SD
Кизлярский	с. Некрасовка	ООО Агрофирма «Молочник»	58455 (в т.ч. коров 33462)	880	500	Ректоцервикальная техника	Красно–степная	6.0 ± 3.27
	с. Кардоновка	СПК «Колхоз Вперед»		625	450	Ректоцервикальная техника	Красно–степная	
Бабаюртовский	с. Бабаюрт	СПК «Агрокавказ»	22672 (в т.ч. коров 12931)	1420	300	Ректоцервикальная техника	Сементал	2.5 ± 0.32
	с. Мужукай	–		791	–	Естественные	Красно–степная	
	с. Герменчик	–		1176	–	Естественные	Красно–степная	
Карабудахкентский	с. Карабудахкент	Фх–1	20728 (в т.ч. коров 5883)	1288	160	Естественное	Красно–степная, чёрно–пёстрая, калмыцкая	3.1 ± 1.88
		Фх–2			48			
Буйнакский	с. Халимбекау	–	40274 (в т.ч. коров 11096)	361	45	Естественное	Калмыцкая, красно–степная, кавказская бурая, черно пёстрая	3.0 ± 1.30
	с. Чиркей	–		4125	300			
	с. Эрпели	–		2866	10			
Унцукульский	с. Унцукуль	–	19082 (в т.ч. коров 9646)	2995	20	Естественное	Местная порода (низкорослая)	3.0 ± 1.35
Кумторкалинский	С. Алмало	ФХ «Гунибское»	11226 голов (в т.ч. коров 3824)	628	80	Ректоцервикальная техника	Красно–степная	6.0 ± 2.62
	С. Уллубиевка	ФХ «Чохское»		580	430	Ректоцервикальная техника	Красно–степная	
Табасаранский	С. Сиртыч	–	33050 (в т.ч. коров 9929)	–	200	Ректоцервикальная техника	Местная (низкорослая)	5.5 ± 3.03

В исследование были включены районы, представляющие три основных природно–географических зоны Республики Дагестан: низменную Терско–Сулакскую равнину, предгорную и горную зоны. Различия в рельефе, типах кормовой базы и организации скотоводства обуславливают потенциально разные условия для циркуляции вируса лейкоза крупного рогатого скота и реализации мероприятий по его контролю.

Кизлярский и Бабаюртовский районы расположены в пределах Терско–Сулакской низменности и характеризуются преимущественно равнинным рельефом с незначительными колебаниями высот. Климат засушливый, с жарким летом и мягкой малоснежной зимой, что способствует продолжительному пастбищному периоду. Вдоль русел крупных рек и оросительных каналов формируются участки интразональной растительности, обеспечивающие естественную кормовую базу для крупного рогатого скота в течение значительной части года.

Сельскохозяйственное производство в этих районах представлено как крупными хозяйствами, так и сетью коммерческих крестьянско–фермерских хозяйств, ориентированных на мясо–молочное скотоводство. Наличие капитальных помещений для стойлового содержания, выгульных дворов и развитой инфраструктуры для выпаса обеспечивает гибкую систему ведения животноводства, сочетающую стойловый и пастбищный типы содержания. Санитарно–гигиеническое состояние ферм и организация ветеринарного обслуживания существенно варьируют между хозяйствами, что отражается на уровне инфицированности ВЛКРС и характере распространения инфекции внутри поголовья.

Кизлярский район характеризуется высокой плотностью поголовья и преобладанием полустойлово–пастбищной системы содержания, тогда как в Бабаюртовском районе большую долю составляют коммерческие КФХ с относительно меньшим размером стад, но более тесным контактом животных в условиях ограниченных площадей. Эти особенности учитывались при

интерпретации эпизоотологических данных и филогенетического анализа выделенных геновариантов ВЛКРС.

Большинство сельскохозяйственных объектов в этих районах представлено небольшими горными и высокогорными хозяйствами, размещёнными на террасах и верхних частях склонов. Содержание животных носит преимущественно пастбищный характер с сезонной перегонкой скота между летними и зимними пастбищами. Ограниченный доступ автотранспорта и разрозненность населённых пунктов затрудняют централизованный ветеринарный контроль и проведение плановых профилактических мероприятий.

Такие условия формируют специфическую эпизоотическую ситуацию по ВЛКРС. С одной стороны, пространственная изолированность хозяйств может ограничивать занос новых геновариантов вируса, с другой – тесные контакты животных в пределах стада, использование общих пастбищ и инвентаря при недостаточной дезинфекции создают благоприятные предпосылки для внутрихозяйственного распространения инфекции.

Карабудахкентский и Буйнакский районы занимают предгорную зону, переходную между равнинными и горными территориями.

В этих районах распространены как средние по размеру фермерские хозяйства, так и более крупные предприятия мясо–молочного направления. Содержание скота носит смешанный характер: в тёплый период используются пастбища, в холодный – стойлово–выгульное содержание. Наличие развитой дорожной сети и относительная транспортная доступность способствуют активному обороту животных между хозяйствами и районами, включая завоз племенного скота из других регионов.

3.3.2 Сбор образцов крови КРС и молекулярно–генетический анализ выделенных образцов ВЛКРС на территории Республики Дагестан

В данной работе было собрано 643 образца из семи районов Республики Дагестан (Кизлярский, Бабаюртовский, Унцукульский, Карабудахкентский, Буйнакский, Кумторкалинский, Табасаранский). Животные для анализа выбирались случайным образом. Районы Республики Дагестан выбирались по

максимальному удалению друг от друга, от близости к прибрежной зоне, а также разной высотой над уровнем моря и соответственно разным климатом. Из образцов цельной крови крупного рогатого скота (КРС) была выделена популяция моноклеарных клеток, из которых выделялась суммарная клеточная ДНК, используемая в дальнейшем для ПЦР–диагностики животных на выявление ДНК ВЛКРС. Результаты ПЦР–анализа представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Данные по анализу наличия ДНК ВЛКРС и выявленных генотипах вируса в исследованных образцах крови

Локация	п образцов	Возраст, лет $M \pm SD$	ДНК ВЛКРС (+)	ДНК ВЛКРС (–)	Инфицированность, %	Генотип G4 (n)	Генотип G7 (n)
Бабаюртовский*	237	$5,0 \pm 1,5$	21	216	8,9	9	7
Карабудахкентский*	40	$2,9 \pm 1,0$	2	38	5,0	2	0
Унцукульский*	16 [#]	$5,5 \pm 1,2$	0	16	0,0	0	0
Буйнакский*	30	$2,9 \pm 0,8$	1	29	3,3	0	0
Кумторкалинский*	77	$6,2 \pm 1,8$	1	76	1,3	1	0
Табасаранский**	88	$5,0 \pm 1,5$	24	64	27,3	18	6
Кизлярский**	155	$6,8 \pm 2,0$	87	68	56,1	85	2
Всего	643	$5,3 \pm 1,8$	136	507	21,2	115 [#]	15 [#]
#Из 136 ДНК–положительных образцов генотип вируса (G4 или G7) был определён в 130 случаях; в 6 образцах по результатам секвенирования генотип не был установлен из-за неоднозначных хроматограмм. * крупные фермерские хозяйства ** крупные животноводческие хозяйства в крупных животноводческих хозяйствах поражённость ВЛКРС была статистически значимо выше, чем в совокупности в крупных фермерских хозяйствах РД ($p < 0,00001$) Доля генотипа G4 в РД статистически значимо преобладала над долей генотипа G7 ($p < 0,00001$).							

В ходе проведённого исследования были изучены образцы крови крупного рогатого скота, собранные из семи районов Республики Дагестан, расположенных на различных географических высотах и имеющих разные природно–

климатические условия. Всего собрано 643 образца, из которых 136 (21,2%) оказались положительными на наличие ДНК ВЛКРС.

Полученные результаты свидетельствуют о значительной вариабельности встречаемости ВЛКРС в различных районах Дагестана. Показатель выявляемости ДНК ВЛКРС варьировал от 0 до 56,1%, что демонстрирует существенную различия в пораженности животных между районами. Медианное значение инфицированности составило 5,0%.

По результатам ПЦР анализа в Унцукульском районе не было обнаружено инфицированных животных. Возможно, это связано с тем, что Унцукульский район расположен в горной части Республики Дагестан и характеризуется наличием мелких фермерских хозяйств с естественным способом осеменения и содержанием животных местных низкорослых пород с низкой молочной продуктивностью (3–4 литра в сутки). Также возможно, данный факт связан с маленькой выборкой скота, собранной в данном районе.

Низкую пораженность ВЛКРС (1,3% и 3,3%) также демонстрировали Кумторкалинский район (1 из 77 животных) и Буйнакский район (1 из 30 животных). Оба района относятся к территориям с предгорной топографией и характеризуются наличием естественного способа осеменения животных.

Карабудахкентский район показал инфицированность на уровне 5,0% (2 из 40 животных), что сходится со статистическими данными об встречаемости в данном регионе упомянутыми выше.

Бабаюртовский район продемонстрировал промежуточный уровень инфицированности 8,9% (21 из 237 животных). Несмотря на то, что этот район расположен на равнине и имеет благоприятные природно–климатические условия для развития животноводства и большую численность скота в данном регионе, уровень встречаемости ВЛКРС остаётся относительно умеренным.

Табасаранский район показал инфицированность 27,3% (24 из 88 животных), что существенно превосходит большинство других районов, несмотря на географическое расположение в предгорной и среднегорной зоне республики.

Наибольшая пораженность скота была выявлена в Кизлярском районе, где 56,1% протестированных животных (87 из 155) содержали ДНК ВЛКРС. Кизлярский район, расположенный в северной части республики на равнинной Прикаспийской низменности, оснащен крупными коммерческими фермерскими хозяйствами, в которых применяется система искусственного осеменения и привязное содержание части животного поголовья. При сравнении встречаемости ВЛКРС в крупных фермерских хозяйствах РД и крупных животноводческих комплексах было установлено, что доля ПЦР–положительных животных в фермерских хозяйствах составила 6,3% (25/400), тогда как в крупных животноводческих хозяйствах – 45,7% (111/243). Различия между группами оказались статистически значимыми по критерию χ^2 Пирсона ($p < 0,00001$). Высокий уровень инфицированности в Кизлярском и Табасаранском районах согласуется с результатами, полученными ранее в Новосибирской области, где крупные хозяйства также демонстрировали высокую пораженность ВЛКРС.

Для анализа генетического разнообразия выделенных ВЛКРС использовали полученные нуклеотидные последовательности env–gp51 протяженностью около 804 п.н. Для построения филогенетического дерева были включены 130 расшифрованных в рамках работы нуклеотидных последовательностей env ВЛКРС и референсные нуклеотидные последовательности ВЛКРС, ранее классифицированные в известные генотипы G1–G12. Дополнительно в филогенетический анализ были включены максимально идентичные нуклеотидные последовательности ВЛКРС из GenBank, отобранные с помощью ресурса Blast (см. рисунок 10).

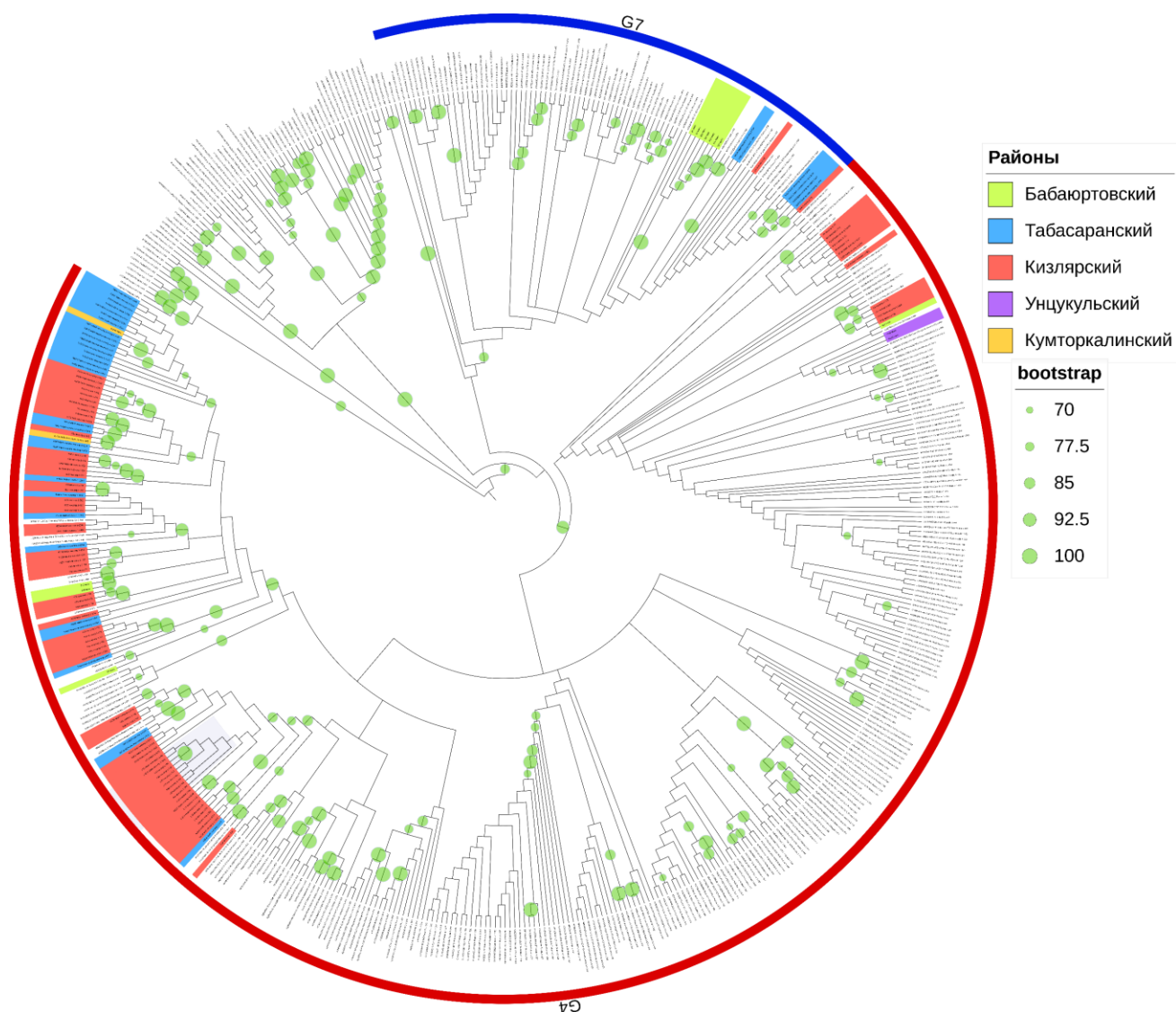


Рисунок 10 – Филогенетическое дерево вариантов ВЛКРС, выделенных в Республике Дагестан (происхождение образцов обозначено цветовой кодировкой. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank.

Филогенетический анализ проведён методом максимального правдоподобия (модель замены K2P + G4), реализованным в онлайн–программе IQ–TREE v1.6.12. Для моделирования вариации скорости эволюции среди сайтов применено дискретное гамма–распределение. Размер кружков у внутренних узлов отражает величину бутстреп–поддержки ветвей (большой кружок соответствует более высокому значению бутстрепа); отображены только значения $\geq 70\%$

В выборке последовательностей ВЛКРС, выделенных в Республике Дагестан, отмечено преобладание генотипа G4 (115/130; 88,5%) над генотипом G7 (15/130; 11,5%). Доля генотипа G7 была статистически значимо ниже (по критерию χ^2 Пирсона, $p < 0,00001$).

Популяция G7 ВЛКРС, исследованная в данной работе, демонстрировала высокую степень однородности. Филогенетический анализ выделенных образцов выявил статистически значимую кластеризацию между образцами из Табасаранского и Кизлярского районов (кластер с уровнем поддержки 80). А также мы выявили два статистически значимых кластера в двух хозяйствах это хозяйство из Бабаюртовского района из 7 образцов (кластер с уровнем поддержки 90) и кластер из Табасаранского района, в который входило 4 образца (кластер с уровнем поддержки 84). Высокая степень поддержки ветвей для образцов из одного хозяйства может свидетельствовать о распространении инфекции ВЛКРС внутри хозяйств. Для G7 сохраняется тенденция меньшей представленности в популяции по сравнению с G4 генотипом ВЛКРС (см. раздел 3.1.2).

Генотип G4 был представлен во всех районах республики, в которых проводились исследования. В ходе исследования было выявлено несколько кластеров генетически близких вирусов G4 с коэффициентом поддержки 90 и выше которые были получены в одном хозяйстве. Это подтверждает факт распространения вируса лейкоза между животными внутри одного хозяйства.

В G4 выделяется один большой кластер с уровнем поддержки 75, в который входят как образцы из Республики Дагестан из 4-х районов (Табасаранский, Кизлярский, Кумторкалинский и Бабаюртовский), но и образцы, полученные на территориях Казахстана и Ростовской области. Этот факт подчеркивает возможность распространения данных геновариантов ВЛКРС в Республике Дагестан в ходе закупки племенного скота с территории Казахстана.

3.3.3 Сравнительный молекулярно–генетический анализ области гена env–gp51 вариантов ВЛКРС, выделенных на территориях Республики Дагестан и Новосибирской области

Для анализа генетического разнообразия выделенных ВЛКРС использовали полученные нуклеотидные последовательности env–gp51 протяженностью около 804 п.н. Сравнительный филогенетический анализ образцов из Республики Дагестан и Новосибирской области показал несколько закономерностей. Образцы

из Республики Дагестан не кластеризовались с образцами из НСО, образцы из РД образовывали одну крупную ветвь в G4 генотипе, образцы были сгруппированы с образцами из Казахстана и Ростовской области, и не имели пересечений с образцами из Новосибирской области (ветви обозначены красным(звездой)). Также в G4 генотипе был обнаружен кластер из трёх образцов с высоким уровнем поддержки (80) с образцами G4 генотипа из Молдовы, Калуги и Дагестана (ветви обозначены зелёным (звездой)). Образцы G4 генотипа полученные из районов Новосибирской области образовывали небольшие кластеры 2–4 образца из одного хозяйства (см. рисунок 11).

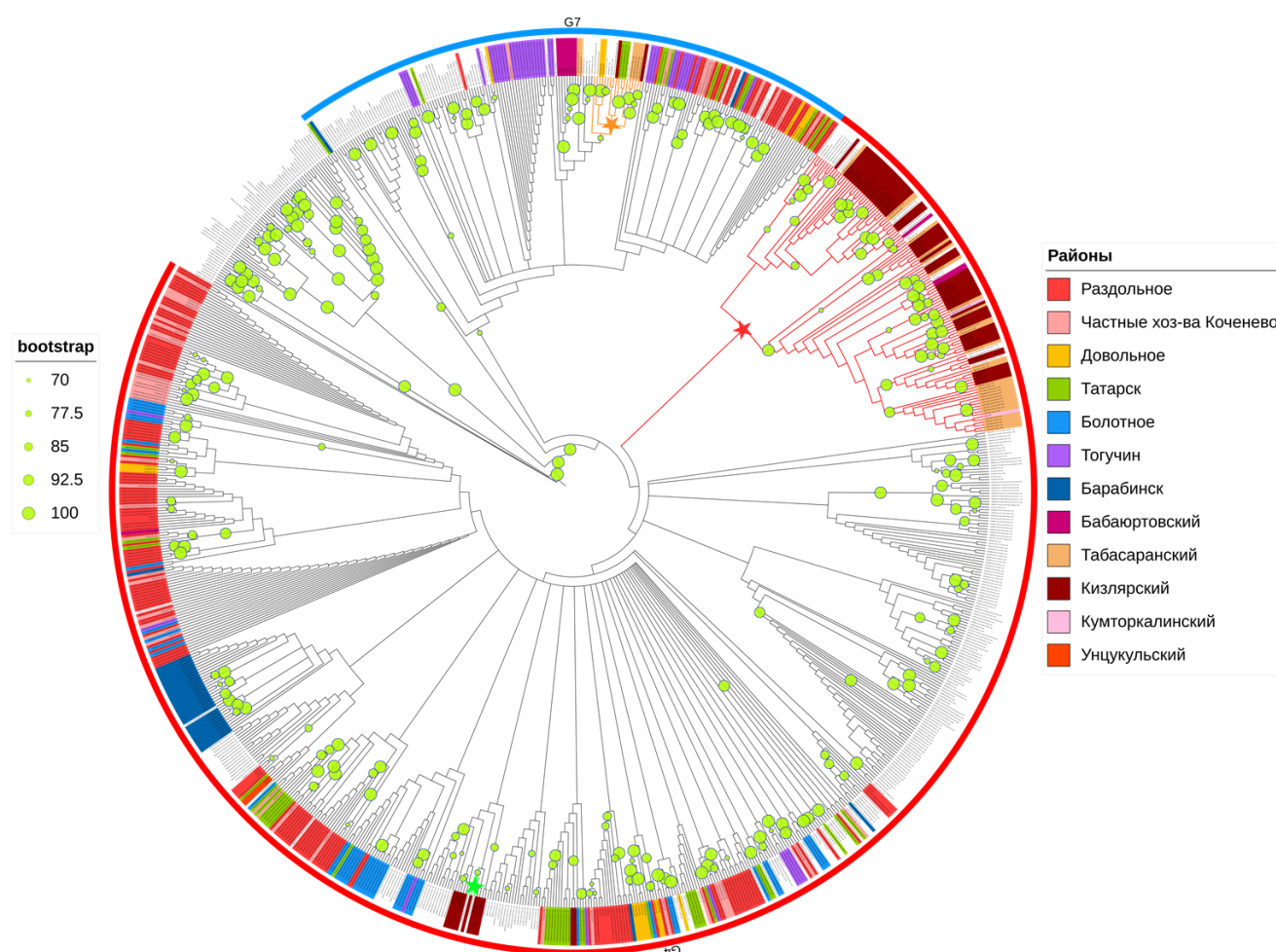


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево, построенное для области env–gp51 образцов ВЛКРС, выделенных в Республике Дагестан и на территориях Новосибирской области (происхождение образцов обозначено цветовой кодировкой. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank. Филогенетический анализ проведён методом максимального правдоподобия (модель замены K2P + G4), реализованным в онлайн–программе IQ–TREE v1.6.12. Для моделирования вариации скорости эволюции среди

сайтов применено дискретное гамма–распределение. Размер кружков у внутренних узлов отражает величину бутстреп–поддержки ветвей (большой кружок соответствует более высокому значению бутстреп), отображены только значения $\geq 70\%$

Данные факты говорят о не менее, чем двух разных путях происхождения инфекции ВЛКРС генотипа G4 на этих территориях России.

Генотип G7 характеризовался похожей картиной с генотипом G4: основная масса последовательностей формировала два крупных кластера для образцов из РД и для образцов из НСО, в которых наблюдалась внутривладельческая группировка ВЛКРС, за исключением нескольких последовательностей вируса, образующих одну большую ветвь вместе с образцами из Казахстана, Молдовы, Московской области, Доволенского и Татарского районов НСО, Кизлярского и Табасаранского районов РД (ветви обозначены жёлтым (звездой)).

В Новосибирской области поражённость скота ВЛКРС существенно выше (60,3% vs 21,2%; $p < 0,00001$), данное сравнение было проведено как для индивидуальных фермерских хозяйств, так и для крупных животноводческих хозяйств и для совокупной выборки по территориям (по критерию χ^2 Пирсона, $p < 0,00001$ во всех трёх случаях). Это может быть связано с различиями в системах содержания скота, интенсивностью животноводства и методами ветеринарного контроля. В обоих регионах преобладает генотип G4, но в Республике Дагестан его доля выше (84,6% vs 75,2%), а соотношение G4/G7 составляет 7,7:1 против 3,0:1 в НСО (см. таблицу 11).

Таблица 11 – Сравнительная характеристика геновариантов ВЛКРС в Новосибирской области и Республике Дагестан

Параметр	Новосибирская область	Республика Дагестан	P-value (НСО vs РД)
Число обследованных районов	6 (Коченевский, Болотнинский, Татарский, Тогучинский, Барабинский, Доволенский)	7 (Кизлярский, Бабаюртовский, Табасаранский, Унцукульский, Буйнакский, Карабудахкентский, Кумторкалинский)	—
Всего собрано образцов крови	543	643	—
Доля инфицированных животных, %	60,3	21,2	p < 0,00001
Средний возраст обследованных животных, лет (M±SD)	4,1±0,6	5,3±1,8	—
Преобладающий генотип	G4 – 75,2% (313/417)	G4 – 88,5% (115/136)	p < 0,00001
Минорный генотип	G7 – 24,8% (103/417)	G7 – 11,5% (15/136)	p < 0,00001
Соотношение G4/G7	3,0:1	7,7:1	p = 0,0014
Диапазон инфицированности по районам	G4: 16,7– 100% G7: 0– 83,3%	G4: 0– 56,1% G7: 0– 27,3%	—
Район с преобладанием G7	Тогучинский (83,3% G7)	Бабаюртовский (43,8% G7)	p < 0,00001
Район с доминированием G4	Болотнинский (100% G4)	Кизлярский (97,5% G4)	p < 0,00001

Только в Тогучинском районе НСО статистически значимо наблюдается доминирование генотипа G7 (83,3%, p < 0,00001), что не характерно ни для других районов НСО, ни для РД. Геноварианты из РД демонстрируют тесные

филогенетические связи со штаммами ВЛКРС из стран постсоветского пространства (Украина, Казахстан, Молдова). В обоих исследованных регионах выявлены генетически идентичные или близкородственные кластеры ВЛКРС в пределах одного хозяйства, что подтверждает горизонтальный путь передачи инфекции.

3.4 Анализ мутаций гена env выделенных провирусов ВЛКРС

3.4.1 Анализ мутаций последовательностей гена env ВЛКРС, выделенных на территории Новосибирской области

Среди полученных в Новосибирской области 417 последовательностей гена env ВЛКРС было выявлено 78 уникальных нуклеотидных последовательностей, то есть вариантов, отличающихся друг от друга как минимум одной нуклеотидной заменой. Идентичные нуклеотидные последовательности были исключены из дальнейшего анализа в программе Jalview с использованием функции Remove redundancy. Данные нуклеотидные последовательности были переведены в соответствующие им аминокислотные последовательности для оценки мутационных различий в целевом регионе генома ВЛКРС.

Множественное выравнивание полученных аминокислотных последовательностей относительно референсной последовательности штамма FLK–ВЛКРС выявило 74 замены аминокислот, которые включали 44 мутации в ВЛКРС G4 и 30 в вирусах G7 (см. рисунок 12).



Рисунок 12 – Выравнивание аминокислотных последовательностей гена env ВЛКРС, выполненное для 78 геновариантов, выделенных в Новосибирской области России (на рисунке отмечены отличия от референсной последовательности FLK–ВЛКРС. Выравнивание и визуализацию последовательностей выполняли в программе Jalview)

В сводной таблице 12 приведен полный список выявленных мутаций гена env выделенных провирусов ВЛКРС. В анализ включали только те мутации, которые

присутствовали как минимум в трёх последовательностях, чтобы исключить потенциальные артефакты секвенирования и варианты, встречающиеся однократно. В работе описаны как редкие мутации (обнаруженные в небольшом проценте случаев), так и аминокислотные замены, характерные для большинства исследованных образцов.

Таблица 12 – Основные мутации аминокислотных последовательностей гена env ВЛКРС из Новосибирской области с информацией о локализации мутации в функциональном домене env, генотипе вируса и встречаемости мутаций среди всех 78 уникальных анализируемых последовательностей

Мутация	Функциональный домен	Встречаемость	Генотипы
N9S/T	GP51	6%	G4
Q10P/H/S	GP51	11%	G4
A15T	GP51	98%	G4, G7
A15I	GP51	13%	G7
N17K	GP51	10%	G4, G7
N17S/E	GP51	5%	G4
S23F	GP51	Специфична для российского G4 (97%)	G4
A40P	GP51	Специфична для российского G4 (95%)	G4
K41R	GP51	96%	G4, G7
K41S*	GP51	3%	G4
S49F	GP51	97%	G4, G7
A86T	CD8+T–клеточный эпитоп	12%	G4, G7
R88H	CD8+T–клеточный эпитоп	Специфична для российского G4 (98%)	G4
H109R	ND1 (нейтрализующий домен 1)	5%	G4, G7
I111T	ND1 (нейтрализующий домен 1)	Специфична для российского G4 (79%)	G4
N155D/S	ND2 (нейтрализующий домен 2)	6%	G4
S221L*	ND3 (нейтрализующий домен 3)	99%	G4, G7
A258V	Эпитоп А	Специфична для российского G7 (100%)	G7
Дополнительные замены	Различные домены	1,2– 3,8%	G4, G7
*Мутации, которые были обнаружены впервые в рамках данной работы. Специфичность и преобладание мутаций у соответствующего генотипа ВЛКРС подтверждены статистически ($p > 0,00001$).			

Новые, ранее не описанные замены аминокислот для ВЛКРС были выявлены в двух позициях. Замена K41R (GP51) присутствовала в 96% образцов. Замена S221L (ND3) была обнаружена в 99% образцов G4, G7.

Замена A15T в области GP51 наблюдалась в 98% образцов ВЛКРС генотипов G4 и G7. Замена A15I присутствовала в 13% образцов G7 и в 8% образцов G4, тогда как другие варианты содержали в этой позиции референсный аланин.

В референсной последовательности ВЛКРС генотипа G1 (США) и генотипа G8 (Украина) в позиции 15 белка gp51 находится аланин (A15). Замена A15T была ранее описана для вирусов G4, циркулирующих в Молдове, Польше, Бельгии и Франции, а также для ВЛКРС генотипа G12. Среди штаммов G7 из Молдовы замена A15I наблюдается часто [99,103,111].

Замена S49F (GP51) была выявлена в 97% образцов. Эта замена ранее описана у штаммов G7 из Молдовы и России, у штаммов G4 из Молдовы, Африки и Франции, у генотипа G8 из Украины, G10 из Таиланда и G12 из Казахстана [7,10,99,103,106,111].

Замена A258V в эпитопе А, характерная для штаммов G7, была обнаружена в 100% исследованных образцов ($p < 0,00001$). Эта мутация ранее была описана для ВЛКРС G7 из России и Молдовы. В наборе образцов G4 аминокислота в позиции 258 соответствовала референсной последовательности, которая также консервативна в штаммах G4 из Молдовы, Франции и Африки [7,10,99,103,106,111].

К мутациям, специфичным для российского ВЛКРС генотипа G4, относятся замены в позициях S23F (GP51), A40P (GP51), R88H (CD8⁺ Т-клеточный эпитоп GP51) и I111T (ND1 GP51).

Замена S23F характерна для штаммов G4 из Молдовы и Франции. В ранее изученных коллекциях вирусы G7 не включали последовательности, совпадающие

с референсом в этой позиции, что согласуется с описанными вариантами G7 из Молдовы. Замена A40P также была задокументирована у штаммов G4 из Молдовы, Бельгии, Франции и Китая [103,197].

Замена R88H характерна для штаммов G4 из Молдовы, Бельгии, Польши, Франции, Африки и Китая. Аналогично, замена I111T описана в последовательностях G4 из Молдовы, Франции и Африки [103,197].

Частота встречаемости замен S23F (97%), A40P (95%), R88H (98%) и I111T (79%) у генотипа G4 статистически значимо превышает их встречаемость у G7 ($p < 0,00001$), что подтверждает их генотип-специфичный характер для российских вариантов ВЛКРС.

Мутации в позициях N9S/T (GP51), Q10P/H/S (GP51) и N155D/S (ND2) были характерны для двух и более образцов генотипа G4. Напротив, замены A86T (CD8+ T-клеточный эпитоп) и H109R (ND1) не были специфичными для какого-либо определённого генотипа и встречались как в G7, так и в G4.

Одиночные мутации были выявлены в различных участках изученного фрагмента гена env, каждая из которых встречалась в небольшом проценте случаев (0,3–3%). Наибольшая аминокислотная вариабельность в нашей выборке вирусов наблюдалась в области GP51, особенно в позиции 17 (N17→K/S/E), при этом замена N17K была наиболее частой.

Мутации A15T, S49F, K41R и S221L, обнаруженные более чем в 97% последовательностей G4 и G7, вероятно, представляют собой ключевые детерминанты приспособленности или функциональные оптимумы, сформировавшиеся на ранних этапах исторической циркуляции вируса в данном регионе. Специфичный для российских геновариантов G4 кластер замен (S23F, A40P, R88H, I111T) предполагает вторичную стадию локальной адаптации, которая, вероятно, произошла в процессе дивергенции и закрепления этих генотипов в сибирской сети животноводства. Специфичная для G7 замена A258V в эпитопе A демонстрирует генотип-специфическую эволюционную траекторию,

отражающую различные адаптационные истории этих двух линий. Примечательно, что анализ отбора по кодонам в современных популяциях Новосибирской области выявил преобладающий очищающий отбор (среднее значение $dN/dS = 0,181 \pm 0,255$; 96,37% сравнений с $dN/dS < 1,0$; $p < 0,001$), что указывает на то, что накопившиеся мутации стали фиксированными и в настоящее время поддерживаются очищающим отбором.

3.4.2 Анализ мутаций последовательностей гена env ВЛКРС, выделенных на территории Республики Дагестан

При анализе исследованных последовательностей гена env ВЛКРС, выделенных на территории Республики Дагестан, было обнаружено 90 уникальных нуклеотидных последовательностей вируса, которые были отобраны для детального анализа. Они были переведены в соответствующие им аминокислотные последовательности для оценки мутационных различий в целевом геномном регионе ВЛКРС. Множественное выравнивание полученных аминокислотных последовательностей выявило 52 мутации, которые включали в себя 28 замен в G4 и 24 замены в G7 (см. рисунок 13).

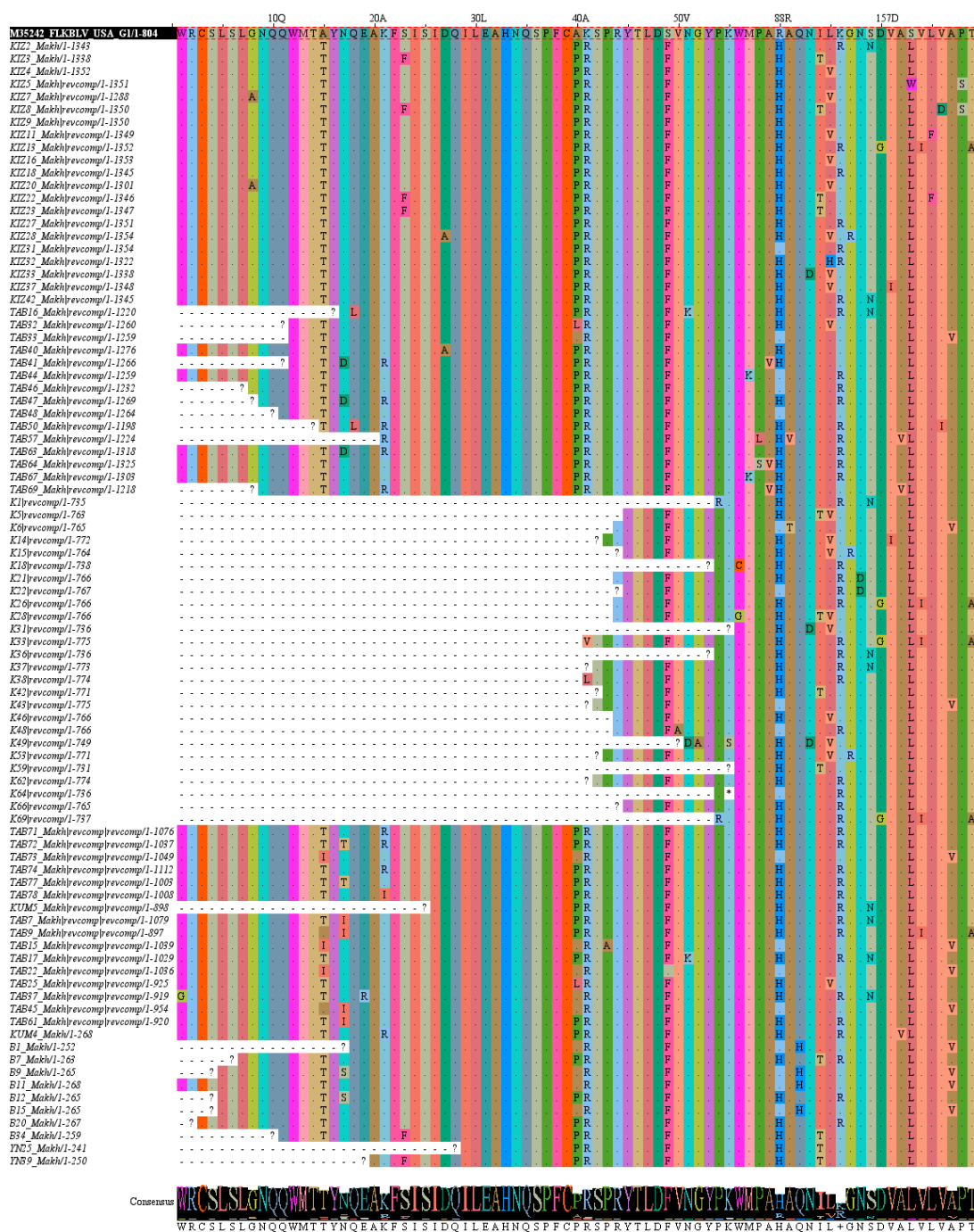


Рисунок 13 – Выравнивание аминокислотных последовательностей гена env ВЛКРС, показывающее 90 геновариантов, выделенных в Республике Дагестан (на рисунке отмечены отличия от референсной последовательности FLK–ВЛКРС. Выравнивание и визуализацию последовательностей выполняли в программе Jalview)

В сводной таблице 13 приведен список выявленных мутаций. В анализ включали только те мутации, которые присутствовали как минимум в трёх последовательностях, чтобы исключить потенциальные артефакты секвенирования

и варианты, встречающиеся однократно. В работе описаны как редкие одиночные мутации (обнаруженные в небольшом проценте случаев), так и аминокислотные замены, характерные для большинства исследованных образцов.

Таблица 13 – Основные мутации аминокислотных последовательностей гена env ВЛКРС из Республики Дагестан с информацией о локализации мутации в отдельном функциональном домене, генотипе вируса и встречаемости мутации среди всех анализируемых последовательностей

Мутация	Функциональный домен	Встречаемость	Генотипы
A15T	GP51	91% (52 из 57)*	G4, G7
A15I	GP51	5% (3 из 57)*	G4, G7
N17D/T/I/S	GP51	19% (11 из 58)*	G4, G7
K21R	GP51	18% (11 из 62)*	G4, G7
S23F	GP51	10% (6 из 63)*	G4
A40P/L	GP51	85% (55 из 65)*	G4, G7
K41R	GP51	97% (65 из 67)*	G4, G7
S49F	GP51	99% (80 из 81)*	G4, G7
A86V	CD8+ Т–клеточный эпитоп	3%	G4
R88H	CD8+ Т–клеточный эпитоп	Специфична для русского G4 (100%)	G4
Q102H	ND1 (нейтрализующий домен 1)	4%	G7
N108D	ND1 (нейтрализующий домен 1)	3%	G4
I111T	ND1 (нейтрализующий домен 1)	Специфична для русского G4 (13%)	G4
L116V**	ND1 (нейтрализующий домен 1)	Специфична для Дагестана G4 (20%)	G4
K117R**	ND1 (нейтрализующий домен 1)	Специфична для Дагестана (50%)	G4, G7
S156N**	ND2 (нейтрализующий домен 2)	Специфична для Дагестана G4 (11%)	G4
A208V	ND3 (нейтрализующий домен 3)	3%	G4
S221L	ND3 (нейтрализующий домен 3)	100%	G4, G7
V239I	ND3 (нейтрализующий домен 3)	6%	G4
A258V	Эпитоп А	Специфична для русского G7 (61%)	G7
T264A	Эпитоп В	6%	G4
Дополнительные замены	Различные домены	1,2– 2%	G4, G7
* В связи с тем, что не все образцы охватывали изучаемый участок, частоты мутаций рассчитаны только для тех последовательностей, длина которых включала данный регион. **Мутации, которые были обнаружены впервые в рамках данной работы. Специфичность и преобладание мутаций у соответствующего генотипа ВЛКРС подтверждены статистически ($p > 0,00001$).			

Замена L116V в нейтрализующем домене 1 (ND1) была обнаружена исключительно в Дагестане среди геновариантов G4 (20% образцов). Данная мутация была обнаружена впервые, по данным анализа доступных последовательностей и литературных источников, ранее не описывалась ни для вариантов из Новосибирской области и других регионов России, ни для зарубежных штаммов ВЛКРС.

Замена K117R в ND1 также оказалась уникальной для Дагестана и встречалась с высокой частотой (около 50%) среди образцов генотипов G4 и G7, при этом полностью отсутствуя в новосибирских вариантах и не упоминаясь в доступной литературе по вариабельности gp51, что позволяет рассматривать её как наиболее характерную регионально–специфичную замену для данной территории.

Замена S156N в нейтрализующем домене 2 (ND2) выявлена только в Дагестане среди геновариантов G4 (11% образцов) и, согласно анализу опубликованных данных по мутациям в ND2, ранее не описывалась ни в регионах России, ни в панелях зарубежных ВЛКРС.

Указанные аминокислотные замены L116V, K117R (ND1) и S156N (ND2) впервые описаны в рамках настоящего исследования.

Концентрация мутаций в нейтрализующих доменах ND1 (позиции 74– 102), ND2 (131– 149) и ND3 (228– 238) гена env ВЛКРС обусловлена их ключевой ролью во взаимодействии вируса с иммунной системой хозяина и клеточными рецепторами. ND1– ND3 представляют собой основные мишени нейтрализующих антител, которые блокируют связывание вируса с рецепторами на поверхности лимфоцитов и индуцируют слияние мембран. Высокая мутагенность этих доменов обусловлена позитивным отбором под давлением гуморального иммунитета, что позволяет вирусу уклоняться от нейтрализующих антител, сохраняя при этом функциональность рецептор–связывающих сайтов. Региональная специфика (L116V, K117R в Дагестане) указывает на локальную коэволюцию с породами КРС и условиями содержания, в то время как мутации (R88H, I111T), встречающиеся в

НСО, свидетельствуют о длительной циркуляции линий G4. Анализ показывает преобладание очищающего отбора в gp51 ($dN/dS = 0,178$, $p < 0,001$), но для областей ND характерен позитивный отбор, что объясняет их высокую вариабельность как адаптивную стратегию выживания ВЛКРС в эндемичных популяциях.

3.5 Анализ мутаций полногеномных последовательностей ВЛКРС

В настоящем исследовании для анализа полных геномов были отобраны образцы от коров различных возрастных групп (от 3 месяцев до 10 лет), пород и с разным эпизоотическим статусом по ВЛКРС, что позволило обеспечить репрезентативный охват исследуемой популяции. В итоговую выборку вошли животные из хозяйств с различной встречаемостью ВЛКРС, расположенных в нескольких районах Новосибирской области и Республики Дагестан, что обеспечило учёт территориальной неоднородности циркуляции вируса и распределения генотипов. Такое построение выборки позволило рассматривать полученные полногеномные последовательности как отражающие реальное генетическое разнообразие циркулирующих в данных регионах генотипов G4 и G7 ВЛКРС и использовать их для последующего филогенетического и популяционно-генетического анализа.

В результате данной работы впервые было получено и проанализировано 44 образца ВЛКРС генотипа G7 (15 из РД, 39 из НСО) и 110 образцов генотипа G4 (26 из РД, 84 из НСО). В качестве референса для последовательностей были выбраны NC_001414_Ref первого генотипа хронически зараженной культуры FLK–ВЛКРС. Для последовательностей генотипа 4 в международной базе данных присутствует две последовательности ВЛКРС AF033818_USA_G-4 и KT122858_Belgium_1984_G4. Для анализа мутаций использовались все структурные и функциональные белки ВЛКРС за исключением области LTR.

Нумерация нуклеотидов проводилась от первого нуклеотида каждого из генов согласно полной геномной последовательности ВЛКРС. Мы учитывали мутации, которые встречались в 3% образцов и выше (от четырех замен на сайт).

3.5.1 Мутации в структурных генах

Мутации в гене Gag вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС)

Ген Gag вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) кодирует полипротеин Gag, который в процессе посттрансляционной обработки расщепляется вирусной протеазой с образованием трёх основных структурных белков: матриксного (МА, р15), капсидного (СА, р24) и нуклеокапсидного (НС, р12). Эти домены обеспечивают формирование вирусной частицы, упаковку геномной РНК и её защиту, а также играют ключевую роль на этапах сборки, почкования и созревания вириона. МА-домен участвует в мембранной ассоциации и адресации Gag к плазматической мембране, СА формирует белковый каркас капсида и определяет его пространственную организацию, тогда как НС с цинковыми пальцами типа Cys–His опосредует специфическое связывание с нуклеиновыми кислотами и упаковку вирусного генома [21].

Поскольку структурные белки непосредственно определяют морфогенез и стабильность вириона, даже умеренное число аминокислотных замен в гене gag может оказывать существенное влияние на эффективность репликации и передачу вируса. Анализ вариабельности gag у полногеномных последовательностей ВЛКРС генотипов G4 и G7 позволяет выявить как консервативные участки, критичные для жизнеспособности вируса, так и генотип-специфические мутации в доменах МА, СА и НС. Эти замены потенциально могут отражать адаптацию вируса к различным эпидемиологическим условиям и популяциям хозяина, а также служить дополнительными молекулярными маркерами для дифференциации генотипов и отслеживания путей передачи ВЛКРС. Список ключевых аминокислотных замен в гене Gag (р15–МА, р24–СА, р12–НС) вируса лейкоза крупного рогатого скота представлен в таблице 14.

Таблица 14 – Ключевые аминокислотные замены в гене Gag (p15–МА, p24–СА, p12–NC) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7, выявленные по данным полногеномного секвенирования 154 провирусов из Новосибирской области и Республики Дагестан, полученные в нашем исследовании

Мутация	Функциональный домен	Встречаемость	Генотипы
P5A	Gag (p15–МА)	28 %	G7, G4
N29D	Gag (p15–МА)	Специфична для G4 (56%)	G4
H48Y*	Gag (p15–МА)	40%	G7, G4
Инсерция AP –90–91	Gag (p15–МА)	Специфична для G7(100%)	G7
Y104P	Gag (p15–МА)	6,5%	G7, G4
V109I	Gag (p15–МА)	Специфична для G7(8%)	G7
I279V	Gag (p24–СА)	56%	G4
V319I/T	Gag (p24–СА)	I–98%, T–1%	G4, G7
V324I	Gag (p12–NC/Zn–finger)	97%	G4, G7
P344S	Gag (p12–NC/Zn–finger)	57%	G4, G7
Точечные мутации	–	1%–3%	G4, G7
*Мутации, которые были обнаружены впервые в рамках данной работы. Специфичность и преобладание мутаций у соответствующего генотипа ВЛКРС подтверждены статистически ($p > 0,00001$).			

В матричном домене p15 выявлен ряд аминокислотных замен, часть из которых общая для обоих генотипов, а часть – строго генотип–специфична. На N–конце МА обнаружены замены P5A (28% образцов, G4 и G7) и N29D (56% вариантов G4, отсутствует у G7). Примечательно то, что мутация N29D была свойственна ВЛКРС, циркулирующим на территории Дагестана. P5A представляет собой умеренно консервативную замену вблизи N–конца гена, тогда как впервые обнаруженная замена N29D приводит к потере полярного незаряженного остатка и появлению отрицательного заряда. Учитывая, что для ВЛКРС показано наличие в МА кластеров основных аминокислот, участвующих в связывании геномной РНК и упаковке вирусного генома, замена N29D может перераспределять заряд на поверхности МА и тонко модифицировать эффективность взаимодействия с РНК у генотипа G4 по сравнению с G7 [57,198].

Замена H48Y (40% вариантов, G4 и G7) также локализована в МА и затрагивает гистидин, способный к протонированию и участию в координации, который заменяется на ароматический остаток тирозина. Это может влиять на

локальные структурные взаимодействия в МА–домене и, опосредованно, на стабильность Gag и процесс сборки частиц, хотя прямых функциональных данных по этой позиции для ВЛКРС в литературе нет. Инсерция двух аминокислот (АР–90–91), специфичная для генотипа G7 (100% G7, отсутствует у G4), расположена в С–концевой части МА, где у ВЛКРС находится мотив PPPY – поздний домен, критичный для отпочковывания вирионов и рекрутирования ESCRT–машинерии клетки. Для ВЛКРС показано, что мутации в PPPY или нарушающие эту зону резко снижают выход вирусоподобных частиц и приводят к «застреванию» вирионов на мембране; поэтому инсерция АР–90–91 у G7, вероятно, модифицирует локальную конформацию позднего домена и может влиять на кинетику отпочковывания и морфогенез частиц данного генотипа [199].

Еще три замены МА – Y104P (6,5% вариантов, G4 и G7) и V109I (8% G7–специфично) – локализованы ближе к С–концу домена. Замена Y104P вводит пролин, который часто нарушает α –спираль и может вызывать изгиб полипептидной цепи; при этом невысокая частота (6,5%) говорит о том, что она, вероятно, допустима, но может быть связана с локальными изменениями структуры МА у части вариантов. Вариант V109I (G7–специфичен) является консервативной гидрофобной заменой, и его влияние, по–видимому, ограничивается тонкой настройкой гидрофобного ядра МА. В совокупности, кластер мутаций в МА (P5A, N29D, H48Y, АР–90–91, Y104P, V109I) хорошо укладывается в известные данные о том, что МА ВЛКРС участвует не только в мембранном таргетинге, но и в упаковке РНК: консервативные участки обеспечивают базовые функции, тогда как генотип–специфические изменения (N29D, АР–90–91, V109I) могут отражать адаптацию G4 и G7 к разным эволюционным траекториям [57,198,200].

В капсидном белке p24 ВЛКРС идентифицированы, по крайней мере, две замены, вошедшие в сводную таблицу: I279V (56% вариантов G4) и V319I/T (I – 98% вариантов, T – 1%; оба генотипа). СА ВЛКРС, как и у других ретровирусов, состоит из N–концевого (NTD) и С–концевого (CTD) доменов, обеспечивающих

сборку и стабильность капсида, а также взаимодействие с факторами хозяина. Замена I279V у G4 и вариант V319I/T представляют собой консервативные гидрофобные замены, что указывает на сохранение общей архитектуры СА при наличии умеренной вариабельности на отдельных позициях. Литературные данные по ВЛКРС показывают, что область МА демонстрирует более высокий уровень вариабельности, тогда как СА более консервативен; это согласуется с тем, что выявленные в изученных нами провирусах ВЛКРС мутации в СА в основном консервативны и не разделяют жёстко генотипы, а скорее отражают допустимую для сборки капсида пластичность [21,108,201].

Наиболее функционально значимыми представляются замены в области нуклеокапсидного белка p12, содержащего цинковые пальцы типа Cys–His. В нашем исследовании мы обнаружили два варианта замен в данной области. V324I (97% вариантов, оба генотипа) и P344S (57% вариантов, G4 и G7). Домен NC ВЛКРС, как показано в работах по упаковке ВЛКРС–РНК, критичен для специфического узнавания сигнала упаковки (Ψ) и селективной инкапсидации геномной РНК (см раздел 1.2). Мутации в консервативных остатках цинковых пальцев или соседних позициях у ретровирусов приводят к резкому снижению упаковки геномной РНК и инфекционности частиц [202].

Обнаруженная нами замена V324I является консервативной (Val→Ile) и встречается почти во всех геновариантах G4 и G7, что указывает на зафиксированный эволюционно сдвиг по сравнению с референсом при сохранении гидрофобного остатка. Вероятно, она лишь минимально влияет на структуру Zn–finger или его окружения. Напротив, P344S (Pro→Ser), также затрагивающая область Zn–finger, может сильнее изменять локальную конформацию петель или коротких спиралей, поскольку пролин часто образует «изломы» полипептидной цепи [1,203].

В нашем исследовании замена P344S в домене p12–NC гена gag была выявлена у 57% проанализированных вариантов и обнаруживалась как в генотипе G4, так и в генотипе G7, что указывает на её широкую встречаемость в исследуемой

выборке. С учётом такой частоты и присутствия в обоих генотипах можно предположить, что P344S представляет собой адаптивно закреплённый вариант структуры NC, совместимый с эффективной упаковкой вирусной РНК и потенциально влияющий на взаимодействие белка с нуклеиновыми кислотами.

Мутации гена Env вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС)

Ген env вируса лейкоза крупного рогатого скота кодирует оболочечный гликопротеиновый комплекс, состоящий из поверхностной субъединицы gp51 (SU) и трансмембранного белка gp30 (TM). Gp51 локализован на поверхности вириона, содержит рецептор–связывающий домен и обеспечивает первичное прикрепление вируса к клетке–мишени, тогда как gp30 участвует в слиянии вирусной и клеточной мембран и последующей передаче сигнала для активации слияния. Поверхностный гликопротеин gp51 является основным мишеневым антигеном, вызывающим выработку нейтрализующих антител и индуцирующим как В–клеточный, так и Т–клеточный иммунный ответ; именно вариации в gp51 вносят основной вклад в антигенное разнообразие ВЛКРС и используются для генотипирования вируса [10].

Структура gp51 включает несколько групп иммунологически и функционально значимых доменов. В N–концевой и центральной части белка расположены конформационные эпитопы G, H и F, тесно связанные с нейтрализацией вируса и ингибированием синцитий, а также линейные эпитопы A, B–B', D–D' и E–E', участвующие в распознавании антителами и Т–клетками. Кроме того, в gp51 описаны три нейтрализующих домена ND1, ND2 и ND3, которые индуцируют образование нейтрализующих антител и сильно влияют на чувствительность вируса к иммунному ответу и эффективность формирования синцитиев. В этих же областях локализованы CD4⁺–и CD8⁺–Т–клеточные эпитопы, а также эпитопы gp51N5, gp51N11 и gp51N12, являющиеся мишенью цитотоксических Т–лимфоцитов. Поэтому даже единичные аминокислотные замены в gp51, особенно в ND–доменах и известных В–Т–клеточных эпитопах, могут существенно изменять антигенные свойства, нейтрализуемость и тропизм ВЛКРС, а их анализ в полногеномных последовательностях генотипов G4 и G7

позволяет оценить направления иммунного и эволюционного давления на вирус [10]. Список ключевых аминокислотных замен в гене Env (gp51, gp30) вируса лейкоза крупного рогатого скота представлен в таблице 15.

Таблица 15 – Ключевые аминокислотные замены в гене Env (gp51, gp30) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7, выявленные по данным полногеномного секвенирования 154 провирусов из Новосибирской области и Республики Дагестан, полученные в настоящем исследовании

Мутация	Функциональный домен	Встречаемость	Генотипы
S7P	Env (Leader peptide)	15%	G7, G4
L27I	Env (gp51)	3%	G4
Q32R	Env (gp51)	8%	G7
A48T/I/A/S	Env (gp51)	T–93%, I–5%, A–1%, S–1%	G4, G7
S56F	Env (gp51)	56%	G4
A73P/L	Env (gp51)	Специфична для G4(96%)	G4
R121H	Env (gp51)	Специфична для G4(99%)	G4
Q135H	Env (gp51)	6%	G7
I144T/A*	Env (ND1)	T–51%, A–1%	G4
L149V*	Env (ND1)	4%	G4
K150R*	Env (ND1)	11%	G4
A291V	Env (эпитоп A)	Специфична для российского G7 (100%)	G7
V324M	Env (Fusion peptide)	7%	G4
I402V	Env (LHR TM)	10%	G4
P475L	Env (cytoplasmic domain)	15%	G7
L479F	Env (cytoplasmic domain)	92%	G4, G7
T480P*	Env (cytoplasmic domain)	Специфична для G4(100%)	G4
S485P	Env (cytoplasmic domain)	Специфична для G7(100%)	G7
V504A	Env (cytoplasmic domain)	Специфична для G7(100%)	G7
V504T*	Env (cytoplasmic domain)	Специфична для G4(100%)	G4
Точечные мутации	—	1%–3%	G4, G7

*Мутации, которые были обнаружены впервые в рамках данной работы. Специфичность и преобладание мутаций у соответствующего генотипа ВЛКРС подтверждены статистически ($p > 0,00001$).

В N-концевой части gp51 и прилегающих участках нами зафиксированы замены S7P в лидирующем пептиде (15% образцов G4 и G7), L27I (3%, только G4), Q32R (8%, только G7) и полиморфизм A48T/I/A/S, при котором вариант A48T доминирует (93% вариантов), а минорные варианты I, A и S встречаются суммарно у 7% последовательностей. Поскольку эти остатки локализованы в поверхностной части gp51, вовлечённой в рецепторное связывание и распознавание антителами, совокупность замен L27I, Q32R, A48T/I/A/S, S56F, A73P/L и R121H, по нашим данным, может тонко модифицировать антигенные свойства и эффективность связывания рецептора у генотипов G4 и G7.

В нейтрализующем домене ND1 нами выявлены три замены исключительно у генотипа G4: I144T/A (T – 51%, A – 1% вариантов), L149V (4%) и K150R (11%); при этом согласно анализу доступных международных баз данных и литературы, вариантов I144A, L149V и K150R у геновариантов G7 и у большинства зарубежных панелей вариантов ВЛКРС ранее описано не было, что позволяет рассматривать их как потенциально новые маркеры генотипа G4 в исследуемых регионах. В центральной части gp51 особый интерес представляет замена A291V, отнесённая к эпитопу A: в нашей выборке она зафиксирована у 100% вариантов G7 при полном отсутствии у G4 ($p < 0,00001$), что делает её удобным молекулярным идентификатором данного генотипа и свидетельствует об адаптации к локальному иммунному давлению, при этом, по имеющимся данным, в такой строго фиксированной форме замена A291V ранее описывалась только для отдельных зарубежных вариантов G7.

В C-концевой части env нами впервые описано для российских геновариантов ВЛКРС сочетание генотип-специфичных замен в цитоплазматическом домене gp30: T480P и V504T строго ассоциированы с G4 (100% вариантов G4, $p < 0,00001$), а S485P и V504A – с G7 (100% вариантов G7, $p < 0,00001$), тогда как замена L479F выявлена у 92% последовательностей обоих генотипов и, по всей видимости, является общей эволюционно закреплённой заменой для российских геновариантов ВЛКРС. Дополнительно у части вариантов G4 выявлены V324M в

пептиде слияния (7%) и I402V в трансмембранном домене (10%), которые, по данным опубликованных работ по функции gp30, могут влиять соответственно на характеристики слияния мембран и стабильность комплекса gp51/gp30 [53,70]. Зеркальный паттерн замен T480P/V504T у G4 и S485P/V504A у G7 выявлен нами впервые в таком абсолютном виде и может отражать различные режимы регуляции поверхностной экспрессии Env и передачи вируса от клетки к клетке, что требует экспериментальной проверки в последующих исследованиях.

3.5.2 Мутации в ферментативных генах

Мутации гена Pro вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС)

Ген pro вируса лейкоза крупного рогатого скота кодирует полипротеин Pro-Pol, который в процессе посттрансляционной модификации подвергается протеолитическому расщеплению с образованием трех функциональных белков: протеазы (PR), обратной транскриптазы (RT) и интегразы (IN). Полипротеин Pro-Pol длиной около 1000 аминокислотных остатков содержит три консервативных ферментативных домена, каждый из которых выполняет специфические функции в вирусном жизненном цикле.

Протеаза (PR)

Вирусная протеаза (PR) представляет собой аспартильную протеазу, которая играет критическую роль в созревании вирусных частиц посредством специфического расщепления полипротеинов Gag и Pro-Pol на зрелые функциональные белки. Активная форма протеазы функционирует как димер, при этом каждый мономер массой около 14 кДа вносит один остаток аспартата в формирование каталитического центра, содержащего консервативную триаду Asp-Thr-Gly. Структурная организация ВЛКРС-PR включает формирование димерного белка, стабилизируемого гидрофобными взаимодействиями и водородными связями, что является необходимым условием для каталитической активности.

Нами выявлено 7 ключевых замен, встречающихся с частотой $\geq 3\%$ образцов; две из них (I28V и S34P) строго специфичны для генотипа G4 (100% вариантов) и,

по данным анализа доступных публикаций и баз данных по вариабельности ВЛКРС, в такой абсолютной частоте у российских геновариантов ранее не описывались (см. таблицу 16).

Таблица 16 – Ключевые аминокислотные замены в гене Pro (PR) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7, выявленные по данным полногеномного секвенирования 154 провирусов из Новосибирской области и Республики Дагестан, полученные в настоящем исследовании

Мутация	Функциональный домен	Встречаемость	Генотипы ВЛКРС
F3I	Pro	56%	G7, G4
S10P	Pro	6%	G7, G4
S23G	Pro	57%	G7, G4
I28V*	Pro	Специфичная для G4 (100%)	G4
T32A	Pro	4,5%	G7, G4
S34P*	Pro	Специфичная для G4 (100%)	G4
R91Q	Pro	3,2%	G7, G4
Точечные мутации	–	1%–3%	G4, G7
*Мутации, которые были обнаружены впервые в рамках данной работы. Специфичность и преобладание мутаций у соответствующего генотипа ВЛКРС подтверждены статистически ($p > 0,00001$).			

Наиболее частыми являются F3I (56% обоих генотипов) и S23G (57% обоих), расположенные в N–концевой части PR, где находятся элементы, стабилизирующие димеризацию и субстратное связывание. Замена F3I (фенилаланин на изолейцин) консервативна и затрагивает гидрофобный кластер, влияющий на интерфейс мономеров, что может тонко модулировать стабильность димера без потери активности. S23G вводит глицин вблизи активного центра (Asp25), потенциально увеличивая гибкость петли и влияя на позиционирование субстрата; её высокая частота у обоих генотипов предполагает адаптивный характер [61].

Генотип–специфичные замены G4 – I28V и S34P (по 100% вариантов G4, 0% у G7) – выявлены нами как абсолютные маркеры этого генотипа в исследуемых

регионах ($p < 0,00001$). I28V расположена на ~3 позиции до каталитического Asp25 и, по аналогии с данными по родственным ретровирусным протеазам, вероятно, влияет на доступность карбоксильной группы аспартата для координации воды, а S34P вводит пролин, фиксирующий конформационный излом цепи и способный перераспределять субстратное связывание или стабильность димера. R91Q (3,2% обоих генотипов) в С-концевой части PR затрагивает возможный субстратный карман, тогда как низкочастотные T32A и S10P, по всей видимости, оказывают вспомогательный эффект на стабильность фермента. В совокупности концентрация выявленных нами замен вблизи активного центра (S23G, I28V, S34P) указывает на тонкую адаптацию PR к оптимальному процессингу Gag/Pro-Pol у российских геновариантов с выраженным акцентом на варианты генотипа G4 [204].

Мутации гена Pol вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС)

Обратная транскриптаза Pol ВЛКРС представляет собой многофункциональный ферментный блок, включающий ДНК-полимеразный домен обратной транскриптазы (с субдоменами *fingers*, *palm* и *thumb*), домен РНКазы Н и интегразу, и, как и у других ретровирусов, организован по принципу «правой руки»: шаблонно-праймерный дуплекс проходит через «ладонь» (*palm*), содержащую каталитический центр, тогда как «пальцы» (*fingers*) и «большой палец» (*thumb*) формируют стенки нуклеин-связывающей щели и отвечают за позиционирование субстрата и процессивность синтеза. Список ключевых аминокислотных замен в гене Pol (RT/RNase H/IN) вируса лейкоза крупного рогатого скота представлен в таблице 17.

Таблица 17 – Ключевые аминокислотные замены в гене Pol (RT/RNase H/IN) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7, выявленные по данным полногеномного секвенирования 154 провирусов из Новосибирской области и Республики Дагестан

Мутация	Функциональный домен	Встречаемость	Генотипы
A2T	Pol (обратная транскриптаза)	98%	G7, G4
S154P	Pol (обратная транскриптаза)	42%	G7, G4
A181T*	Pol (обратная транскриптаза)	6%	G7
R185H*	Pol (обратная транскриптаза)	6%	G7
E214D*	Pol (обратная транскриптаза)	Специфичная для G4(100%)	G4
T216M*	Pol (обратная транскриптаза)	Специфичная для G7(100%)	G7
Q226E*	Pol (обратная транскриптаза)	5%	G7
I267V	Pol (обратная транскриптаза)	45%	G7, G4
R288Q	Pol (обратная транскриптаза)	6%	G7
K365R/Q	Pol (обратная транскриптаза)	R–3%, Q–1%.	G4
Q426K/R	Pol (обратная транскриптаза)	K–7%, R–2%	G4, G7
A434T*	Pol (обратная транскриптаза)	Специфичная для G7(100%)	G7
K523T	Pol (обратная транскриптаза)	6%	G4
R609K	Pol (Эндонуклеаза)	89%	G7, G4
K679R	Pol (Эндонуклеаза)	61%	G7, G4
D821N/K	Pol (Эндонуклеаза)	N–98%, K–1%	G7, G4
K838R	Pol (Эндонуклеаза)	4%	G4
A845V/D	Pol (Эндонуклеаза)	V–5%, D–1%	G7, G4
Точечные мутации	–	1%–3%	G4, G7
*Мутации, которые были обнаружены впервые в рамках данной работы. Специфичность и преобладание мутаций у соответствующего генотипа ВЛКРС подтверждены статистически ($p > 0,00001$).			

В RT–домене нами зафиксирована почти фиксированная замена A2T (98% геновариантов обоих генотипов), ряд умеренно встречающихся вариантов (S154P – 42%, I267V – 45%, Q426K/R – K–7%, R–2%) и несколько редких замен, преимущественно специфичных для G7 (A181T, R185H, Q226E, R288Q, A434T) либо G4 (E214D, K365R/Q, K523T); по данным анализа доступных международных баз данных, совокупность этих вариантов для российских генотипов ВЛКРС описывается нами впервые. Структурное картирование показывает, что замены группируются по функциональным зонам: A2T затрагивает N–концевой участок RT на интерфейсе с Pro–Pol–полипротеином; S154P, A181T, R185H, E214D и T216M локализованы в palm–субдомене вблизи каталитических мотивов YXDD;

I267V и R288Q – в зоне thumb/connection, влияющей на процессивность; Q426K/R и A434T – на стыке полимеразного домена и RNase H.

Особого внимания заслуживают генотип–специфичные замены в palm–области: E214D обнаружена исключительно у G4 (100% вариантов G4), тогда как T216M и A434T – исключительно у G7 (100% G7), а G7–специфичные A181T, R185H и Q226E, по аналогии с данными по ВИЧ–1, могут влиять на точность RT, частоту переключения матрицы и кинетику синтеза ДНК; в таком строго фиксированном виде именно для генотипов G4 и G7 ВЛКРС эти замены описываются нами впервые. В RNase H–части RT и интегразном домене нами зафиксированы высокочастотные замены R609K (89%), K679R (61%), D821N/K (N–98%, K–1%) и более редкие K838R и A845V/D, при этом D821N/K и A845V/D, затрагивающие кислые остатки в окружении мотива DDE, критически важного для координации металлов в каталитическом центре интегразы, представляют особый функциональный интерес и в совокупности с данными по другим ретровирусам могут указывать на модификацию предпочтительных сайтов интеграции у российских вариантов [21,205,206].

В целом, выявленный нами профиль замен в RT–RNase H–IN свидетельствует о том, что при высокой консервативности ключевых каталитических мотивов (YXDD в palm RT и D,D(35)E в интегразе) у российских геновариантов ВЛКРС реализуется направленное накопление аминокислотных замен в функционально значимом окружении активных центров, причём генотип–специфические закономерности в palm–зоне и интегразе отражают дивергентную эволюцию G4 и G7 на уровне репликативного фермента.

3.5.3 Мутации в регуляторных генах

Мутации генов Tax/Rex вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС)

Белок Tax ВЛКРС является ключевым регуляторным фактором, функционирующим как транскрипционный активатор вирусного LTR и клеточных

генов (через CREB/ATF и NF- κ B пути), а также онкогенным белком, способным immortalizировать В-лимфоциты путём нарушения апоптоза, пролиферации и ДНК-репарации (например, инактивация p53). Структурно Tax делится на N-концевой цинковый палец (Zn-finger, ~аминокислоты 1– 100, с Cys-His мотивами для стабилизации структуры и связывания ДНК) и C-концевую leucine-rich активационную доменную область (LAD, ~100– 300, содержащую амфипатичные α -спирали для рекрутирования коактиваторов и взаимодействия с хроматином) [207].

В гене Tax нами выявлены два функциональных кластера замен – в Zn-finger домене и лейцин-богатом активационном домене (LAD), – демонстрирующих чёткую генотип-специфичность (см. таблица 18).

Таблица 18 – Ключевые аминокислотные замены в гене Tax вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7, выявленные по данным полногеномного секвенирования 154 провирусов из Новосибирской области и Республики Дагестан, полученные в нашем исследовании

Мутация	Функциональный домен	Встречаемость	Генотипы ВЛКРС
T51I*	Tax (Zn finger)	11%	G7
R53H*	Tax (Zn finger)	9%	G4, G7
T68A/M*	Tax (Zn finger)	Специфична для G7(A–100%), M–14%	G7, G4
E77G	Tax	7%	G7, G4
A94T	Tax	Специфична для G7 (100%)	G7
V102I	Tax	4%	G4
V141A	Tax	55%	G4, G7
T166I	Tax (Leucine-rich activation domain)	5%	G7
L172P*	Tax (Leucine-rich activation domain)	Специфична для G7 (100%)	G7
R182K	Tax (Leucine-rich activation domain)	11%	G7
A197T	Tax (Leucine-rich activation domain)	8%	G4
S220T/P*	Tax	Специфична для G4(T–99%, P–1%)	G4
N221D/Y/H	Tax	D–16%, Y–7%, H–1%	G7, G4
L230P	Tax	7%	G7
P231L/A/R	Tax	L–8%, A–1%, R–1%	G4, G7
L232P/T	Tax	P–83%, T–1%	G4, G7
C256Y/G/H*	Tax	Специфична для G4 (Y–98%, G–1%, H–1%)	G4
L277I	Tax	11%	G4
S280P	Tax	Специфична для G7 (100%)	G7
R286G	Tax	92%	G4, G7
Точечные мутации	–	1%–3%	G4, G7
*Мутации, которые были обнаружены впервые в рамках данной работы. Специфичность и преобладание мутаций у соответствующего генотипа ВЛКРС подтверждены статистически ($p > 0,00001$).			

В Zn–finger домене нами зафиксированы замены T51I (11% G7), R53H (9% обоих генотипов) и полиморфизм T68A/M, при котором вариант A абсолютно фиксирован у 100% G7; последний является строгим молекулярным маркером G7

в исследуемых регионах и, по данным анализа доступных баз данных по вариабельности *tax*, в такой абсолютной частоте для российских геновариантов ранее не описывался. T51I и R53H затрагивают остатки на поверхности Zn-finger вблизи CRE/ATF-связывающего участка и, по аналогии с данными по ТЛВЧ-1 *Tax*, потенциально влияют на специфичность взаимодействия с LTR и стабильность комплекса *Tax*/CREB [83,208].

В LAD нами выявлено наибольшее разнообразие замен, включая высокочастотные V141A (55% обоих генотипов), L232P (83% обоих) и R286G (92% обоих), а также строго генотип-специфичные варианты: маркеры G7 – L172P, S280P и A94T (100% G7), R182K (11% G7) и L230P (7% G7), маркеры G4 – S220T (99% G4) и C256Y (98% G4). Замена L172P (100% G7), впервые описанная нами как абсолютный маркер российских вариантов G7, вводит пролин в лейциновый повторяющийся мотив LAD (LxxLx), потенциально нарушает α -спиральную структуру домена и может изменять аффинность *Tax* к коактиваторам CBP/p300, что коррелирует с возможным повышенным онкогенным потенциалом G7-вариантов [82]. Для G4 характерны C256Y (98%) и S220T (99%) в C-концевой части LAD, где замена цистеина на тирозин может нарушать фосфорилирование или дисульфидные связи и модулировать ядерную подвижность *Tax*; эта комбинация также описывается нами впервые как генотип-специфическая особенность G4 для российских вариантов [66].

Высокая частота R286G (92%) и L232P (83%) у обоих генотипов указывает на их общеадаптивный характер в условиях российских хозяйств, тогда как «зеркальные» генотип-специфичные паттерны (L172P/S280P/A94T у G7 против S220T/C256Y/L277I у G4, $p < 0,00001$) подчёркивают дивергенцию в механизмах LAD-опосредованной транскрипционной активации между двумя генотипами и делают *tax* удобным маркером для их молекулярной дифференциации в эпидемиологических исследованиях [209].

Белок Rex ВЛКРС, аналогичный Rev у ТЛВЧ/ВИЧ, выполняет функцию посттранскрипционного регулятора, обеспечивая ядерный экспорт несплайсированных и частично сплайсированных вирусных мРНК (gag/pol, env) путём взаимодействия с CRM1/экспортином и Rev-responsive элементом (RRE) в РНК, а также содержит сигналы ядерной локализации (NLS) и экспорта (NES) для ядерно–цитоплазматического транспорта.

В Rex нами выявлено 14 ключевых замен с частотой $\geq 3\%$, среди которых преобладают почти фиксированные варианты M48T (82%), S62N (96%), G135S (96%) и L155S (96%), встречающиеся у обоих генотипов и, вероятно, представляющие эволюционно закреплённые сдвиги в гидрофобных/зарядных кластерах, влияющих на NLS/NES или RRE–связывание (см. таблица 19).

Таблица 19 – Ключевые аминокислотные замены в гене Rex вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7, выявленные по данным полногеномного секвенирования 154 провирусов из Новосибирской области и Республики Дагестан, полученные в нашем исследовании

Мутация	Функциональный домен	Встречаемость	Генотипы
S7P	Rex	15%	G7, G4
C45Y	Rex	4%	G4
M48T	Rex	82%	G4, G7
S62N	Rex	96%	G4, G7
K67R	Rex	7%	G4, G7
S69L/P	Rex	L–6%, P–2%	G4, G7
P77S	Rex	11%	G4, G7
V79I	Rex	9%	G4, G7
R94C/H	Rex	C–15%, H–1%	G4, G7
R103G	Rex	7%	G4, G7
R127Q	Rex	3%	G4, G7
G135S/N	Rex	S–96%, N–4%	G4, G7
T151M	Rex	5%	G4
L155S	Rex	96%	G4, G7
Точечные мутации	–	1%–3%	G4, G7

Генотип–специфичны С45У и Т151М (только G4), а также S7P (15% обоих), затрагивающие N–конец и потенциально модулирующие ядерный импорт; мутации в центральной/С–концевой частях (R94C/H, R103G, R127Q) носят консервативный характер и могут тонко настраивать аффинность к CRM1 или термостабильность, без значимой дифференциации G4/G7, что согласуется с высокой консервативностью Rex у ВЛКРС по сравнению с Тах [86].

Мутации генов R3/G4 вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС)

рХ–регион ВЛКРС, расположенный между env и LTR, помимо Тах и Rex кодирует дополнительные открытые рамки считывания (ORF), такие как G4 и R3 (возможно, AS1 или микро–РНК прекурсоры), которые потенциально продуцируют малые белки или нкРНК, участвующие в посттранскрипционной регуляции, иммуномодуляции или онкогенезе; филогенетический анализ выявил в этих ORF заметную вариабельность, с генотип–специфичными заменами, отражающими дивергенцию G4/G7. Список ключевых аминокислотных замен в гене G4/R3 (ORF G4/R3) вируса лейкоза крупного рогатого скота представлен в таблице 20.

Таблица 20 – Ключевые аминокислотные замены в гене g4/r3 (ORF G4/R3) вируса лейкоза крупного рогатого скота генотипов G4 и G7, выявленные по данным полногеномного секвенирования 154 провирусов из Новосибирской области и Республики Дагестан, полученные в настоящем исследовании

Мутация	Функциональный домен	Встречаемость	Генотипы
E28D	Ген G4	43%	G4
A35T	Ген G4	54%	G4, G7
G38W/E	Ген G4	W–28%, E–10%	G7
L49P	Ген G4	16%	G7
P50L	Ген G4	G7 специфичная (100%)	G7
L55R	Ген G4	7%	G4
H58L/P	Ген G4	L–3%, P–1%	G4
F61L	Ген G4	G7 специфичная (100%)	G7
H65L	Ген G4	56%	G4
R73Q	Ген G4	G4 специфичная (100%)	G4
C88Y	Ген G4	G7 специфичная (100%)	G7
V110I	Ген G4	4%	G4
N21D	R3	G7 специфичная (100%)	G7
N26H	R3	11%	G4
R31T	R3	43%	G4
L40F/S/M/V	R3	F–28%, S–1%, M–1%, V–1%	G4, G7
G41S	R3	11%	G4
Точечные мутации	–	1%–3%	G4, G7
Специфичность и преобладание мутаций у соответствующего генотипа ВЛКРС подтверждены статистически ($p > 0,00001$).			

В ORF G4 нами наблюдается яркая генотипизация: G4–специфичные R73Q (100%), H65L (56%), E28D (43%), L55R/H58L/P/V110I (низкочастотные) локализуются в аргинин–богатых/гидрофобных зонах, потенциально влияя на митохондриальную локализацию, протеолитический процессинг или клеточную иммортализацию; напротив, G7–маркеры P50L/F61L/C88Y (100%), L49P (16%), G38W/E затрагивают С–конец, где мутации повышают полиморфность и репликацию в лейкозных клетках. Общая A35T (54%) консервативна и может стабилизировать структуру. В R3 (Rex–подобный) G4–варианты R31T (43%), N26H/G41S (11%), полиморфизм L40F/S/M/V (F–28%) приходятся на NLS/RNA–binding сайт, модулируя ядерный экспорт или мембранную ассоциацию; G7–специфичный N21D (100%) в N–конце (Rex–overlap) вероятно усиливает

ингибирование Rex или ядерно–цитоплазматический транспорт, способствуя латентности у G7. Такие паттерны подчёркивают роль R3/G4 в адаптации российских геновариантов ВЛКРС к хозяину и потенциал как вакцинных мишеней [87,210].

Генотип-специфичность замен R73Q, P50L, F61L и C88Y (100%-я встречаемость у G7 генотипа при полном отсутствии у G4) статистически подтверждена ($p < 0,00001$ для каждой замены), для H65L (56% G4) различие с G7 также достигает уровня значимости ($p < 0,00001$).

В совокупности полученные данные показывают, что мутационное разнообразие ВЛКРС распределено по геному крайне неравномерно. Анализ нуклеотидного разнообразия в скользящем окне по 154 полным геномам вируса выявил общий умеренно–консервативный профиль: среднее значение π по всему геному составило $0,0174 \pm 0,0078$ [211]. Формально для окна длиной L нуклеотидов и выборки из n последовательностей π вычисляют по формуле (см. формулу (1)):

$$\pi = \frac{1}{L} \sum_{k=1}^L \frac{1}{\frac{n(n-1)}{2}} \sum_{i < j} d_{ij}^{(k)} \quad (1)$$

где $d_{ij}^{(k)}$ – число нуклеотидных различий между последовательностями i и j ;

L – длина скользящего окна в нуклеотидах;

n – число последовательностей в выборке;

π – среднее число нуклеотидных различий на сайт (нуклеотидное разнообразие).

При этом распределение π по геному имело выраженную неоднородность с чёткими пиками (π до 0,038) и провалами ($\pi < 0,005$), что отражает дифференцированное действие селективного давления на различные функциональные участки вирусного генома. В качестве порога статистически значимой повышенной вариабельности был принят 95–й перцентиль распределения π ($\pi \geq 0,030$): из 282 проанализированных окон 15 превышали этот

порог, причём все они были сосредоточены исключительно в генах *env* (8 пиков) и *pX* (7 пиков) (см. рисунок 14).

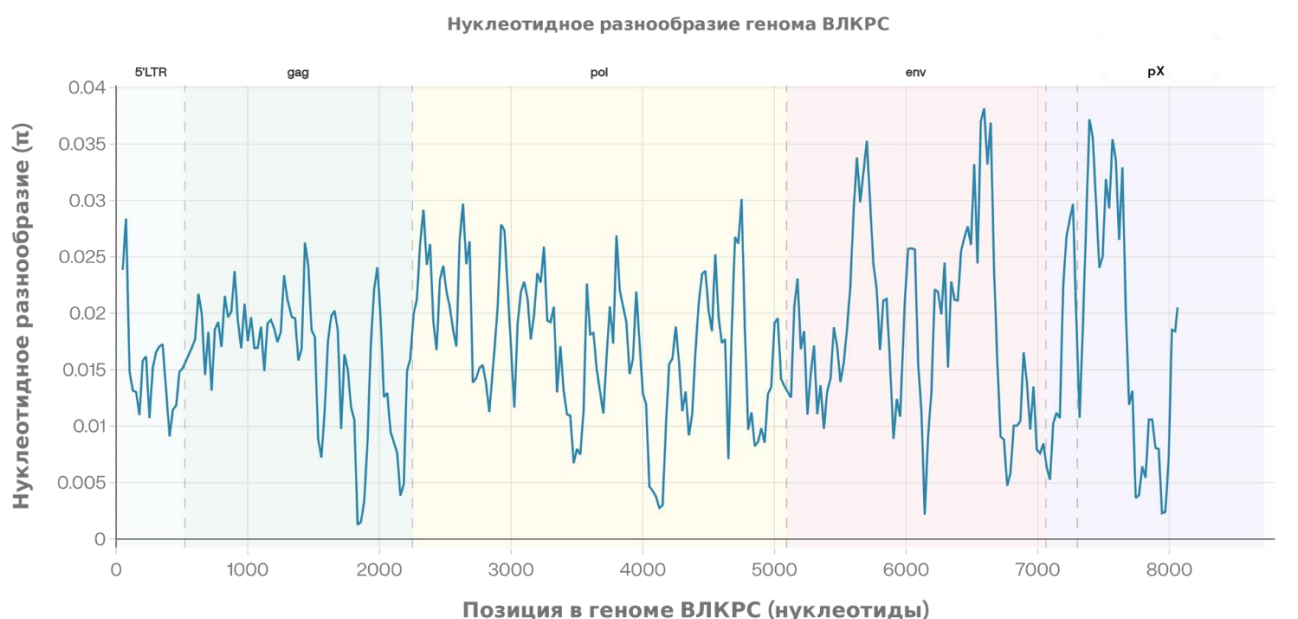


Рисунок 14 – Распределение нуклеотидного разнообразия (π) вдоль генома ВЛКРС (по оси абсцисс отложена позиция в геноме (нуклеотиды), по оси ординат – значение нуклеотидного разнообразия π , рассчитанное методом скользящего окна (размер окна 100 н.о., шаг 25 н.о.) на основе множественного выравнивания 154 полных геномов ВЛКРС в программе DnaSP v.6. Выделены основные кодирующие регионы генома: 5'LTR, *gag*, *pol*, *env* и *pX*)

Наиболее вариабельным на уровне аминокислот является ген *env* (*gp51/gp30*), в котором сосредоточено 74 аминокислотные замены в исследованном фрагменте *gp51*, с преобладанием несинонимичных изменений в нейтрализующих доменах ND1–ND3, линейных и конформационных В–клеточных эпитопах, а также в С–концевой части *gp30* (пептид слияния, ТМ и цитоплазматический домен). Именно в этих доменах зафиксированы два кластера повышенного нуклеотидного разнообразия (позиции 5577–5751 н.о. с π до 0,035 и 6468–6692 н.о. с π до 0,038), что на графике (см. рисунок 14) соответствует двум отчётливым пикам кривой в области *env*. Среднее π для гена *env* составило $0,0183 \pm 0,0087$ – наиболее высокое среди структурных генов. Для этих областей характерны локально повышенные

значения dN/dS (>1), что свидетельствует о действии направленного отбора со стороны гуморального и клеточного иммунного ответа и подтверждает роль *env* как основной «мишени» иммунного ускользания вируса [64].

Существенная вариабельность наблюдается также в *pX*-регионе (*Tax/Rex*, *G4*, *R3*), где многие замены сосредоточены в функциональных доменах *Tax* (*Zn-finger*, *leucine-rich activation domain*), *Rex* (*NLS/NES* и *RNA-binding* участки) и в аксессуарных *ORF G4/R3*; для ряда участков *pX* отмечены повышенные dN/dS , что отражает гибкость регуляторного блока и его адаптацию к условиям хозяина. На графике нуклеотидного разнообразия *pX*-регион формирует выраженный кластер из 7 окон со значениями $\pi \geq 0,030$ (позиции 7343–7693 н.о., максимум $\pi = 0,037$), что делает его вторым после *env* участком генома по уровню вариабельности (среднее π для *pX* = $0,0193 \pm 0,0111$).

Структурные гены *gag* и *pro*, а также ферментативные домены *pol* (*RT*, *RNase H*, *IN*) ВЛКРС демонстрируют, напротив, преобладание синонимичных замен и ограниченное число аминокислотных изменений в ключевых позициях, что указывает на сильное очищающее селективное давление на базовые функции сборки, созревания и репликации. Анализ скользящего окна подтверждает эту картину количественно: ни в *gag* ($\pi = 0,0151 \pm 0,0062$), ни в *pol* ($\pi = 0,0172 \pm 0,0062$) ни одно окно не превысило 95-го перцентиля ($\pi \geq 0,030$), а наиболее глубокие провалы кривой π (до 0,002–0,005) приходятся на границу *gag/pol* (~2000–2200 н.о.) и центральную часть *pol* (~4200–4600 н.о.), что соответствует расположению высоко консервативных каталитических доменов обратной транскриптазы и интегразы. В *gag* большинство замен приходится на матриксный домен *p15* (*P5A*, *N29D*, *H48Y*, *Y104P*, *V109I*) и область нуклеокапсида *p12/Zn-finger* (*V324I*, *P344S*), где они тонко модифицируют зарядовую поверхность *MA* и окружение цинковых пальцев *NC*, не нарушая критических *Cys-His* мотивов. В *pro* набор мутаций компактный и в основном локализован в *N*-концевой части и вблизи активного центра *PR* (*F3I*, *S23G*, *I28V*, *S34P*), при этом каталитические участки сохраняются что указывает на допустимую, но ограниченную вариабельность фермента.

Сравнение генотипов G4 и G7 показывает различную стратегию накопления мутаций. Генотип G4 характеризуется более высоким разнообразием в структурных и ферментативных генах (*gag*, *pro*, отдельные участки *pol*) и выраженным набором генотип-специфичных замен в *gp51* (S23F, A40P, I111T, R88H, вариабельность в ND1/ND2) и *pX* (Тах: S220T, C256Y, L277I; G4/R3: R73Q, H65L, E28D и др.). Генотип G7, напротив, более консервативен, но имеет ряд замен в *env* и *pX*, включая A258V и A291V в эпитопе A *gp51*, специфичные комбинации замен в ТМ и цитоплазматическом домене *gp30* (S485P, V504A) и характерные для G7 варианты Тах (L172P, S280P, A94T) и R3 (N21D). Данные паттерны обеспечивают чёткую молекулярную дифференциацию G4 и G7.

Таким образом, профиль нуклеотидного разнообразия генома ВЛКРС количественно подтверждает описанную картину мутационной неоднородности: статистически значимые пики вариабельности локализованы исключительно в *env* и *pX* – двух генах, подверженных действию положительного отбора и иммунного давления, тогда как *gag* и *pol* формируют низкий, стабильный фон π , характерный для сильного очищающего отбора на функционально критичные компоненты вирусного генома.

3.5.4 Филогенетический анализ полных геномов

Филогенетическое дерево полногеномных последовательностей ВЛКРС построено методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-TREE 2.3.4 с использованием модели нуклеотидных замен TIM2+F+I+G4+R4, выбранной по критерию BIC с помощью ModelFinder. Поддержка ветвей оценивалась с помощью *ultrafast bootstrap* (5000 репликаций) и теста SH-aLRT (5000 репликаций), где значения >93,75% интерпретировались как высокая поддержка, 75–93,75% – как средняя, <75% – как низкая. Дерево масштабировано по количеству замен на сайт (см. рисунок 15).

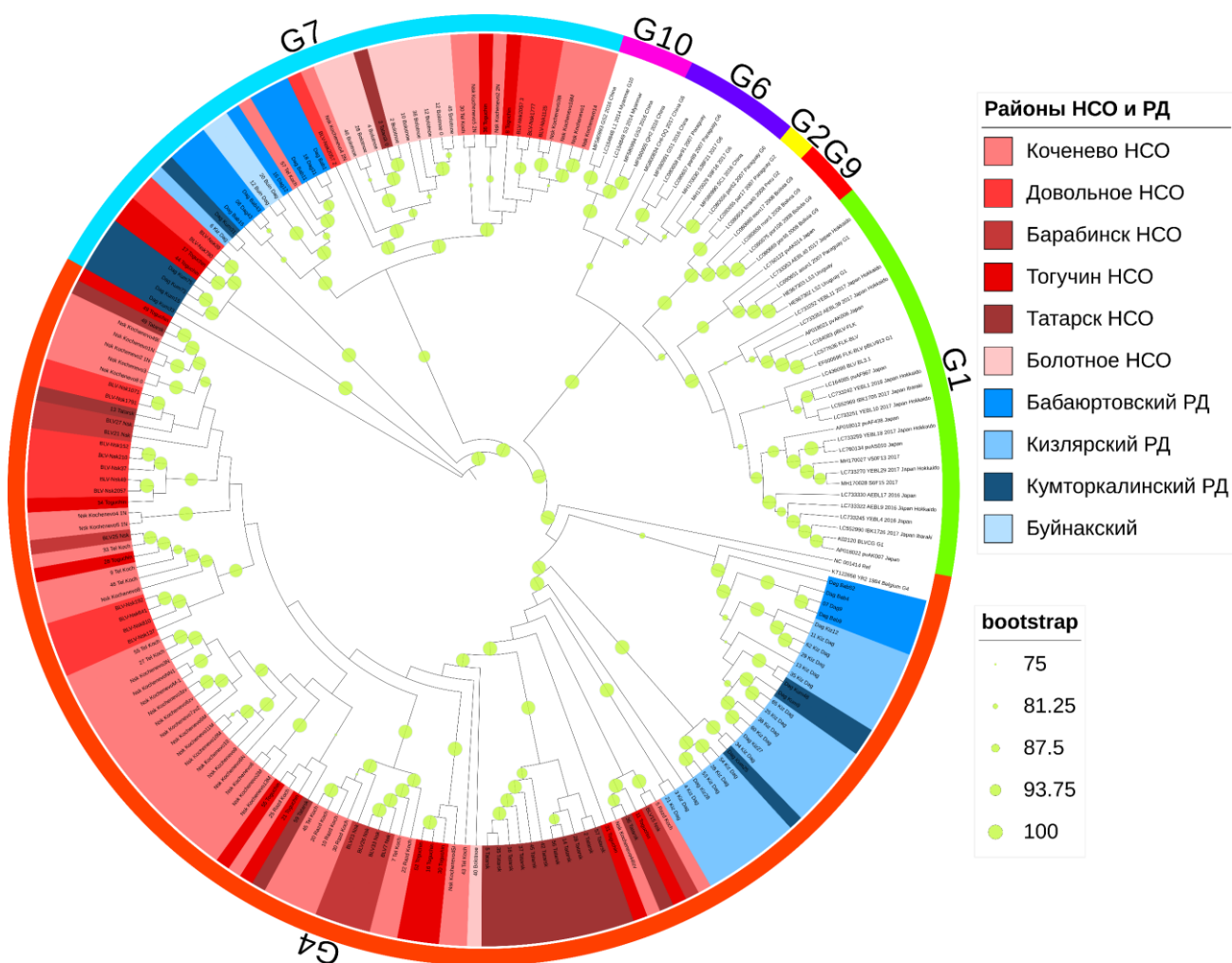


Рисунок 15 – Филогенетическое дерево 154 полученных в работе полногеномных последовательностей ВЛКРС (IQ-TREE, модель TIM2+F+I+G4+R4. В качестве референс последовательностей использовались эталонные последовательности ВЛКРС из международной базы GenBank, полученные из базы данных GenBank. Размер кружков у внутренних узлов отражает величину бутстреп-поддержки ветвей (большой кружок соответствует более высокому значению бутстрепа); отображены только значения $\geq 70\%$)

Филогенетический анализ полногеномных последовательностей ВЛКРС, полученных в нашей лаборатории, не выявил закономерностей в кластеризации образцов по территориальному признаку. Поэтому для выявления альтернативных эволюционных взаимосвязей и возможных ретикулянтных событий между изученными последовательностями был проведен анализ полногеномных последовательностей ВЛКРС с использованием метода Median Joining Network (MJN) в программе SplitsTree v.4.19.2. Данный метод позволяет визуализировать

сложные эволюционные отношения, включая возможные рекомбинации, горизонтальный перенос генов и гомоплазию, которые не могут быть отражены в традиционных филогенетических деревьях.

Анализ проводили для полногеномных нуклеотидных последовательностей с использованием следующих параметров: параметр epsilon (ϵ) = 0, что обеспечивает построение наиболее экономного графа с минимальным количеством избыточных ретикуляций. Генетические расстояния рассчитывались с использованием Hamming distance. Для улучшения визуализации применялся алгоритм Spring Embedder для оптимального размещения узлов в сетевом графе. Построенная медиан-соединяющая сеть выявила 50 узлов, включая 154 исходных последовательности и 7 гипотетических медианных векторов, представляющих предполагаемые промежуточные или предковые состояния (см. рисунок 16).

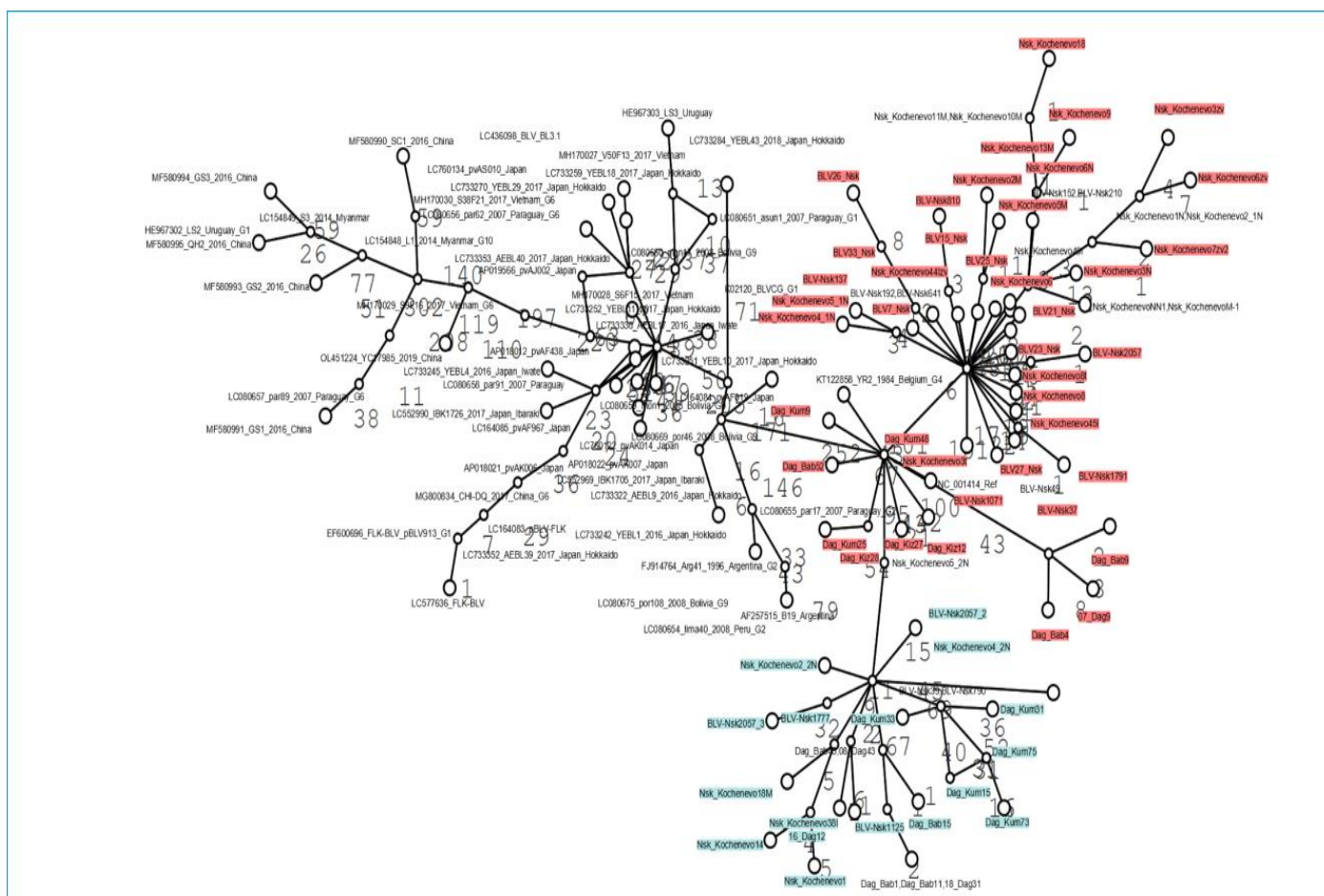


Рисунок 16 – Филогенетические сети ВЛКРС, построенные для полученных в работе 154 последовательностей полных геномов методом Median Joining в программе SplitsTree (красным

цветом выделены образцы генотипа G4 ВЛКРС, голубым выделены образцы генотипа G7 ВЛКРС, чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank)

Топология сети продемонстрировала генотип–специфическую кластеризацию последовательностей. Образцы генотипа G4 формировали относительно компактный радиальный кластер с малыми внутригрупповыми расстояниями. В то же время среди образцов генотипа G7 выявлялись отдельные последовательности, включая ВЛКРС–Nsk2057_2, ВЛКРС–Nsk2057_3, ВЛКРС–Nsk39 и ВЛКРС–Nsk790, характеризующиеся более удалённым положением в сети, что указывает на большую внутригрупповую неоднородность данного генотипа.

Медианная длина рёбер в сети составила 32 замены, тогда как максимальное расстояние – 66 замен – наблюдалось между отдельными образцами генотипа G7. Наибольшие генетические дистанции были зафиксированы между последовательностями генотипов G4 и G7, что согласуется с их выраженной филогенетической дивергенцией. Центральные расположенные медианные векторы, вероятно, отражают гипотетические предковые состояния, от которых происходила дальнейшая диверсификация современных вариантов вируса.

Для дополнительной оценки ретикулярной структуры популяции ВЛКРС был проведён анализ полногеномных последовательностей методом SplitNetwork в программе SplitsTree (см. рисунок 17). В отличие от классического филогенетического дерева, данный подход позволяет более наглядно выявлять несовместимые сигналы, возникающие при рекомбинации, гомоплазии или смешанной эволюционной истории отдельных геновариантов.

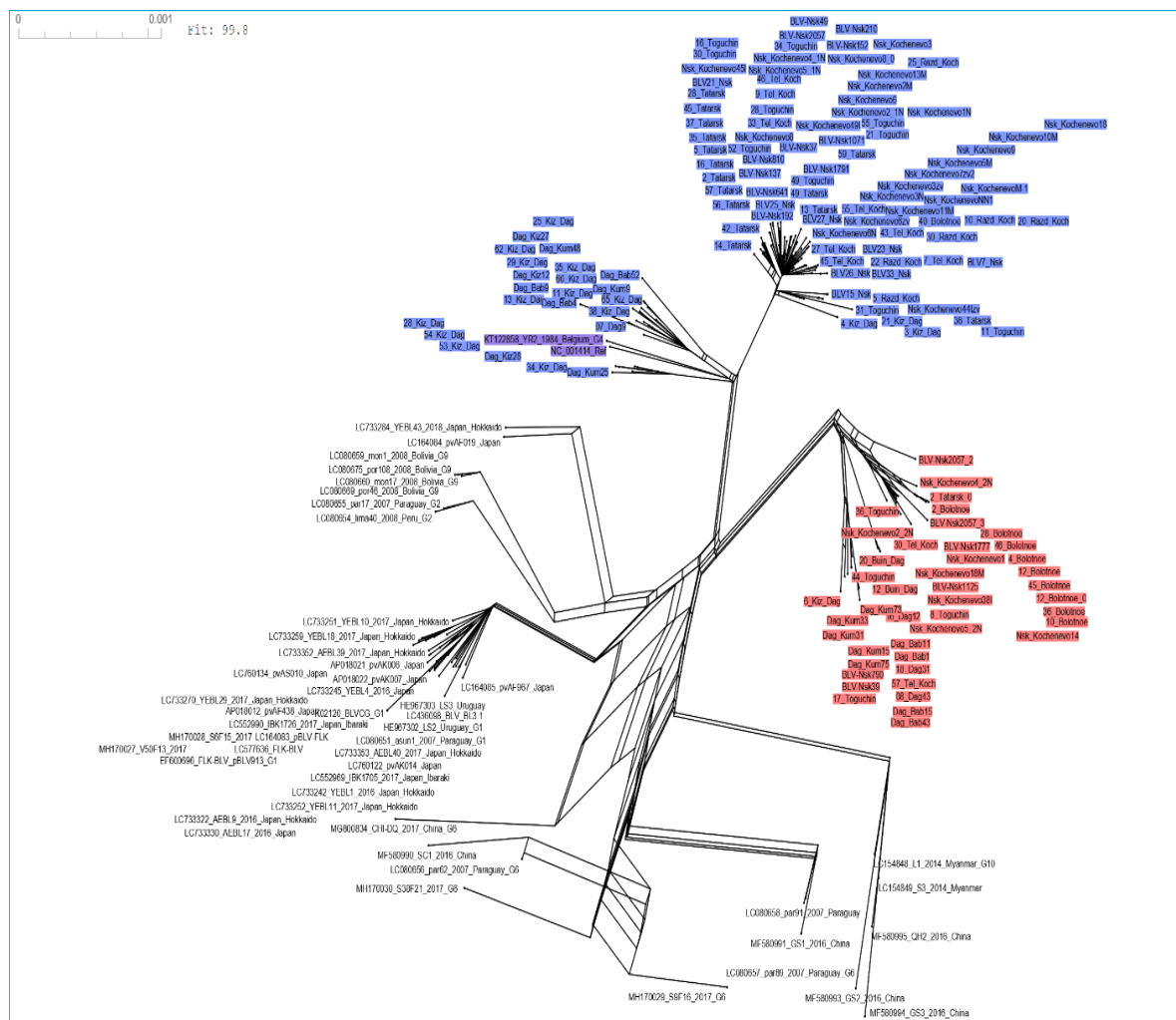


Рисунок 17 – Филогенетические сети ВЛКРС, построенные методом SplitNetwork в программе SplitsTree (синим цветом обозначены образцы ВЛКРС 4 генотипа, красным обозначены образцы 7 генотипа, фиолетовым обозначены эталонные образцы 4 генотипа из базы данных GenBank. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank)

Анализ SplitNetwork показал наличие четырёх основных групп образцов. Внутри генотипа G7 выделялись две группы, одна из которых включала последовательности, полученные в Новосибирской области, а другая – последовательности, выделенные в Республике Дагестан (см. рисунок 18). При этом 5 новосибирских образцов занимали положение, более близкое к дагестанской группе, чем к основной новосибирской, что может указывать на занос вирусных

вариантов из Европейской части России в Сибирь, по всей видимости, через торговлю племенным скотом.

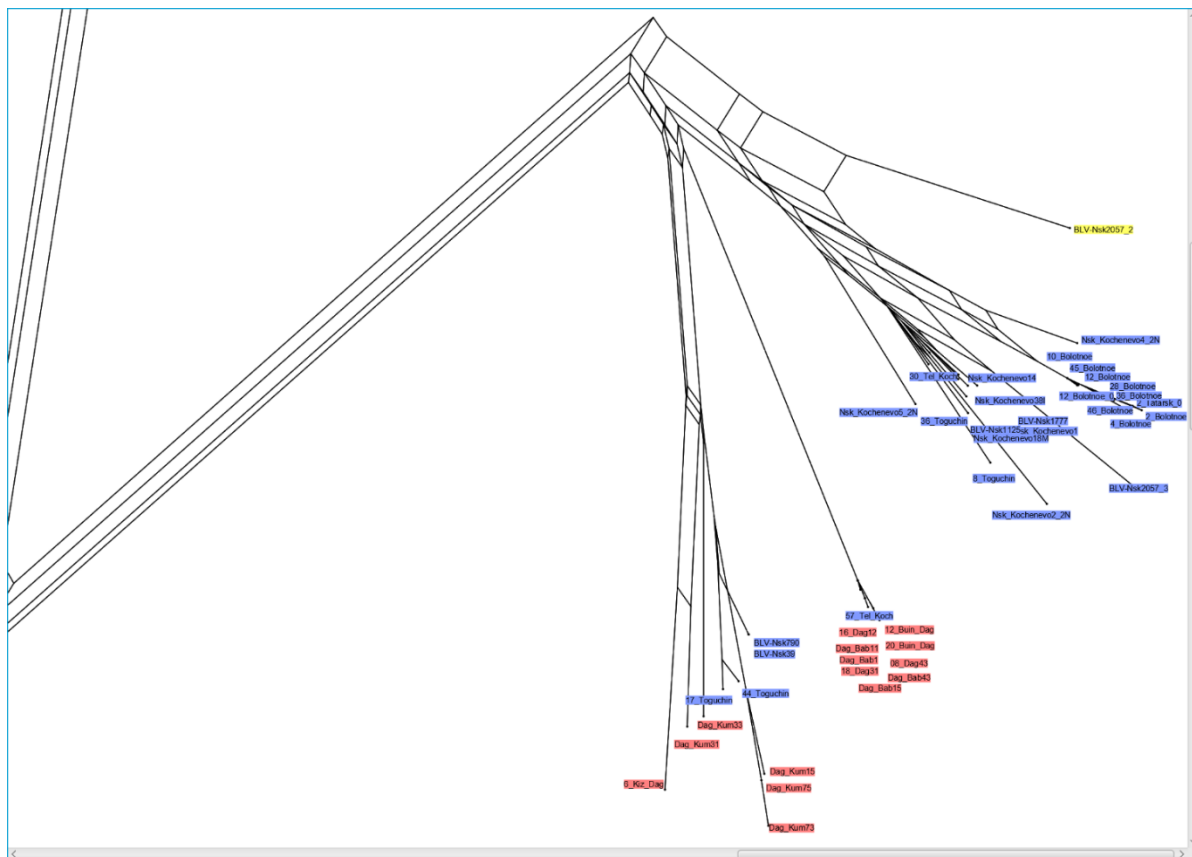


Рисунок 18 – Филогенетические сети ВЛКРС 7 генотипа, построенные методом SplitNetwork в программе SplitsTree (синим цветом обозначены образцы ВЛКРС, собранные в НСО, красным обозначены образцы, собранные в Республике Дагестан, желтым обозначен образец с возможной рекомбинацией. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank)

Особый интерес представлял образец BLV_Nsk_2057_2 (выделен желтым), который в сети был связан длинными ветвями, содержащими множественные несовместимые разбиения. Такое топологическое положение является характерным признаком рекомбинационной природы последовательности и указывает на возможное происхождение данного варианта в условиях суперинфекции или смешанной циркуляции близкородственных геновариантов внутри популяции генотипа G7.

Анализ образцов генотипа G4 также выявил разделение на две основные группы, соответствующие последовательностям из Новосибирской области и Республики Дагестан (см. рисунок 19). Вместе с тем в пределах одной из групп определялась подгруппа, объединявшая геноварианты из обоих регионов, что может отражать происхождение этих вариантов из общего источника, а не прямой односторонний перенос из одного региона в другой.

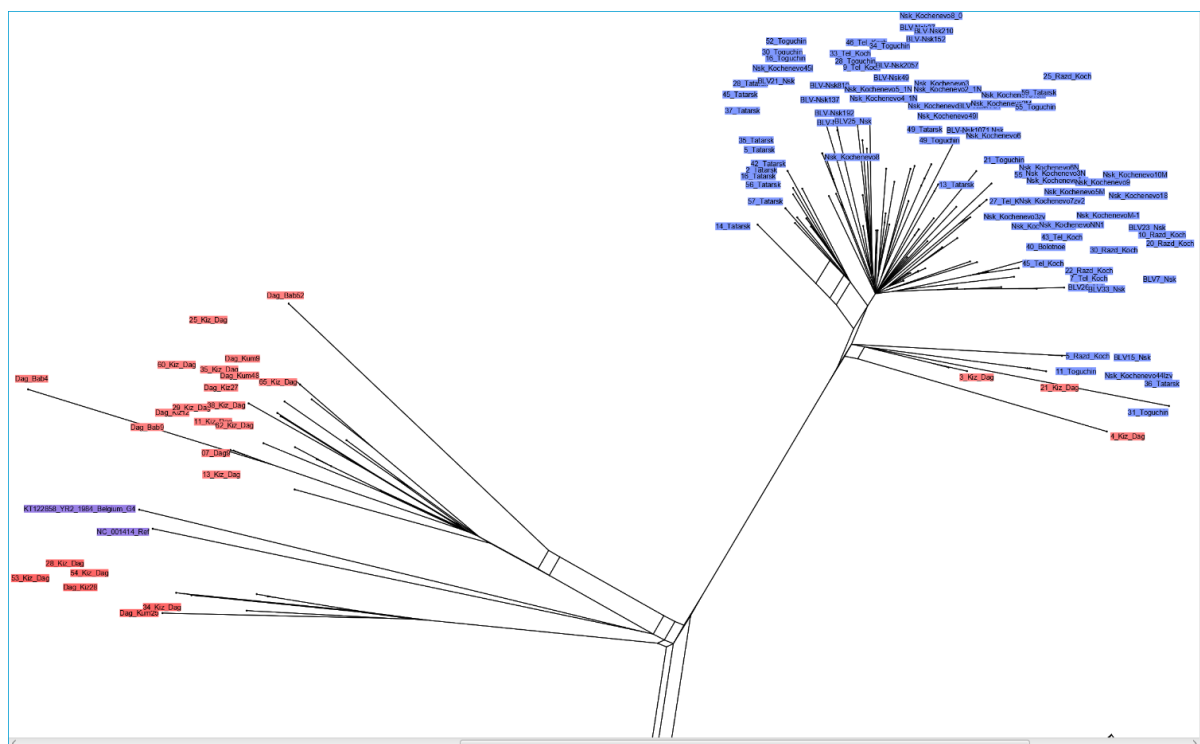


Рисунок 19 – Филогенетические сети ВЛКРС 4 генотипа, построенные методом SplitNetwork в программе SplitsTree (синим цветом обозначены образцы ВЛКРС, собранные в НСО, красным обозначены образцы, собранные в Республике Дагестан. Фиолетовым обозначены референсные образцы из GenBank генотипа 4. Чёрным представлены эталонные последовательности ВЛКРС, полученные из базы данных GenBank)

В совокупности результаты сетевого анализа показали, что генотип G7 характеризуется большей топологической неоднородностью и более выраженными признаками ретикулярной эволюции по сравнению с генотипом G4. Для G7 были характерны разделение на несколько подгрупп, наличие удалённых

последовательностей и признаков рекомбинации, тогда как G4 в целом демонстрировал более компактную и упорядоченную структуру сети.

Это наблюдение согласуется с результатами РНI–теста, который выявил статистически значимые признаки рекомбинации для образцов генотипа G7 ($p = 1,599E^{-4}$). Таким образом, эволюция G7, по–видимому, в большей степени определяется не только накоплением точечных замен, но и вкладом ретикулярных процессов, включая рекомбинацию. Напротив, для генотипа G4 характерна более клональная дивергенция при меньшей выраженности мозаичности генома.

Полученные филогенетические деревья и сети в совокупности показывают, что эволюция полногеномных последовательностей ВЛКРС определяется как клональной дивергенцией, отражённой в ML–дереве, так и ретикулярными процессами, включая рекомбинацию и гомоплазию, выявленными методами Median Joining Network и SplitNetwork. Чёткое разделение последовательностей на генотипы G4 и G7 при отсутствии строгой географической кластеризации указывает на значимую роль межхозяйственных переносов вируса. При этом генотип G4 характеризовался более компактной филогенетической структурой, тогда как генотип G7 демонстрировал большую внутригрупповую неоднородность и признаки рекомбинационной перестройки, что может отражать различия в путях передачи и особенностях эволюции этих генотипов в популяциях крупного рогатого скота России.

3.6 Разработка прототипа тест–системы на основе цифровой ПЦР для диагностики ВЛКРС в ветеринарном биологическом материале и клеточных культурах *in vitro*

В рамках диссертационных исследований была разработана диагностическая система на основе цифровой ПЦР, что позволило перейти от относительной количественной оценки (Ct) к абсолютному подсчёту копий провирусной ДНК ВЛКРС. Особенностью цПЦР является распределение реакционной смеси на десятки тысяч нанореакций объёмом порядка 0,34 нл, что требует предварительной

фрагментации геномной ДНК: крупные молекулы хуже распределяются по лункам и снижают эффективность амплификации [212]. Для этих целей были выбраны эндонуклеаза рестрикции *EcoRI*, не имеющие сайтов рестрикции в целевом участке гена *pol* ВЛКРС и последовательностях праймеров (для гена полимеразы BLV-f – прямой праймер, BLV-r, BLV-r2 – обратные праймеры, для гена *DRA* *DRA643-f* – прямой, *DRA744-r* – обратный), и зондов (*DRA-z* и *BLV-z*), что позволяет избежать разрушения мишени.

В качестве клеточной мишени был выбран ген *DRA*. Ген *DRA* (bovine leukocyte antigen BoLA-DRA) кодирует альфа-цепь молекулы класса II главного комплекса гистосовместимости крупного рогатого скота [213]. Белок BoLA-DRA образует гетеродимер с высокополиморфными бета-цепями (кодируемыми генами *DRB3*, *DRB1* и другими), формируя молекулы, которые экспрессируются на поверхности антиген презентирующих клеток, включая В-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги [213].

Ген *DRA* традиционно характеризуется как мономорфный – считается содержащим только один аллель в популяции крупного рогатого скота [214]. Благодаря относительной консервативности гена *DRA* он широко используется в качестве референтного (контрольного) гена при количественной оценке провирусной нагрузки в цифровой ПЦР, обеспечивая надёжную нормализацию данных для учёта различий в количестве клеток в исследуемых образцах крови или ткани крупного рогатого скота [215]. Такой выбор позволяет получить более точные и воспроизводимые результаты при мультиплексном анализе, одновременно определяя количество провирусной ДНК ВЛКРС и нормализуя результаты по количеству копий гена *DRA* как маркера клеточного содержимого.

В качестве источника ДНК использовали клеточный осадок цельной крови от животных с различной провирусной нагрузкой. В систему были включены положительные и отрицательные контроли: ДНК хронически инфицированной клеточной культуры FLK-ВЛКРС (положительный контроль), плазмида со встройкой гена *pol* ВЛКРС (положительный контроль), а также деионизированная

вода и ДНК от ПЦР–отрицательных животных (отрицательные контроли). Результаты типичной постановки мультиплексной цПЦР–реакции с рестриктазой *EcoRI* представлены на рисунке 20 и демонстрируют отдельную детекцию мишени *pol* (канал FAM) и клеточного гена *DRA* (канал HEX) для плазмидной конструкции, линии FLK–ВЛКРС, полевого образца и отрицательных контролей.

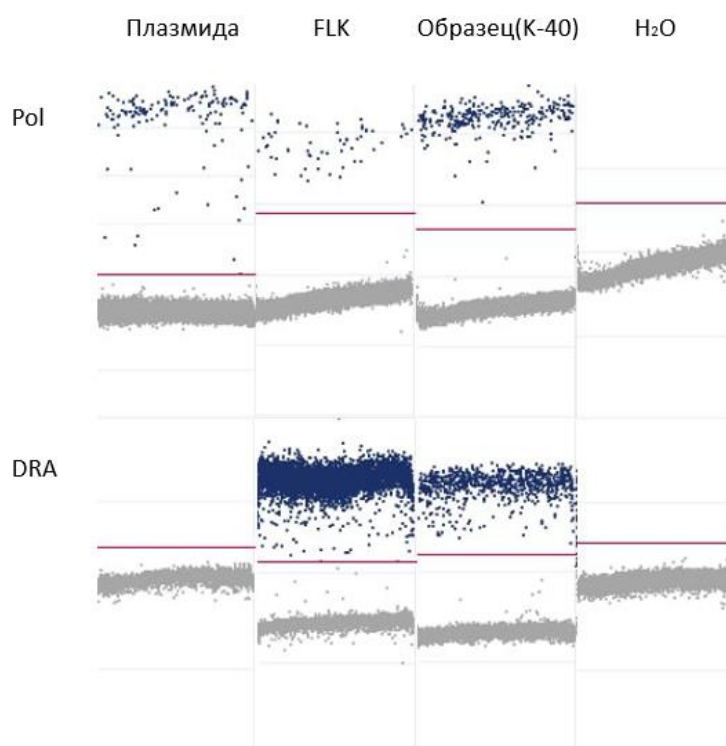


Рисунок 20 – Детекция количества нанолюнок, содержащих продукты ПЦР после эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* (в первой колонке показаны результаты для плазмиды, полученной в нашей лаборатории, с частью гена *pol* ВЛКРС, во второй колонке показаны результаты для хронически зараженной культуры клеток FLK–ВЛКРС, в третьей колонке показаны результаты для образца К–40, выбранного для примера, и в четвертой колонке показаны результаты для отрицательного контроля H_2O). Строка *pol* показывает флюоресценцию ячеек после амплификации для участка гена *pol*. Строка *DRA* показывает флюоресценцию ячеек после амплификации для участка гена клеточной мишени *DRA*)

Отдельным этапом была проведена аналитическая апробация мультиплексной цПЦР в соответствии с рекомендациями протокола CLSI EP17–A2 с определением предела бланка (LoB), предела обнаружения (LoD) и предел количественного определения (LoQ) для провирусной нагрузки ВЛКРС генотипов

G4 и G7 [153,216]. Для расчёта LoB было проанализировано 30 реакций NTC (no template control). Среднее число ложно положительных капель составило $X_{blank}=2,40$ на образец при стандартном отклонении $SD_{blank}=1,52$ (4 реакции без положительных капель, 13,3%; 95% ДИ = 4,55). Соответственно, LoB рассчитывали по формуле (см. формулу (2)):

$$LoB = X_{blank} + 1,645 \times SD_{blank} \quad (2)$$

где X_{blank} – среднее значение сигнала в холостых пробах;

SD_{blank} – стандартное отклонение сигнала в холостых пробах;

LoB – предел холостого сигнала (limit of blank) по рекомендациям CLSI EP17-A2.

Значения свыше 5 положительных капель в канале ВЛКРС интерпретировались как достоверно положительный результат.

Предел обнаружения (LoD) оценивали двумя подходами. Параметрический подход основывался на результатах для «low-level» проб со спайком около 2 копий/образец (серия значений 1, 2, 0 копий; $X_{low}=1,0$, $SD_{low}=1,0$), что дало расчётное (см. формулу (3)):

$$LoD = LoB + 1,645 \times SD_{low} \quad (3)$$

где LoB – предел холостого сигнала, рассчитанный по формуле (2);

SD_{low} – стандартное отклонение сигналов для образцов с низкой концентрацией;

LoD – предел обнаружения (limit of detection).

Около 2 копий на образец. Дополнительно проведён probit-анализ частоты обнаружения для ожидаемых концентраций 1, 2 и ≥ 5 копий/лунку (0%, 67% и 100% положительных, соответственно), по результатам которого LoD – 95% составил приблизительно 1,3– 1,5 копии/лунку.

Предел количественного определения (LoQ) рассчитывали на основании серийных разведений с известной концентрацией провируса согласно

рекомендациям CLSI. Коэффициент вариации рассчитывали по формуле (см. формулу (4)):

$$CV = \frac{SD_{low}}{X_{low}} \times 100\% \quad (4)$$

где SD_{low} – стандартное отклонение сигналов для образцов с низким уровнем;

X_{low} – среднее значение сигнала для соответствующих образцов;

CV – коэффициент вариации (в процентах).

LoQ определяли как наименьший уровень концентрации, при котором CV не превышает допустимого предела в 20%. Для уровней концентрации 1, 2 и 5 копий/лунку значения CV составили >100%, 100% и 75,5% соответственно, что свидетельствует о неприемлемой воспроизводимости в данном диапазоне. При концентрации 10 копий/лунку ($X_{low} = 13,67$; $SD_{low} = 2,08$) коэффициент вариации составил $CV = 15,2\%$, что удовлетворяет критерию $CV \leq 20\%$. Для уровня 100 копий/лунку $CV = 7,3\%$ ($X_{low} = 130,33$; $SD_{low} = 9,45$). Таким образом, LoQ был установлен на уровне 10 копий на лунку как наименьшая концентрация с приемлемой аналитической воспроизводимостью, что согласуется с условием $LoQ \geq LoD$ ($10 \geq 7$ копий/образец).

Таким образом, разработанная мультиплексная цПЦР–система демонстрирует очень высокую аналитическую чувствительность, достаточную для надёжного выявления низкой провирусной нагрузки ВЛКРС, характерной, в частности, для части вариантов генотипа G7.

3.6.1 Анализ провирусной нагрузки ВЛКРС по возрастным группам животных

Для количественного исследования копий провирусного генома ВЛКРС в клетках крови была сформирована выборка КРС, включающая 90 животных–тёлок из хозяйств Новосибирской области (Коченевский, Тогучинский, Болотнинский и Татарский районы) и Республики Дагестан (Кизлярский район и Буйнакский), ранее нами протестированных методом ПЦР, а также установленным генотипом

вируса (G4 или G7) и возрастом от 3 месяцев до 12 лет, сгруппированных по возрастным категориям «до 1 года», «от 1 до 3 лет», «4–5 лет», «6–8 лет», «9–10 лет» и «11 лет и старше», для которых провирусная нагрузка была количественно оценена методом мультиплексной цифровой ПЦР с нормализацией на копии клеточного гена DRA. Результаты определения провирусной нагрузки для изученной выборки животных представлены на рисунке 21.

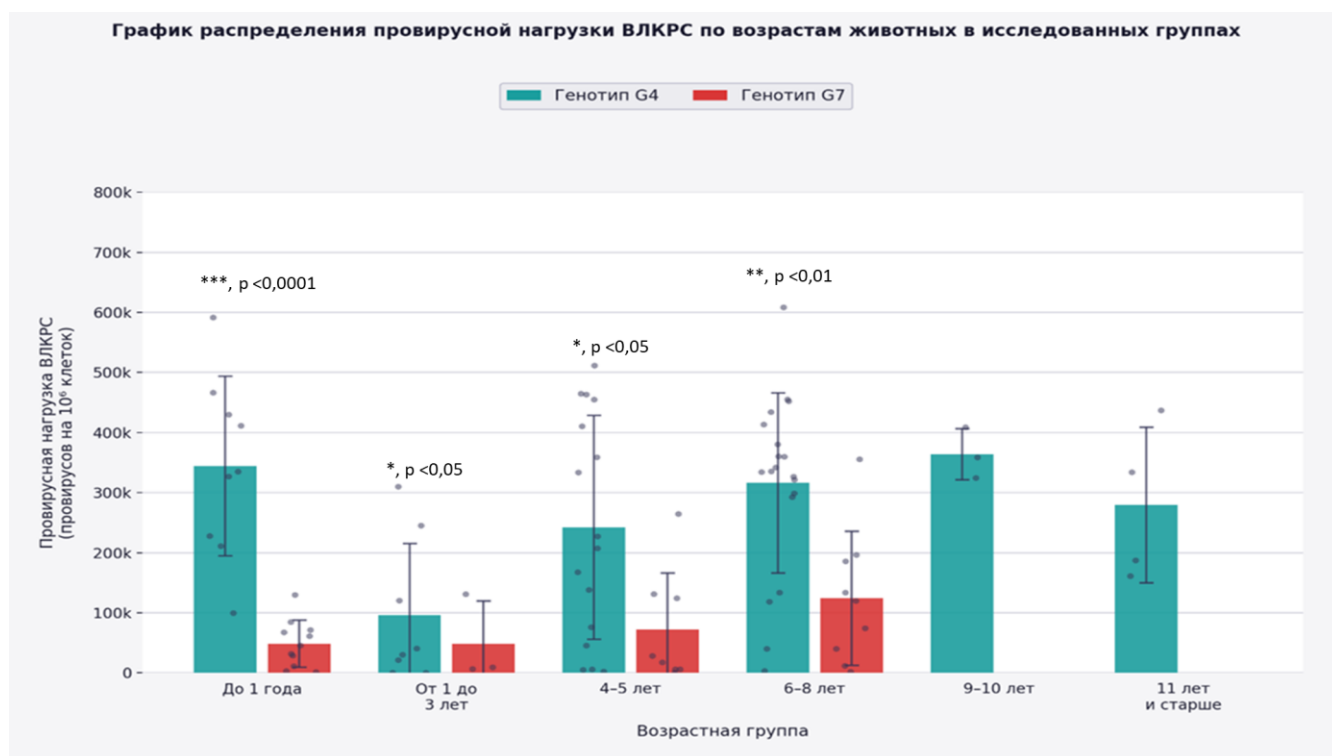


Рисунок 21 – График распределения провирусной нагрузки ВЛКРС по возрастам животных в исследованных группах (по оси X обозначены возрастные группы КРС, по оси Y – уровень провирусной нагрузки ВЛКРС. Синим обозначен генотип G4, красным обозначен генотип G7)

Молодняк представлял наиболее информативную возрастную группу и демонстрировал самое выраженное различие между генотипами. Животные с генотипом G4 (n=9) показали исключительно высокую провирусную нагрузку – 344220 ± 149759 провирусов на 10^6 клеток с максимальным значением 591362 и минимальным 99466. В контрасте молодняк с генотипом G7 (n=11) продемонстрировал значительно более низкую нагрузку – 48581 ± 39143

провирусов ВЛКРС с диапазоном от 1233 до 129634 провирусов. Разница между генотипами была статистически значимой (по критерию Манна–Уитни $p = 0.0003$, медиана G4 334808 vs G7 45420) и составила 7,1 раза, пораженность клеток ВЛКРС для генотипа G4 превышала аналогичный показатель для генотипа G7 по абсолютным значениям. Высокая нагрузка ВЛКРС у молодняка, инфицированного генотипом G4, возможно, указывает на активную вирусную репликацию в период, когда адаптивный иммунитет у животных еще недостаточно развит. Также высокая провирусная нагрузка ВЛКРС в данной возрастной группе животных может объясняться тем, что вирус с большой долей вероятности передался телятам внутриутробно.

Возрастная группа 1–3 года (8 животных с генотипом G4, 3 – с генотипом G7) показала заметное снижение провирусной нагрузки ВЛКРС в сравнении с телятами до 1 года для генотипа G4, данное снижение было статистически значимым ($p = 0,0037$). Среднее значение для генотипа G4 составило 95872 ± 119478 провирусов (диапазон 79–309807), что на 72,1% ниже, чем у животных до 1 года. Пораженность клеток крови для генотипа G7 ВЛКРС осталась на низких уровнях со средней нагрузкой 48786 ± 71071 провирусов (диапазон 6376–130837), практически без изменений по сравнению с молодняком до года, это подтвердилось и статистически, так как разница была не статистически значимой ($p = 0,885$). Снижение вирусной нагрузки для генотипа G4 предполагает, что в этом возрасте у телят развивается эффективный адаптивный иммунный ответ, который способен частично подавлять вирусную репликацию. Несмотря на иммунный контроль, нагрузка ВЛКРС на клетки для генотипа G4 остается высокой, превышая 90000 провирусов.

Возрастная группа 4–5 лет (16 животных с генотипом G4, 8 с генотипом G7) демонстрирует выраженное восстановление провирусной нагрузки ВЛКРС у животных с генотипом G4. Генотип G4 ВЛКРС показал среднюю нагрузку 241864 ± 186241 провирусов (диапазон 2168–511398), что статистически значимо превышает уровень предыдущей возрастной группы (1–3 лет; тест Манна–Уитни p

= 0,018), указывая на активное восстановление вирусной репликации в этом возрасте. Провирусная нагрузка ВЛКРС для генотипа G7 осталась на относительно низких уровнях со средним показателем 72066 ± 94176 провирусов (диапазон 83–264392), и статистически значимых изменений по сравнению с группой 1–3 лет выявлено не было ($p = 0,905$). В результате в группе 4–5 лет нагрузка между генотипами G4 и G7 значимо различалась ($p = 0,027$), что может отражать нарастание патогенного потенциала генотипа G4 на фоне возможного ускользания вируса от иммунного контроля и истощения иммунного ответа.

Возрастная группа 6–8 лет (19 животных с генотипом G4, 9 с генотипом G7) представляет период стабилизированной высокой провирусной нагрузки, особенно для генотипа G4 ВЛКРС. По сравнению с предыдущей возрастной группой (4–5 лет) статистически значимых изменений нагрузки для G4 выявлено не было (тест Манна–Уитни $p = 0,475$), что подтверждает её плато-характер в данном возрастном периоде. КРС, инфицированные генотипом G4, продемонстрировали среднюю нагрузку 316144 ± 149726 провирусов (диапазон 3056–608247), при этом максимальная провирусная нагрузка, зарегистрированная в исследовании – 608247 провирусов на 10^6 клеток – была обнаружена у животного с генотипом G4 в этой возрастной группе. Генотип G7 ВЛКРС в этой возрастной группе животных показал повышение нагрузки до 124181 ± 111694 провирусов (диапазон 1796–355386), что примерно в 2,8 раза ниже, чем для генотипа G4, различие между генотипами было статистически значимым ($p = 0,006$). Интересно, что в этой группе КРС генотип G7 вируса также достигал весьма высоких значений (максимум 355386) пораженности клеток, что указывает на возможность заражения инфекцией некоторых животных на более ранних сроках жизни.

Возрастная группа 9–10 лет хотя и представлена малым числом животных (3 особи, все с генотипом G4), показывает наиболее высокие средние значения провирусной нагрузки ВЛКРС среди всех возрастных групп – 363837 ± 42428 . Все три животных этой возрастной группы имели провирусную нагрузку, превышающую 320000 провирусов на 10^6 клеток, что указывает на консистентно

высокую вирусную репликацию в период развитой хронической инфекции. При этом статистически значимых отличий нагрузки от группы 6–8 лет выявлено не было (тест Манна–Уитни $p = 0,787$), что подтверждает плато–характер нагрузки G4 в этом возрастном диапазоне. Животные, инфицированные генотипом 7 ВЛКРС в этой возрастной группе, в нашей выборке отсутствовали, что может быть связано с меньшим распространением ВЛКРС G7 генотипа на территории России по сравнению с G4 генотипом. К тому же средняя продолжительность жизни животных в крупных коммерческих хозяйствах составляет около 5–8 лет, что и привело к снижению общего числа клинических образцов в данной выборке и отсутствию животных, инфицированных G7 генотипом ВЛКРС [217].

Самая старшая возрастная группа (11+ лет), представленная 4 животными исключительно с генотипом 4 ВЛКРС, показала небольшое снижение средней провирусной нагрузки до 279673 ± 129460 провирусов (диапазон 160979 – 436807) по сравнению с группой 9–10 лет. Однако это снижение не достигло статистической значимости (тест Манна–Уитни $p = 0,629$), что объясняется прежде всего крайне малым размером выборок в обеих группах и высокой индивидуальной вариабельностью значений. Тем не менее сохранение нагрузки выше 250 000 провирусов на 10^6 клеток у большинства животных указывает на то, что и в старшем возрасте иммунная система не обеспечивает эффективного подавления вируса. Выявленная тенденция к снижению может отражать как естественное замедление репликации при долгосрочной хронической инфекции, так и эффект выборки – выживание преимущественно животных с более умеренной вирусной нагрузкой.

Таким образом, разработанный прототип цПЦР–тест–системы, основанный на детекции консервативного участка гена *pol* ВЛКРС и нормализации по клеточному гену *DRA*, обеспечивает чувствительное и количественно воспроизводимое определение провирусной нагрузки ВЛКРС по сравнению с традиционными качественными ПЦР–подходами. В отличие от используемых сейчас в России коммерческих наборов, ориентированных преимущественно на

факт наличия провируса, предложенная мультиплексная стратегия позволяет надёжно измерять широкий диапазон провирусной нагрузки, в том числе крайне низкие значения, характерные для части животных с генотипом G7, тем самым позволяя точнее выделять группы высокого эпизоотического риска и контролировать динамику инфекции на уровне стада.

Глава 4 Обсуждение полученных результатов

Настоящая работа представляет собой первое комплексное молекулярно–генетическое исследование вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на территории Новосибирской области и Республики Дагестан, включающее определение генотипического состава и филогенетических отношений ВЛКРС, анализ аминокислотных замен в геноме вирусов, оценку провирусной нагрузки с применением разработанного прототипа тест–системы на основе цПЦР, а также разработку и внедрение программы формирования стада, свободного от лейкоза.

Встречаемость ВЛКРС, установленная в данном исследовании, демонстрирует существенную неоднородность между типами хозяйств и отдельными подворьями. В промышленном хозяйстве Новосибирской области инфицированность составила 71,5%, что значимо превышает показатель для частных подворий – 41,0% ($p < 0,00001$). Общая встречаемость по совокупной выборке (317 голов) составила 60,3%. При этом в частных подворьях разброс составил от 0% до 79%, что отражает выраженную неравномерность распространения ВЛКРС. Полученные данные превышают аналогичные показатели Республики Дагестан (21,2%). Эти различия были статистически значимыми ($p < 0,00001$) и вероятнее всего, обусловлены особенностями организации животноводства в обоих регионах. В Новосибирской области преобладают крупные промышленные хозяйства с высокой концентрацией поголовья (до 10000 голов в ООО «Раздольное»), тогда как в Республике Дагестан значительная часть скота содержится в мелких фермерских и личных подсобных хозяйствах с ограниченным поголовьем и более изолированными условиями содержания. Немаловажным фактом остаётся и то, что районы РД более изолированы между собой (высокогорье, плохая транспортная сеть), чем районы Новосибирской области, что отчасти может объяснить разницу в поражённости стад ВЛКРС.

Особого внимания заслуживает тот факт, что в крупном мясо – молочном хозяйстве ООО «Раздольное» поражённость ВЛКРС (71,5%) была статистически значимо выше, чем в совокупности индивидуальных подворий Коченёвского района ($p < 0,00001$). Эта закономерность подтверждена и для Республики Дагестан, где наибольшая поражённость была выявлена в Кизлярском и Табасаранском районах (56,1% и 27,3%, $p < 0,00001$) с крупными коммерческими хозяйствами, применяющими системы искусственного осеменения и привязного содержания. Напротив, в горных районах республики с мелкими фермерскими хозяйствами и естественным способом осеменения (Унцукульский район – 0%, Кумторкалинский – 1,3%, Буйнакский – 3,3%) инфицированность была минимальной или отсутствовала ($p < 0,00001$).

Высокая инфицированность в промышленных хозяйствах согласуется с данными по распространению ВЛКРС для крупных молочных комплексов других стран. В США, по данным NAHMS (2018– 2019), серопревалентность на уровне стад достигает 94,2%, а на индивидуальном уровне в положительных стадах – 46,5% [101]. В Канаде по данным CFIA (2016– 2024) распространённость ВЛКРС на уровне стад оценивается в 86,9 – 89,4%, а на индивидуальном уровне – 37% [102]. В КНР инфицированность молочного скота составляет 49,1% [218]. Таким образом, обнаруженные 71,5% распространённости ВЛКРС для промышленного хозяйства находятся в диапазоне значений, типичных для крупных молочных комплексов эндемичных территорий.

Полученные нами данные о распространённости ВЛКРС в Новосибирской области (60,3%) существенно превышают официальные показатели, зарегистрированные для Сибирского федерального округа Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ (12–22% на уровне общего поголовья) [219]. Это расхождение объясняется тем, что официальные данные основаны преимущественно на серологическом скрининге методом РИД (AGID) с последующей гематологической проверкой, при этом учитываются только гематологически больные животные. Метод РИД обладает ограниченной

чувствительностью – 58 – 84% по сравнению с ПЦР – и не выявляет инфицированных животных в ранние сроки (до сероконверсии), в том числе, у телят с материнскими антителами [7,129,134]. В хозяйстве ООО «Раздольное» РИД выявил лишь 10% (158/1584) позитивных животных, гематологический анализ – 1,3% (50/3951), тогда как ПЦР статистически значимо обнаруживала ВЛКРС чаще, чем в РИД и ГЕМ анализах, у 71,5% (143/200, $p < 0,00001$) коров, то есть продемонстрировала почти семикратное преимущество в эффективности детекции ВЛКРС по сравнению с РИД. ИФА–тесты, хотя и более чувствительны, чем РИД, также уступают ПЦР–методам в выявлении ранних и латентных инфекций. Эти данные свидетельствуют о том, что действующие в Российской Федерации нормативные требования по диагностике лейкоза КРС, рекомендующие использование РИД в качестве основного метода скрининга (Приказ Минсельхоза РФ от 24.03.2021 № 156), нуждаются в пересмотре в пользу более чувствительных молекулярных методов [125].

Филогенетический анализ 417 последовательностей гена *env* из Новосибирской области и 136 последовательностей из Республики Дагестан выявил циркуляцию только двух генотипов ВЛКРС – G4 и G7 – в обоих регионах. Генотип G4 статистически значимо преобладал как в Новосибирской области (75,2%; $p < 0,00001$), так и в Республике Дагестан (84,6%; $p < 0,00001$), что согласуется с ранее опубликованными данными о доминировании G4 в Восточной Европе и Северной Азии [4,99,103,111,113].

По данным литературы генотип G4 является вторым по распространённости генотипом ВЛКРС в мире после G1 и характерен для России, Украины, Беларуси, стран Балтийского бассейна [4,7]. Он также выявлен в Монголии и некоторых провинциях Китая (Нинся, Хэнань) предположительно связан с завозом скота с территории России [197,220]. Генотип G7 эндемичен для Балканского и Причерноморского региона, преобладает в Молдове, встречается в Украине, Румынии, а также в западной части России [4,64,103,111]. Обнаружение обоих генотипов ВЛКРС на территориях Сибири и Северного Кавказа указывает на

сложные исторические пути миграции племенного скота и генетическое смешение популяций вируса через торговые потоки [99,111,124].

Примечательным результатом является различие в соотношении генотипов G4/G7 между регионами: 3,0:1 в Новосибирской области и 7,7:1 в Республике Дагестан ($p = 0,0014$). Более высокая доля G4 в Дагестане может быть связана с торговыми связями этого региона со странами Закавказья и Центральной Азии (в первую очередь с Казахстаном), где G4 является преобладающим генотипом [99,221]. Это подтверждается филогенетическим анализом, изоляты из Дагестана статистически значимо образовывали единую крупную ветвь с образцами из Казахстана и Ростовской области, тогда как изоляты из Новосибирской области формировали отдельный небольшой кластер с образцами из Украины, Молдовы и Беларуси.

Только в Тогучинском районе НСО наблюдалось выраженное доминирование генотипа G7 (83,3%, $p < 0,00001$), что не было характерно ни для других районов Новосибирской области, ни для Республики Дагестан. Подобная локальная инверсия соотношения генотипов может быть объяснена эффектом основателя – случайным заносом в хозяйство штамма G7 с последующей его активной циркуляцией внутри стада при ограниченном притоке животных извне [7,10,111]. Аналогичные локальные различия в генотипическом составе ВЛКРС описаны для других регионов: например, в Центральном федеральном округе РФ выявлены геноварианты G1, G2 и G4, в Уральском – G1, G4 и G7, а в Ставропольском крае – G4 и G6 [64,222,223]. Случай хозяйства с преобладанием G7 (83,3%) представляет особый интерес и может быть связан с историей завоза поголовья из региона с высокой долей G7.

Важным наблюдением является обнаружение случаев 100% идентичности нуклеотидных последовательностей ВЛКРС между образцами из географически удалённых районов (до 400 км), например, между Коченёвским и Татарским районами НСО. Подобные факты указывают на перенос инфекции при транспортировке животных или через общие источники племенного материала и

подчёркивают критическую роль контроля перемещений и осеменения скота в программах борьбы с лейкозом.

В обоих регионах были выявлены генетически близкородственные кластеры изолятов ВЛКРС (с коэффициентом поддержки 90–100) внутри отдельных хозяйств, что является молекулярным подтверждением активной горизонтальной передачи вируса в условиях функционирования одного предприятия. Этот факт имеет прямое практическое значение для разработки мероприятий по оздоровлению стад, указывая на необходимость усиления мер биобезопасности внутри хозяйств – в первую очередь стерилизация ветеринарного инструментария, использование одноразовых материалов и разделения инфицированного и здорового поголовья.

Идентификация 78 аминокислотных замен в гене *env* (участок gp51) ВЛКРС на выборке 191 образца из Новосибирской области и 130 на выборке ВЛКРС из Республики Дагестан, представляет собой наиболее детальный мутационный анализ гена *env* российских изолятов ВЛКРС на сегодняшний день. Обнаруженные замены в гене *env* можно классифицировать на три группы: общие для G4 и G7 ВЛКРС с высокой частотой фиксации; генотип–специфичные для G4; генотип–специфичные для G7.

К первой группе относятся A15T (98%), K41R (96%), S49F (97%) и S221L (99%), практически фиксированные в обоих генотипах ВЛКРС. Их присутствие как у G4, так и у G7, а также у ряда других генотипов ВЛКРС (A15T описана у G12) возможно указывает на древнее происхождение этих замен, предшествующее дивергенции генотипов, либо на конвергентную эволюцию под действием общего селективного давления. Замена K41R расположена в рецептор–связывающем домене (RBD, позиции 1–173) gp51, что может влиять на взаимодействие с клеточным рецептором CAT1 (SLC7A1) [73,78].

Генотип–специфичные замены G4 – S23F (97%), A40P (95%), R88H (98%) и I111T (79%) – представляют наибольший функциональный интерес. Замена R88H

локализована в эпитопе CD8⁺ Т-клеточного ответа (позиции 73– 92), а I111T – в нейтрализующем домене ND1 (позиции 74– 102). Pluta et al. продемонстрировали, что мутации в конформационных эпитопах G и H gp51 могут изменять иммунореактивность рекомбинантного белка с сыворотками инфицированных животных [224]. Статистически значимое преобладание данных мутаций ($p < 0,00001$) в >95% изолятов G4 указывает на то, что они либо обеспечивают селективное преимущество вирусу (иммунное уклонение), либо были закреплены генетическим дрейфом в исторической популяции G4.

Для G7 ВЛКРС характерна замена A258V в домене А (100% изолятов G7), отсутствующая у G4. В выборке ВЛКРС из РД частота A258V у G7 статистически значимо снизилась до 61% ($p < 0,00001$), что свидетельствует о большей гетерогенности дагестанских изолятов G7 ВЛКРС по сравнению с новосибирскими. Домен А gp51 участвует в межмолекулярных взаимодействиях гликопротеинового комплекса gp51–gp30, и замена A258V (аланин → валин) может влиять на стабильность тримерной структуры Env [53,70,75].

Значение $dN/dS = 0,181–0,255$ для gp51 ($p < 0,001$ при тесте на отклонение от нейтральности) свидетельствует о выраженном очищающем отборе. Это согласуется с данными Pluta et al. (2018), показавшими высокую консервативность пептидных мотивов gp51 на глобальной выборке из 256 изученных последовательностей ВЛКРС [75]. Очищающий отбор ожидаем для поверхностного белка ретровируса, поскольку gp51 выполняет критические функции связывания с рецептором, слияния мембран и сборки вириона, любое существенное нарушение которых летально для вируса [53].

Полногеномный анализ 154 изолятов позволил выявить генотип-разделяющие мутации во всех основных генах ВЛКРС. В гене gag мутация AP90–91 (100% G7, 0% G4) в белке МА расположена проксимально к мотиву PPPY, критичному для рекрутирования ESCRT-комплексов при отпочковании вирионов [199,225]. Отсутствие данной мутации у G4 свидетельствует о различных стратегиях поздних этапов жизненного цикла вируса у двух генотипов. Мутация

N29D в МА (56% G4) затрагивает область, гомологичную N-концевому домену МА ТЛВЧ-1, участвующему в связывании с мембраной через миристилирование [199,226,227].

В гене pro выявлены G4-специфичные мутации I28V и S34P (100% G4, $p < 0,00001$), расположенные вблизи каталитического остатка Asp25 протеазы. Мутация I28V находится в третьей позиции от каталитического центра и может модулировать субстратную специфичность или каталитическую эффективность протеазы, по аналогии с описанными мутациями резистентности в протеазе ВИЧ-1 [61,228,229]. Мутация S34P (серин → пролин) может влиять на конформационную подвижность петли «заслонки» (flap), определяющей доступ субстрата к активному центру [61,229,230].

В области рХ генома ВЛКРС выявлены наиболее функционально значимые генотип-специфичные различия. В гене tax мутации S220T (99% G4) и C256Y (98% G4) затрагивают лейцин-богатый домен активации (LAD, позиции 100–300), ответственный за взаимодействие Tax с клеточными коактиваторами CBP/p300 [231,232]. Мутация C256Y (цистеин → тирозин) у G4 заменяет тиоловую группу на ароматическую, что может изменять окислительно-восстановительную регуляцию Tax – механизм, описанный для Tax ТЛВЧ-1 как важный для его трансактивирующей способности [233–235]. Для G7 характерны мутации L172P (100% G7) и S280P (100% G7), расположенные в LAD-домене, но затрагивающие и иные участки. Пролиновые замены L172P и S280P могут нарушать α -спиральную структуру LAD, что потенциально может снижать аффинность Tax к CBP/p300 и, как следствие, эффективность трансактивации LTR [24,231,234,235]. Ассоциация замен S220T и C256Y с G4, а также L172P и S280P с G7, статистически значима для каждой позиции ($p < 0,00001$).

Мутации в ORF G4(R3) – R73Q (100% G4), H65L (56% G4), E28D (43% G4) – затрагивают аргинин-богатую область, участвующую в протеолитическом процессинге. Белок G4 синергически с Tax усиливает продукцию вируса путём ингибирования накопления вирусной РНК в клетке [24,236]. У G7 ORF G4(R3)

содержит мутацию N21D (100% G7) в области, перекрывающейся с геном Rex, что может влиять на динамическое перемещение между разными компартментами клетки Rex–белка и экспорт вирусных мРНК [86,87,237]. Генотип–специфичность замен R73Q и N21D статистически подтверждена ($p < 0,00001$), для H65L (56% G4 vs. 0% G7) различие также достигает уровня значимости ($p < 0,00001$).

Совокупность геномных различий формирует «молекулярный портрет» каждого генотипа ВЛКРС: G4 характеризуется мутациями в gag (MA), pro, pol (palm), env (gp51 RBD, ND1, ND2), tax (LAD) и G4(R3), тогда как G7 – мутациями в gag (MA: AP90–91), pol (palm), env (домен A), tax (LAD: L172P, S280P) и R3 (N21D). Эти различия указывают на длительную независимую эволюцию генотипов с адаптацией к различным условиям репликации и/или иммунного давления хозяина.

Провирусная нагрузка в клетках крови животных, инфицированных ВЛКРС, измеренная методом цПЦР на выборке из 90 образцов, продемонстрировала 7,1–кратное превышение медианной PVL при инфекции КРС вирусом лейкоза генотипа G4 (324295 копий/ 10^6 клеток) по сравнению с G7 (45420 копий/ 10^6 клеток). Данное наблюдение представляет особый интерес в контексте молекулярных различий между генотипами, описанными в предыдущем разделе.

Более высокая провирусная при G4–инфекции КРС может быть обусловлена комплексом молекулярно–генетических факторов, мутации S220T и C256Y в LAD–домене Tax G4 потенциально усиливают трансактивацию LTR через повышенную аффинность к CBP/p300, что ведёт к более активной экспрессии вирусных генов, мутации в ORF G4 (R73Q, H65L) могут усиливать синергическое действие с Tax на продукцию вируса, мутации в env (S23F, A40P, R88H, I111T), затрагивающие иммуногенные эпитопы, могут ослаблять иммунный контроль и способствовать поликлональной экспансии инфицированных В–лимфоцитов [21,66,232,235,238]. Напротив, мутации L172P и S280P в Tax у G7 ВЛКРС могут снижать эффективность трансактивации LTR за счёт конформационных изменений LAD, а

более консервативный env G7 может обеспечивать более эффективный иммунный контроль инфекции [64,111,235].

Тенденция к нарастанию провирусной нагрузки с возрастом животных – от 95872 (G4) и 48786 (G7) в группе 1–3 года до 363837 (G4) и 45420 (медиана для G7 по всем возрастам) в группе 9–10 лет – отражает хронический прогрессирующий характер ВЛКРС-инфекции. Поликлональная пролиферация инфицированных В-клеток является основным механизмом увеличения PVL *in vivo*, в отличие от активной вирусной репликации, которая играет ограниченную роль после установления хронической инфекции [20,239–241]. Особенно показательно, что у G4 медианная PVL в возрастной группе 9–10 лет достигала 363837 копий/10⁶ клеток, тогда как пороговое значение для «суперпродуцентов», определённое в международных исследованиях как ≥ 100000 копий, к которому привязывается стратегия приоритетной выбраковки, превышает в группе 1–3 лет при G4-инфекции у двух животных.

Сравнение с данными литературы показывает, что различия PVL у животных, инфицированных разными генотипами, описаны и для других ретровирусов. Для ТЛВЧ-1, филогенетически наиболее близкого к ВЛКРС, показано, что подтипы А и С различаются по уровню PVL, что ассоциировано с различной патогенностью [242]. Полученные в настоящем исследовании данные впервые документируют количественные различия PVL между генотипами G4 и G7 ВЛКРС и создают основу для дальнейших проспективных исследований связи генотипа с развитием персистентного лимфоцитоза и лимфосаркомы.

В настоящем исследовании провирусная нагрузка была определена методом цифровой ПЦР у 90 инфицированных животных, что обеспечивает достаточную статистическую основу для выявления выраженных различий PVL между генотипами G4 и G7 ВЛКРС. Вместе с тем, несмотря на относительно большую выборку для первичного сравнения генотипов, для комплексной оценки влияния дополнительных факторов (возраст, порода, условия содержания) и формирования

мультифакторных моделей необходимо дальнейшее расширение числа обследованных животных.

Следует подчеркнуть, что комплекс РВ–ПЦР/цПЦР–подходов к мониторингу ВЛКРС является для России принципиально новой технологией, сопоставимой по уровню с лучшими зарубежными протоколами количественной диагностики ретровирусных инфекций. Высокая аналитическая чувствительность, возможность стандартизации по универсальному клеточному маркёру и адаптация методов к работе как с ветеринарным материалом, так и с клеточными культурами создают основу для потенциальной трансляции этих подходов в медицину человека, в том числе для более точного изучения возможной связи инфекции ВЛКРС с риском рака молочной железы и другими онкологическими заболеваниями.

Опыт формирования свободного от ВЛКРС стада в условиях крупного промышленного хозяйства Новосибирской области (поголовье ≈ 10000 голов) продемонстрировал принципиальную осуществимость данной задачи при использовании комплексной стратегии «тест – сегрегация – контролируемое воспроизводство».

Ключевым элементом программы стало создание резервного стада из молодняка 2 – 3 месяцев, рождённого от серонегативных коров и протестированного методом ИФА. Из 642 телят 87 (13,6%) оказались ПЦР–положительными, что подчёркивает ограничения серологической диагностики, реакция иммунодиффузии обладает относительно невысокой чувствительностью и не позволяет надёжно выявлять животных с низким уровнем антител, в том числе в ранний период инфицирования. В совокупности 13,6% ПЦР–положительных телят могут быть результатом пренатальной (трансплацентарной) передачи ВЛКРС, описанной в литературе с частотой 4–18%, инфицирования через контаминированное молозиво или молоко при отсутствии обязательной пастеризации, и горизонтальной передачи в первые дни жизни при тесном контакте с инфицированными животными [156].

Данная стратегия соответствует подходам, успешно реализованным в 21 стране, ликвидировавшей ВЛКРС [49]. В странах ЕС (Директива 64/432/ЕЕС) ликвидация была достигнута преимущественно методом «тест и выбраковка» с государственным финансированием [7]. В условиях высокой превалентности (>40%) ВЛКРС, характерной для крупных российских молочных комплексов, немедленная выбраковка всех серопозитивных животных экономически нецелесообразна. Альтернативная стратегия, реализованная в настоящем исследовании, – постепенное замещение инфицированного поголовья серонегативным молодняком – является более экономически обоснованной и рекомендуется для хозяйств с высокой распространённостью.

Возможная интеграция цПЦР в программу оздоровления открывает дополнительные возможности для стратификации инфицированных животных по уровню PVL. Исследование Shrestha et al. (2024) показало, что приоритетное удаление животных с высокой PVL (>100000 копий) позволяет значительно снизить горизонтальную передачу вируса в стаде даже без полной элиминации всех серопозитивных животных [243]. С учётом полученных данных о преимущественно высокой PVL при G4-инфекции (медиана 324295 копий/10⁶ клеток), стратегия приоритетной выбраковки G4-инфицированных животных с высокой PVL может быть наиболее эффективным подходом для российских хозяйств.

Достижение статуса ВЛКРС-free для данного хозяйства следует рассматривать как долгосрочную задачу, требующую сохранения непрерывности оздоровительной программы, регулярного тестирования поголовья, строгого контроля ввода новых животных и обязательного применения молекулярных методов диагностики (ПЦР/цПЦР) наряду с серологическим скринингом. Реальные сроки достижения этого статуса будут зависеть от темпов дальнейшего снижения инфицированности, уровня соблюдения мер биобезопасности и предотвращения реинтродукции вируса при закупке племенного поголовья.

Совокупность полученных данных позволяет сформулировать модель взаимосвязи между генотипом ВЛКРС, его молекулярно–генетическими характеристиками и биологическими свойствами (провирусная нагрузка, характер распространения, $p < 0,00001$). Генотип G4 ассоциирован с более высокой провирусной нагрузкой, широкой представленностью в исследованной популяции и наличием набора устойчивых генотип–специфичных замен в функционально значимых участках генома, включая домены RBD, ND1 и CD8⁺–эпитоп белка Env–gp51, домен активации LAD белка Tax, а также генах G4/R3.

Генотип G7, напротив, характеризуется большей филогенетической неоднородностью на уровне полных геномов, разделением на несколько подгрупп в сетевом анализе и статистически значимыми признаками рекомбинации; для него характерны специфические мутации в белке Tax (L172P, S280P), а также замены в Env (включая A258V в области A gp51), затрагивающие ключевые регуляторные и структурные регионы. Это позволяет предполагать, что для G4 более характерна стратегия эффективной персистенции и распространения при относительно стабильном наборе критически важных мутаций, тогда как для G7 характерна более выраженная ретикулярная эволюция и геномная мозаичность за счёт рекомбинаций.

Практическое значение данной модели состоит в обосновании дифференцированного подхода к контролю ВЛКРС в зависимости от генотипового состава циркулирующих штаммов. В хозяйствах с преобладанием G4 приоритетным является раннее выявление и приоритетная выбраковка животных с высокой PVL, тогда как в хозяйствах с преобладанием G7 акцент может быть перенесён на предотвращение завоза G4 и мониторинг горизонтальной передачи. Разработанный прототип тест системы цПЦР и протокол генотипирования по env создают инструментальную базу для реализации такого дифференцированного подхода не только в популяциях КРС, но и для скрининга образцов человека (кровь, ткани молочной железы) на наличие ДНК ВЛКРС, что особенно важно в контексте обсуждаемой возможной связи инфекции ВЛКРС с риском рака молочной железы

у женщин и необходимости более точного понимания онкогенной роли этого вируса для человека.

Полученные результаты закладывают научную основу для разработки стратегии контроля ВЛКРС в Российской Федерации, учитывающей региональную специфику генотипового состава, молекулярно–биологические свойства циркулирующих штаммов и экономические реалии ведения молочного скотоводства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, подтверждают актуальность проблемы широкой встречаемости ВЛКРС на территории России. Настоящая работа существенно пополняет знания о генетическом разнообразии ВЛКРС. Молекулярно–генетическое исследование, проведённое в период с 2020 года по 2026 на территориях Новосибирской области и Республики Дагестан, позволило получить новые сведения о соотношении генотипов вируса в структуре популяции ВЛКРС, впервые описать молекулярно–генетические и биологические особенности циркулирующих геновариантов вируса.

В ходе выполнения работ установлено, что на исследованных территориях России циркулирует два генотипа ВЛКРС: генотип G4, доминирующий с долей 75,2%, и G7, составляющий 24,8%. Выявлено, что на исследованных территориях соотношение генотипов ВЛКРС достаточно сильно варьирует. В отдельных хозяйствах доля генотипа G7 достигает 83,3%, тогда как в других данный генотип вируса отсутствует полностью. Полученные результаты согласуются с данными научной литературы о преобладании генотипа G4 и G7 в Восточной Европе и странах СНГ. С применением мультиплексной капельной цифровой ПЦР показано, что животные, инфицированные ВЛКРС генотипов G4 и G7, имеют разные уровни и возрастную динамику провирусной нагрузки. Установлено, что животные, инфицированные генотипом G4, имеют более высокую провирусную нагрузку ВЛКРС по сравнению с животными, инфицированными генотипом G7 (медиана 324295×10^6 и 45420×10^6 соответственно, разница в 7,1 раза). Учитывая, что уровень провирусной нагрузки является ключевым фактором при горизонтальной передаче вируса, животные, инфицированные генотипом G4, представляют собой приоритетную группу при планировании программ контроля и элиминации инфекции. Разработанная в ходе исследования прототип системы цПЦР продемонстрировал высокую аналитическую чувствительность (LoD 5 копии; LoB 7 копий), которая превосходила стандартные методы РВ–ПЦР и гнездовую–ПЦР.

Впервые в России на основе результатов генотипирования и встречаемости ВЛКРС была разработана и внедрена стратегия поэтапного формирования ВЛКРС–свободного стада на базе крупного хозяйства ООО «Раздольное», включающая двойное тестирование молодняка в 3 месяца и в 6 месяцев, и постоянный мониторинг уровня инфицирования методами гнездовой–ПЦР и методом ПЦР в реальном времени.

Существенным результатом работы явилось значительное пополнение международной базы данных GenBank, в которой было депонировано 417 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена env, что расширило базу депонированных последовательностей ВЛКРС из России вдвое. Впервые были получены полногеномные последовательности ВЛКРС генотипа G4 для штаммов, циркулирующих на территории России, а также впервые в мире получены последовательности полных геномов генотипа G7, который ранее не имел в базе GenBank депонированных полногеномных последовательностей. Данные последовательности обеспечивают доступность референсных материалов для мирового научного сообщества и создают основу для дальнейших сравнительных исследований.

На основе анализа полногеномных последовательностей ВЛКРС генотипов G4 и G7, полученных с применением технологии секвенирования нового поколения (NGS, Illumina MiSeq), были охарактеризованы мутации во всех основных генах вируса (gag, pro, pol, env, tax/reg, R3, G4). Впервые выявлены генотип–специфические мутации G4 и G7 ВЛКРС, в том числе в ключевых функциональных доменах белков вируса. Мутации в гене env–gp51 свидетельствуют о потенциальном влиянии генотипа вируса на эффективность иммунного ответа хозяина и могут иметь значение для разработки диагностических тест–систем, так как данный участок чаще всего используется в диагностике.

Результаты проведенного исследования показывают, что для эффективного контроля и элиминации ВЛКРС на территориях Новосибирской области и Республики Дагестан, а также других регионов Российской Федерации следует:

1. Внедрять интервальную ПЦР–диагностику молодняка с целью формирования стада, свободного от ВЛКРС;
2. Проводить регулярный молекулярно–генетический мониторинг циркулирующих ВЛКРС с целью своевременного выявления генотипового состава вируса в хозяйствах, обнаружения новых геновариантов, в том числе рекомбинантных форм, и оценки динамики генетической структуры популяции вируса для разработки эффективных программ оздоровления;
3. Внедрять метод цифровой ПЦР (цПЦР) для количественного определения провирусной нагрузки ВЛКРС и учитывать уровень провирусной нагрузки при планировании оздоровительных мероприятий;
4. Проводить верификацию и обновление диагностических тест–систем с учётом выявленных мутаций ВЛКРС в области мишеней для праймеров и зондов тест–системы с целью обеспечения чувствительности и специфичности диагностики ВЛКРС на фоне генетической вариабельности циркулирующих штаммов.

Проведённое комплексное молекулярно–генетическое исследование полностью реализовало поставленную цель – изучить особенности географического распределения, генетическое разнообразие и эволюционные связи вариантов ВЛКРС, циркулирующих на отдельных территориях Российской Федерации. Все семь задач исследования решены; полученные данные существенно расширяют представления о биологии, эпизоотологии и диагностике ВЛКРС в России.

ВЫВОДЫ

1. Встречаемость ВЛКРС в хозяйствах Новосибирской области носит неравномерный характер, молекулярно–генетический скрининг 317 животных Коченевского района показал, что средняя встречаемость ВЛКРС в стадах КРС составила 60,3%, при этом уровень встречаемости вируса в крупном хозяйстве (71,5%) был значимо выше ($p < 0,00001$), чем в частных подворьях (0-79%).

2. Для 6 крупных хозяйств Новосибирской области охарактеризована генотипическая структура популяции ВЛКРС. Установлено значимое доминирование генотипа G4 (75,2%) по сравнению с генотипом G7 (24,8%) ВЛКРС ($p < 0,00001$).

3. Получены молекулярно–генетические данные и показатели встречаемости ВЛКРС в хозяйствах Республики Дагестан. Средняя поражённость КРС составила 21,2% при значимом ($p < 0,00001$) доминировании генотипа G4 (88,5%) по сравнению с генотипом G7 (11,5%).

4. Хозяйства НСО характеризуются большей поражённостью скота ВЛКРС по сравнению с РД (60,3% против 21,2%, $p < 0,00001$), при этом для НСО характерна преимущественно внутрихозяйственная передача ВЛКРС с формированием локальных кластеров, тогда как в Дагестане также выявлены признаки заноса из Казахстана.

5. При анализе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей фрагмента гена *env*–gp51 циркулирующих в России геновариантов ВЛКРС G4 и G7 установлен ограниченный генотип–специфический набор замен в доменах RBD и ND1–ND3, а также в участках CD4⁺– и CD8⁺–Т–клеточных эпитопов, отражающий особенности антигенной организации каждого генотипа.

6. Впервые расшифрованы и охарактеризованы 154 полных генома ВЛКРС генотипа G7 и генотипа G4 (регионы *gag*, *pro*, *pol*, *env*, *pX*). Выявлены генотип–специфические аминокислотные замены во всех структурных и регуляторных генах, в том числе в домене LAD белка Tax, регионах R3/G4, а также специфические мутации, отличающие российские последовательности от референс–генома FLK и зарубежных последовательностей ВЛКРС.

7. Впервые в России разработан и апробирован прототип диагностической тест–системы на основе цифровой ПЦР (цПЦР) с мишенью в гене *pol* ВЛКРС и референс–гене КРС *BoLA–DRA*, обеспечивающий одновременное выявление и количественную оценку провирусной нагрузки геновариантов G4 и G7 с нормализацией по числу клеток хозяина, аналитическая чувствительность которого (LoD 7 копий/образец, LoQ 10 копий/образец) достоверно превосходит таковую для РВ–ПЦР и гнездовой ПЦР.

8. С использованием цПЦР показано: у животных, инфицированных генотипом G4, провирусная нагрузка во всех возрастных группах была статистически значимо выше, чем при инфицировании генотипом G7 ($p < 0,05$), что подтверждает более агрессивный характер персистенции генотипа G4.

9. Предложенный поэтапный подход к элиминации ВЛКРС, основанный на внедрении ПЦР–мониторинга в виде двукратного тестирования молодняка (в 3 и 6 месяцев) и реализации программы «test–and–manage» с поэтапным формированием ВЛКРС–свободного поголовья, продемонстрировал снижение пораженности скота ВЛКРС в хозяйстве с 71,5% до 13,6% ($p < 0,00001$).

Благодарности

Автор приносит благодарность своим коллегам из отдела ретровирусов, сотрудникам отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, а именно: кандидату биологических наук Н.М. Гашниковой, младшему научному сотруднику К.А. Елфимову, кандидату биологических наук А.В. Тотменину, младшему научному сотруднику П.Ю. Ачигечевой, младшему научному сотруднику И.П. Осиповой, младшему научному сотруднику А.И. Мурзину, кандидату биологических наук Т.В. Трегубчак, научному сотруднику Б.С. Малышеву. Автор выражает признательность сотрудникам Дагестанского государственного университета кафедры биологии и биоразнообразия: кандидату биологических наук, доценту М.Г. Даудовой, стажёру-исследователю Х.Г. Койчуеву. Автор приносит благодарность директору ООО «Раздольное» Г.В. Власову за многолетнее сотрудничество. Сотрудникам Управления ветеринарии Новосибирской области и Комитета ветеринарии Республики Дагестан. Автор также выражает благодарность семье и близким за поддержку при подготовке работы.

Список используемых сокращений

BIC – Bayesian Information Criterion – байесовский информационный критерий выбора модели

BigDye – BigDye Terminator – флуоресцентный краситель для секвенирования по Сэнгеру

BoHV-1 – Bovine Herpesvirus 1 – вирус инфекционного ринотрахеита КРС

BoLA-DRA (DRA) – Bovine Leukocyte Antigen DRA – ген МНС класса II КРС (α -цепь DR)

BoLA-DRB3 – Bovine Leukocyte Antigen DRB3 – ген МНС класса II КРС (β -цепь DR)

CBP/p300 – CREB-Binding Protein / p300 – коактиваторы транскрипции Tax ВЛКРС

CD18 – интегрин $\beta 2$ (CD18) – молекула адгезии лейкоцитов

CD5⁺ IgM⁺ В-клетки – В-лимфоциты, несущие маркеры CD5 и IgM (субпопуляция)

CFIA – Canadian Food Inspection Agency – Канадское агентство по инспекции пищевых продуктов

CLSI EP17-A2 – Clinical and Laboratory Standards Institute guideline EP17-A2 – стандарт оценки LoD/LoQ/LoB

CoCoMo – Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers – программа дизайна праймеров к ретровирусам

CREB – cAMP Response Element-Binding protein – белок связывания cAMP-ответного элемента

CRM1 – Chromosomal Maintenance 1 (Exportin 1) – ядерный экспортер для Rex ВЛКРС

CTD – C–Terminal Domain – С–концевой домен капсидного белка СА

DCIS – Ductal Carcinoma In Situ – протоковая карцинома in situ молочной железы

DDE – каталитическая триада DDE (Asp–Asp–Glu) интегразы ВЛКРС

цПЦР – цифровая ПЦР (digital PCR, dPCR)

dN – число несинонимических замен на сайт (nonsynonymous substitutions per site)

dNTP – deoxyNucleoside TriPhosphate – дезоксинуклеозидтрифосфаты

DRA – сокращённое обозначение BoLA–DRA (см. BoLA–DRA)

dS – число синонимических замен на сайт (synonymous substitutions per site)

EFSA – European Food Safety Authority – Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов

Env – Envelope – оболочечный полипротеин ВЛКРС (gp51 + gp30)

env–gp51 – ген env и его маркерный продукт gp51 (используется для генотипирования)

ER/PR – Estrogen Receptor / Progesterone Receptor – рецепторы эстрогена и прогестерона

ESCRT – Endosomal Sorting Complexes Required for Transport – эндосомальные сортировочные комплексы

FAM – 6–карбоксифлуоресцеин – флуоресцентный краситель (репортер зонда ПЦР)

FLK – Fetal Lamb Kidney – клетки почки эмбриона ягнёнка (перевиваемая линия для ВЛКРС)

G1–G12 – генотипы ВЛКРС (12 генетических групп по классификации gp51/env)

G4 – 1) ORF G4 / генотип G4 ВЛКРС; 2) в K2P+G4 – Gamma 4 (параметр модели замен нуклеотидов)

Gag – Group-specific Antigen – структурный полипротеин ВЛКРС (МА, СА, NC)

GAPDH – Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase – референсный ген домашнего хозяйства

GMP/GLP – Good Manufacturing Practice / Good Laboratory Practice – надлежащая производственная/лабораторная практика

gp30 – гликопротеин 30 кДа – трансмембранная субъединица Env ВЛКРС (TM)

gp51 – гликопротеин 51 кДа – поверхностная субъединица Env ВЛКРС (SU)

GTR – General Time Reversible – обратимая модель замен нуклеотидов

HER-2 – Human Epidermal growth factor Receptor 2 – рецептор эпидермального фактора роста 2

HEX – Hexachlorofluorescein – флуоресцентный краситель (альтернативный репортер ПЦР)

HiDi – Hi-Di Formamide – денатурирующий формамид для капиллярного электрофореза

HPVL – High Proviral Load – высокая провирусная нагрузка

HS-Taq – Hot-Start Taq – Taq-полимераза с «горячим стартом»

IL-8 – Interleukin-8 (CXCL8) – интерлейкин-8, хемокин нейтрофилов

IN – Integrase – интеграза

in situ – в естественном расположении / на месте (в живых тканях)

in utero – внутриутробная (передача вируса)

in vitro – в пробирке / в культуре клеток (вне живого организма)

iSLK – inducible Spleen-derived Long-term Kaposi – клеточная линия для вирусных исследований

ITAM – Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif – активирующий тирозиновый мотив иммунорецептора

ITIM – Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif – ингибирующий тирозиновый мотив иммунорецептора

K2P + G4 – Kimura 2-Parameter + Gamma 4 – модель нуклеотидных замен с гамма-распределением скоростей

LAD – Leucine-Zipper Activation Domain – домен активации транскрипции
Tax

LoB – Limit of Blank – предел холостого опыта

LoD – Limit of Detection – предел обнаружения

LoQ – Limit of Quantitation – предел количественного определения

LPVL – Low Proviral Load – низкая провирусная нагрузка

LR-полимераза – Long-Range ДНК-полимераза (для ампликонов >5 т.п.н.)

LTR – Long Terminal Repeat – длинные концевые повторы провируса ВЛКРС

MCF-102A – нормальная клеточная линия эпителия молочной железы человека

MCF-7 – Michigan Cancer Foundation-7 – линия клеток рака молочной железы человека (ER⁺)

ML-метод – Maximum Likelihood – метод максимального правдоподобия (филогенетика)

NAHMS – National Animal Health Monitoring System – Национальная система мониторинга здоровья животных (США)

NC – Nucleocapsid – нуклеокапсид (домен Gag)

NCBI – National Center for Biotechnology Information – Национальный центр биотехнологической информации (США)

ND1–ND3 – Neutralization Domains 1–3 – нейтрализующие домены gp51 ВЛКРС

NES – Nuclear Export Signal – сигнал ядерного экспорта

NETs – Neutrophil Extracellular Traps – нейтрофильные внеклеточные ловушки

NF- κ B – Nuclear Factor kappa B – транскрипционный фактор NF- κ B

NGS – Next-Generation Sequencing – высокопроизводительное секвенирование нового поколения

NK-клетки – natural killer cells – естественные клетки-киллеры

NLS – Nuclear Localization Signal – сигнал ядерной локализации

NLS/RNA-binding – совмещённый NLS и РНК-связывающий домен белка Rex ВЛКРС

NTC – No Template Control – отрицательный контроль без матрицы

NTD – N-Terminal Domain – N-концевой домен капсидного белка CA

OR – Odds Ratio – отношение шансов

ORF – Open Reading Frame – открытая рамка считывания

p10 – нуклеокапсидный белок p10 в составе Gag (NC)

p12 – нуклеокапсидный белок p12 в составе Gag

p15 (MA) – матриксный белок 15 кДа (MA – Matrix) в составе Gag

p24 – капсидный белок 24 кДа (CA – Capsid) в составе Gag

PC1/PC3 – Proprotein Convertase 1/3 – конвертаза протеазы ВЛКРС

PHI–тест – Pairwise Homoplasy Index – тест на рекомбинацию

Pol – Polymerase – полимераз ВЛКРС (RT + RNase H + IN)

PPPY – мотив PPPY (Pro–Pro–Pro–Tyr) в МА ВЛКРС – сайт почкования ESCRT

Pr45 – полипротеин–предшественник Gag 45 кДа

Pr66 – полипротеин–предшественник Gag–Pro 66 кДа

Pr72 – полипротеин–предшественник Pol 72 кДа

Pro – Protease – вирусная протеаза ВЛКРС

PRR – Pattern Recognition Receptor – рецептор распознавания паттернов патогенов

PU.1/ETS – транскрипционный фактор PU.1 семейства ETS

PU.1/Spi–B – транскрипционные факторы семейства ETS (PU.1 и Spi–B), регуляторы В–клеток

PVL – Proviral Load – провирусная нагрузка

pX – регуляторный локус pX ВЛКРС (содержит ORF tax, rex, R3, G4)

R3 – ORF R3 – вспомогательная открытая рамка считывания ВЛКРС (в локусе pX)

Rb – Retinoblastoma protein – белок ретинобластомы, супрессор опухолей

RBD – Receptor–Binding Domain – рецептор–связывающий домен gp51

Rex – Regulator of expression – регулятор экспрессии ВЛКРС

Rex–overlap – перекрывающийся участок гена Rex/R3 в геноме ВЛКРС

RISC–комплекс – RNA–induced Silencing Complex – РНК–индуцированный сайленсинг–комплекс

RNase H – Ribonuclease H – домен РНКазы H в составе обратной транскриптазы

RPP30 – Ribonuclease P Protein subunit p30 – эндогенный референсный ген КРС

RRE – Rex-Responsive Element – Rex-чувствительный элемент в РНК ВЛКРС

RT – Reverse Transcriptase – обратная транскриптаза

SH-aLRT – Shimodaira-Hasegawa approximate Likelihood Ratio Test – приближённый тест правдоподобия для оценки бутстрепа

SHP-1 – SH2-domain-containing Phosphatase 1 – тирозинфосфатаза SHP-1

SID – Signal Inhibitory Domain – ингибирующий сигнальный домен

SNP – Single Nucleotide Polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм

TAE – Tris-Acetate-EDTA – буфер для электрофореза в агарозном геле

Taq-полимераза – *Thermus aquaticus* ДНК-полимераза

Tax – Transactivator of transcription – трансактиватор транскрипции ВЛКРС

TNF- α – Tumor Necrosis Factor alpha – фактор некроза опухолей альфа

TTP – Tristetraprolin – РНК-связывающий белок, регулятор стабильности мРНК

TxRE – Tax-responsive element – Tax-чувствительный элемент в LTR ВЛКРС

U3, R и U5 – субрегионы LTR: U3 (upstream), R (repeat), U5 (downstream)

YXDD – каталитический мотив YXDD (Tyr-X-Asp-Asp) обратной транскриптазы

YXXL – тирозинсодержащий сигнальный мотив (Tyr-X-X-Leu) в ITAM/ITIM

AP-1 – Activator Protein 1 – транскрипционный фактор AP-1

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВЛКРС – вирус лейкоза крупного рогатого скота

ВЛКРС–R – клеточный рецептор вируса лейкоза крупного рогатого скота, обеспечивающий первичное связывание вириона с клеткой-мишенью

ГЕМ – гематологическое исследование крови

гнездовая–ПЦР – гнездовая (двухэтапная) ПЦР (nested–PCR)

ДИ – доверительный интервал (CI)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕАЭС – Евразийский экономический союз

Значение π – нуклеотидное разнообразие (nucleotide diversity, π)

ИФА – иммуноферментный анализ (ELISA)

кДа – килодальтон (единица молекулярной массы)

кДНК – комплементарная ДНК

КНР–Китайская Народная Республика

КРС–крупный рогатый скот

КФХ – крестьянское (фермерское) хозяйство

MJN – Median Joining Network – метод медианного объединения (сети гаплотипов)

мРНК – матричная РНК

нкРНК – некодирующая РНК

НСО – Новосибирская область

ООО «Раздольное» – общество с ограниченной ответственностью «Раздольное»

пре-миРНК – предшественник микроРНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР–РВ – ПЦР в режиме реального времени (real-time PCR, qPCR)

РД – Республика Дагестан

РИД – реакция иммунодиффузии (AGID)

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНК (ψ) – геномная РНК ВЛКРС с упаковочным сигналом пси (ψ)

РФ – Российская Федерация

СНГ – Содружество Независимых Государств

СПК – сельскохозяйственный производственный кооператив

Т–клетки – Т–лимфоциты

ТЛВЧ – Вирус Т–клеточного лейкоза человека

тРНК – транспортная РНК

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)

ЭЛКРС – энзоотический лейкоз крупного рогатого скота

эпитоп $CD4^+$ – Т–хелперный эпитоп gp51, распознаваемый $CD4^+$ Т–лимфоцитами

эпитоп $CD8^+$ – цитотоксический Т–клеточный эпитоп gp51, распознаваемый $CD8^+$ Т–лимфоцитами

Список литературы

1. Moratorio G. и др. A detailed molecular analysis of complete Bovine Leukemia Virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas // Vet. Res. 2013. Т. 44, № 1.
2. Zhao Y. и др. Bovine Leukemia Virus: Origin, Prevalence, Phylogenetic Diversity, Risk Factors, and Strategies for Control // Animals 2025, Vol. 15, Page 1344. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2025. Т. 15, № 9. С. 1344.
3. Plant E., Bellefroid M., Van Lint C. A complex network of transcription factors and epigenetic regulators involved in bovine leukemia virus transcriptional regulation // Retrovirology. BioMed Central Ltd, 2023. Т. 20, № 1. С. 11.
4. Lv G. и др. The Global Epidemiology of Bovine Leukemia Virus: Current Trends and Future Implications // Animals (Basel). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2024. Т. 14, № 2. С. 297.
5. Ruiz V. и др. Bovine Leukemia virus infection in neonatal calves. risk factors and control measures // Front. Vet. Sci. Frontiers Media S.A., 2018. Т. 5, № OCT. С. 414934.
6. Kuzmin V. и др. Spread Dynamics of Leucosis in Cattle in Livestock Farms of the Russian Federation for 2000–2018 // KnE Life Sciences. Knowledge E DMCC, 2019. С. 666-673–666–673.
7. Polat M., Takeshima S. N., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus // Virol. J. BioMed Central Ltd., 2017. Т. 14, № 1. С. 209.
8. Lee E. и др. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates // Virol. J. BioMed Central Ltd., 2015. Т. 12, № 1. С. 64.
9. Zhao Y. и др. The Prevalence and Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus among Dairy Cattle in Henan Province, China // Viruses. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2024. Т. 16, № 9. С. 1399.

10. Rola-Łuszczak M. и др. Molecular characterization of the env gene of bovine leukemia virus in cattle from Pakistan with NGS-based evidence of virus heterogeneity // Pathogens. MDPI, 2021. Т. 10, № 7. С. 910.
11. Pavliscak L. A. и др. Tracing viral transmission and evolution of bovine leukemia virus through long read Oxford Nanopore sequencing of the proviral genome // Pathogens. MDPI, 2021. Т. 10, № 9. С. 1191.
12. Delarmelina E. и др. High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil // PLoS One. Public Library of Science, 2020. Т. 15, № 10. С. e0239745.
13. DeSantis C. E. и др. Breast cancer statistics, 2019 // CA Cancer J. Clin. CA Cancer J Clin, 2019. Т. 69, № 6. С. 438–451.
14. Yushkova L. Ya. и др. Analysis of the state and trends in the development of livestock breeding in the Novosibirsk region taking into account its biological safety // Siberian Herald of Agricultural Science. SFSCA RAS, 2025. Т. 54, № 9. С. 43–55.
15. Pavlenko Elena Anatolyevna. Index analysis of the number and productivity of cattle (cows) in the Republic of Dagestan // Theory and Practice of Social Development. Общество с ограниченной ответственностью «Издательский дом «ХОРС», 2014. № 21.
16. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. Т. 74, № 12. С. 5463–5467.
17. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV [Электронный ресурс]. URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения: 05.04.2026).
18. Schoch C. L. и др. NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools // Database. Oxford University Press, 2020. Т. 2020.

19. Takahashi M. и др. Ex vivo survival of peripheral blood mononuclear cells in sheep induced by bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5- B cells that express BLV // *Microbes Infect.* 2004. Т. 6, № 6. С. 584–595.
20. Pomier C. и др. A dose-effect relationship for deltaretrovirus-dependent leukemogenesis in sheep // *Retrovirology*. Retrovirology, 2009. Т. 6.
21. Gillet N. и др. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // *Retrovirology*. 2007. Т. 4. С. 18.
22. Bovine Leukosis - Generalized Conditions - MSD Veterinary Manual [Электронный ресурс]. URL: <https://www.msdsvetmanual.com/generalized-conditions/bovine-leukosis/bovine-leukosis> (дата обращения: 05.04.2026).
23. Marawan M. A. и др. Bovine Leukaemia Virus: Current Epidemiological Circumstance and Future Prospective // *Viruses*. MDPI, 2021. Т. 13, № 11. С. 2167.
24. Aida Y. и др. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus // *Front. Microbiol.* Frontiers Media SA, 2013. Т. 4, № NOV. С. 64111.
25. Tsutsui T. и др. Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis // *Prev. Vet. Med.* Elsevier, 2016. Т. 124. С. 96–101.
26. Renegar K. K. и др. An Overview of the Bovine Leukemia Virus // *EDIS*. University of Florida George A Smathers Libraries, 2023. Т. 2023, № 3.
27. Frie M. C., Coussens P. M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle // *Vet. Immunol. Immunopathol.* Elsevier, 2015. Т. 163, № 3–4. С. 103–114.
28. Szczotka M., Kuzmak J. Expression of Bovine Leukaemia Virus (BLV) Gp51 Protein in Blood and Milk Cells of Cows with Leukosis // *J. Vet. Res.* J Vet Res, 2022. Т. 66, № 3. С. 305–315.

29. Dequiedt F. и др. Bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis in cattle does not correlate with increased ex vivo survival of B lymphocytes // J. Virol. J Virol, 1999. Т. 73, № 2. С. 1127–1137.
30. Boes K. M., Durham A. C. Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid/Lymphatic System // Pathologic Basis of Veterinary Disease. Elsevier Inc., 2017. С. 724.
31. Lima E. de S. и др. Milk Macrophage Function in Bovine Leukemia Virus-Infected Dairy Cows // Front. Vet. Sci. Frontiers Media S.A., 2021. Т. 8. С. 650021.
32. Hutchinson H. C. и др. Diagnostic Measures of Disease Progression in Cattle Following Natural Infection with Bovine Leukemia Virus // Pathogens. MDPI, 2021. Т. 10, № 8. С. 987.
33. Panei C. J. и др. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR // BMC Vet. Res. BMC Vet Res, 2013. Т. 9.
34. (AHAW) E. P. on A. H. and W. и др. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): enzootic bovine leukosis (EBL) // EFSA Journal. Wiley, 2017. Т. 15, № 8. С. e04956.
35. Enzootic bovine leukosis - WOAH - World Organisation for Animal Health [Электронный ресурс]. URL: <https://www.woah.org/en/disease/enzootic-bovine-leukosis/> (дата обращения: 05.04.2026).
36. Donnik I. M. и др. Bovine leukemia virus Infection – diagnostics, eradication, and anthroponotic potential (background) (review) // Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]. Agricultural Biology Editorial Office, NPO, 2021. Т. 56, № 1. С. 230–244.

37. Monti G. E., Frankena K., De Jong M. C. M. Evaluation of natural transmission of bovine leukaemia virus within dairy herds of Argentina // *Epidemiol. Infect.* Epidemiol Infect, 2007. T. 135, № 2. C. 228–237.
38. Blitvich B. J. The Role of Hematophagous Arthropods, Other than Mosquitoes and Ticks, in Arbovirus Transmission // *Viruses* 2025, Vol. 17, Page 932. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2025. T. 17, № 7. C. 932.
39. Panei C. J. и др. Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus // *Open Vet. J.* Open Vet J, 2019. T. 9, № 1. C. 33–37.
40. Quadros D. L. и др. The transmission of bovine leukemia virus to calves occurs mostly through colostrum and milk // *Vet. World.* Vet World, 2024. T. 17, № 12. C. 2918–2924.
41. Lv G. и др. Effect of BLV Infection on the Immune Function of Polymorphonuclear Neutrophil in Dairy Cows // *Front. Vet. Sci.* Front Vet Sci, 2021. T. 8.
42. De Brun L. и др. Natural Association Between Bovine Leukemia Virus and Reproductive Infectious Diseases // *Acta Sci. Vet.* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2023. T. 51. C. 1922.
43. Watanabe A. и др. Association between bovine leukemia virus proviral load and severity of clinical mastitis // *J. Vet. Med. Sci.* J Vet Med Sci, 2019. T. 81, № 10. C. 1431–1437.
44. Erskine R., Sordillo L. Bovine Leukosis Virus Update I: Prevalence, Economic Losses, and Management.
45. Otta S. L., Johnson R., Wells S. J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms // *Prev. Vet. Med.* Elsevier, 2003. T. 61, № 4. C. 249–262.

46. Kuczewski A. и др. Economic evaluation of 4 bovine leukemia virus control strategies for Alberta dairy farms // J. Dairy Sci. J Dairy Sci, 2019. Т. 102, № 3. С. 2578–2592.
47. Nakada S. и др. Economic losses associated with mastitis due to bovine leukemia virus infection // J. Dairy Sci. Elsevier, 2023. Т. 106, № 1. С. 576–588.
48. Nakada S. и др. Estimation of economic loss by carcass weight reduction of Japanese dairy cows due to infection with bovine leukemia virus // Prev. Vet. Med. Elsevier, 2022. Т. 198. С. 105528.
49. Bartlett P. C. и др. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus // Pathogens 2020, Vol. 9, Page 1058. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Т. 9, № 12. С. 1058.
50. Puentes R. и др. Horizontal transmission dynamics of bovine leukemia virus (BLV) and negative effect on reproductive performance in naturally infected Holstein heifers // Science And Animal Health. Universidade Federal de Pelotas, 2017. Т. 4, № 3. С. 294.
51. Structural Research of Bovine Leukemia Virus - Creative Biostructure [Электронный ресурс]. URL: <https://www.creative-biostructure.com/structural-research-of-bovine-leukemia-virus.html?srsId=AfmBOooVgsJh3wd0sTcYFgXOhRmbFxlUkfSzTectLco3JCUuQqi kDZOX> (дата обращения: 06.04.2026).
52. Sagata N. и др. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1985. Т. 82, № 3. С. 677.
53. de Brogniez A., Mast J., Willems L. Determinants of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoproteins Involved in Infectivity, Replication and Pathogenesis // Viruses. Viruses, 2016. Т. 8, № 4.

54. Fomenko O. Yu. Structural characteristics of the bovine leukemia virus genome: A mini review // Food systems. V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences, 2023. Т. 6, № 3. С. 283–287.
55. Dube S. и др. The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain // Virol. J. 2009. Т. 6. С. 120.
56. Retroviridae | ICTV [Электронный ресурс]. URL: https://ictv.global/report_9th/RT/Retroviridae (дата обращения: 12.04.2026).
57. I K. и др. Bovine leukemia virus matrix-associated protein MA(p15): further processing and formation of a specific complex with the dimer of the 5'-terminal genomic RNA fragment // J. Virol. J Virol, 1991. Т. 65, № 12. С. 6845–6855.
58. Katoh I., Yasunaga T., Yoshinaka Y. Bovine leukemia virus RNA sequences involved in dimerization and specific gag protein binding: close relation to the packaging sites of avian, murine, and human retroviruses // J. Virol. American Society for Microbiology, 1993. Т. 67, № 4. С. 1830.
59. Retroviridae | Basicmedical Key [Электронный ресурс]. URL: <https://basicmedicalkey.com/retroviridae/> (дата обращения: 12.04.2026).
60. Andreolla A. P. и др. Development of an indirect ELISA based on recombinant capsid protein to detect antibodies to bovine leukemia virus // Brazilian Journal of Microbiology. Elsevier Editora Ltda, 2018. Т. 49, № Suppl 1. С. 68.
61. Fló M. и др. Kinetics of Bovine leukemia virus aspartic protease reveals its dimerization and conformational change // PLoS One. Public Library of Science, 2022. Т. 17, № 7. С. e0271671.
62. Jácome R. и др. Structural Analysis of Monomeric RNA-Dependent Polymerases: Evolutionary and Therapeutic Implications // PLoS One. Public Library of Science, 2015. Т. 10, № 9. С. e0139001.
63. Pomier C. и др. Early and transient reverse transcription during primary deltaretroviral infection of sheep // Retrovirology. 2008. Т. 5. С. 16.

64. Pluta A. и др. Genetic Variability of Bovine Leukemia Virus: Evidence of Dual Infection, Recombination and Quasi-Species // Pathogens. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2024. Т. 13, № 2. С. 178.
65. Doucet F. и др. The Complexity of Bovine Leukemia Virus Oncogenesis // Viruses 2025, Vol. 17, Page 1609. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2025. Т. 17, № 12. С. 1609.
66. Pluta A. и др. Analysis of Nucleotide Sequence of Tax, miRNA and LTR of Bovine Leukemia Virus in Cattle with Different Levels of Persistent Lymphocytosis in Russia // Pathogens. Pathogens, 2021. Т. 10, № 2. С. 1–21.
67. Matsuura R. и др. Diversity of Integration Sites of Bovine Leukemia Virus (BLV) and Roles of Genes Related to Development of BLV-Induced Lymphoma in a Large Cohort // Int. J. Mol. Sci. MDPI AG, 2026. Т. 27, № 2. С. 727.
68. Kvaratskhelia M. и др. Molecular mechanisms of retroviral integration site selection // Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res, 2014. Т. 42, № 16. С. 10209–10225.
69. De Giuseppe A. и др. Expression of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein (gp51) by Recombinant Baculovirus and Its Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004. Т. 11, № 1. С. 147.
70. Tomé-Poderti L. и др. Characterization and application of recombinant Bovine Leukemia Virus Env protein // Sci. Rep. Sci Rep, 2024. Т. 14, № 1.
71. Zarkik S. и др. Comparative processing of bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp72 by subtilisin/kexin-like mammalian convertases // FEBS Lett. FEBS Lett, 1997. Т. 406, № 1–2. С. 205–210.
72. Olivero-Deibe N. и др. Expression, Purification, and Characterization of Bovine Leukemia Virus-Like Particles Produced in Drosophila S2 Cells // Frontiers in Virology. Frontiers Media SA, 2021. Т. 1. С. 756559.
73. Bai L. и др. CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection // FASEB J. FASEB J, 2019. Т. 33, № 12. С. 14516–14527.

74. Sato H. и др. Overexpression of bovine leukemia virus receptor SLC7A1/CAT1 enhances cellular susceptibility to BLV infection on luminescence syncytium induction assay (LuSIA) // *Virol. J. BioMed Central Ltd.*, 2020. Т. 17, № 1. С. 57.
75. Pluta A. и др. Computational analysis of envelope glycoproteins from diverse geographical isolates of bovine leukemia virus identifies highly conserved peptide motifs // *Retrovirology*. *Retrovirology*, 2018. Т. 15, № 1.
76. Bai L. и др. Mapping of CD4+ T-cell epitopes in bovine leukemia virus from five cattle with differential susceptibilities to bovine leukemia virus disease progression // *Virol. J. BioMed Central Ltd.*, 2019. Т. 16, № 1. С. 157.
77. Lo C. W. и др. BoLA-DRB3 Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load // *Viruses*. *MDPI AG*, 2020. Т. 12, № 3. С. 352.
78. Gatot J.-S. и др. Bovine leukemia virus SU protein interacts with zinc, and mutations within two interacting regions differently affect viral fusion and infectivity in vivo // *J. Virol. J Virol*, 2002. Т. 76, № 16. С. 7956–7967.
79. Bouzar A.-B. и др. Role of glycosylation in bovine leukemia virus infection // *Retrovirology*. *Springer Science and Business Media LLC*, 2011. Т. 8, № Suppl 1. С. A29.
80. Brogniez A. de и др. Mutation of a Single Envelope N-Linked Glycosylation Site Enhances the Pathogenicity of Bovine Leukemia Virus // *J. Virol. American Society for Microbiology*, 2015. Т. 89, № 17. С. 8945.
81. Inabe K. и др. The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions // *J. Virol. J Virol*, 1999. Т. 73, № 2. С. 1293–1301.
82. Arainga M., Takeda E., Aida Y. Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune

response pathway by microarray-based gene expression analysis // BMC Genomics. BMC Genomics, 2012. T. 13, № 1.

83. Pluta A. и др. Effects of Naturally Occurring Mutations in Bovine Leukemia Virus 5'-LTR and Tax Gene on Viral Transcriptional Activity // Pathogens 2020, Vol. 9, Page 836. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. T. 9, № 10. C. 836.

84. Sanduja S., Blanco F. F., Dixon D. A. The roles of TTP and BRF proteins in regulated mRNA decay // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2010. T. 2, № 1. C. 42.

85. Deleault K. M., Skinner S. J., Brooks S. A. Tristetraprolin regulates TNF TNF- α mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways // Mol. Immunol. Mol Immunol, 2008. T. 45, № 1. C. 13–24.

86. Choi E.-A., Hope T. J. Mutational analysis of bovine leukemia virus Rex: identification of a dominant-negative inhibitor // J. Virol. J Virol, 2005. T. 79, № 11. C. 7172–7181.

87. Lefèbvre L. и др. Subcellular Localization of the Bovine Leukemia Virus R3 and G4 Accessory Proteins // J. Virol. American Society for Microbiology, 2002. T. 76, № 15. C. 7843.

88. Rosewick N. и др. Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/lymphoma // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2013. T. 110, № 6. C. 2306–2311.

89. Gillet N. A. и др. Bovine Leukemia Virus Small Noncoding RNAs Are Functional Elements That Regulate Replication and Contribute to Oncogenesis In Vivo // PLoS Pathog. Public Library of Science, 2016. T. 12, № 4. C. e1005588.

90. Zyrianova I. M., Koval'chuk S. N. Bovine leukemia virus pre-miRNA genes' polymorphism // RNA Biol. Taylor and Francis Inc., 2018. T. 15, № 12. C. 1440–1447.

91. Burke J. M. и др. DUSP11 activity on triphosphorylated transcripts promotes Argonaute association with noncanonical viral microRNAs and regulates steady-state levels of cellular noncoding RNAs // *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2016. Т. 30, № 18. С. 2076–2092.
92. Frie M. C. и др. MicroRNAs encoded by Bovine leukemia virus (BLV) are associated with reduced expression of B cell transcriptional regulators in dairy cattle naturally infected with BLV // *Front. Vet. Sci.* Frontiers Media S.A., 2018. Т. 4, № JAN. С. 328368.
93. Pluta A. и др. Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences // *Virol. J.* Virol J, 2018. Т. 15, № 1.
94. Pluta A., Jaworski J. P., Douville R. N. Regulation of Expression and Latency in BLV and HTLV // *Viruses.* MDPI AG, 2020. Т. 12, № 10. С. 1079.
95. Merimi M. и др. Suppression of Viral Gene Expression in Bovine Leukemia Virus-Associated B-Cell Malignancy: Interplay of Epigenetic Modifications Leading to Chromatin with a Repressive Histone Code // *J. Virol.* American Society for Microbiology, 2007. Т. 81, № 11. С. 5929.
96. Zyrianova I. M., Kovalchuk S. N. Bovine leukemia virus tax gene/Tax protein polymorphism and its relation to Enzootic Bovine Leukosis // *Virulence.* Virulence, 2020. Т. 11, № 1. С. 80–87.
97. Marin-Flamand E. и др. Relationship of persistent lymphocytosis, antibody titers, and proviral load with expression of interleukin-12, interferon- γ , interleukin-2, interleukin-4, interleukin-10, and transforming growth factor- β in cows infected with bovine leukemia virus // *Canadian Journal of Veterinary Research.* Canadian Veterinary Medical Association, 2022. Т. 86, № 4. С. 269.
98. LaHuis C. H. и др. Identification of BoLA Alleles Associated with BLV Proviral Load in US Beef Cows // *Pathogens.* MDPI, 2022. Т. 11, № 10. С. 1093.

99. Sultanov A. и др. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan // Pathogens. Pathogens, 2022. Т. 11, № 2.
100. Dagnaw M. и др. Global distribution and host range of enzootic bovine leukosis in ruminants: A systematic review and meta-analysis // Vet. Anim. Sci. Elsevier, 2025. Т. 30. С. 100499.
101. Ladronka R. M. и др. Prevalence of Bovine Leukemia Virus Antibodies in US Dairy Cattle // Vet. Med. Int. Hindawi Limited, 2018. Т. 2018. С. 5831278.
102. Nekouei O. и др. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds // Prev. Vet. Med. Elsevier B.V., 2015. Т. 119, № 3–4. С. 105–113.
103. Pluta A. и др. Molecular characterization of bovine leukemia virus from Moldovan dairy cattle // Arch. Virol. Arch Virol, 2017. Т. 162, № 6. С. 1563–1576.
104. Korniienko L. Y. и др. Retrospective analysis of the epizootic situation of enzootic bovine leukosis in Ukraine in 1994–2019 // Regul. Mech. Biosyst. Oles Honchar Dnipro National University, 2020. Т. 11, № 3. С. 372–377.
105. Enzootic bovine leucosis | Business Queensland [Электронный ресурс]. URL: <https://www.business.qld.gov.au/industries/farms-fishing-forestry/agriculture/biosecurity/animals/diseases/guide/enzootic-bovine-leucosis> (дата обращения: 06.04.2026).
106. Polat M. и др. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis // Retrovirology. Retrovirology, 2016. Т. 13, № 1.
107. Murakami K. и др. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle // Vet. Microbiol. Vet Microbiol, 2011. Т. 148, № 1. С. 84–88.

108. Yu C. и др. Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China // BMC Vet. Res. BioMed Central Ltd., 2019. Т. 15, № 1. С. 179.
109. Suzuki A. и др. Phylogenetic Analysis of South African Bovine Leukaemia Virus (BLV) Isolates // Viruses 2020, Vol. 12, Page 898. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Т. 12, № 8. С. 898.
110. Donnik I. M. и др. Revisiting the Issue of the Molecular-genetic Structure of the Causative Agent of the Bovine Leukemia Virus in the Russian Federation // Indian J. Sci. Technol. The Indian Society of Education and Environment, 2016. Т. 9, № 42. С. 1–11.
111. Rola-Łuszczak M. и др. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny // PLoS One. PLoS One, 2013. Т. 8, № 3.
112. Rodriguez S. M. и др. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades // J. Gen. Virol. J Gen Virol, 2009. Т. 90, № Pt 11. С. 2788–2797.
113. Nishikaku K. и др. Phylogenomics and Spatiotemporal Dynamics of Bovine Leukemia Virus Focusing on Asian Native Cattle: Insights Into the Early Origin and Global Dissemination // Front. Microbiol. Frontiers Media S.A., 2022. Т. 13. С. 917324.
114. «bovine leukemia virus»[Organism] AND Russia [ALL] - Nucleotide - NCBI [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=%22bovine+leukemia+virus%22%5BOrganism%5D+AND+Russia%5BALL%5D> (дата обращения: 06.04.2026).
115. «bovine leukemia virus»[Organism] AND complete genome - Nucleotide - NCBI [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=%22bovine+leukemia+virus%22%5BOrganism%5D+AND+complete+genome> (дата обращения: 06.04.2026).

116. M. V. Petropavlovskiy и др. Limitations of the efficiency of PCR diagnostics of bovine leukemia virus in conditions of a real epizootic process // Agrarian Bulletin of the Urals. Urals State Agrarian University, 2025.

117. Журнал «Ветеринария Кубани»: Распространение лейкоза крупного рогатого скота и генетические варианты возбудителя на территории животноводческих хозяйств Центрального федерального округа Российской Федерации [Электронный ресурс]. URL: http://vetkuban.com/num6_201701.html (дата обращения: 08.04.2026).

118. Gulyukin M. I. и др. Genetic polymorphism of the bovine leukemia virus in the Russian federation // Russ. Agric. Sci. Allerton Press, 2016. Т. 42, № 6. С. 472–475.

119. Kozyreva N.G. G. M. I. Distribution of bovine leukemia and genetic variants of the pathogen on the territory of livestock farms in the Russian Federation [Электронный ресурс] // Veterinariya, Zootekhnika i Biotekhnologiya. 2017. URL: <https://novistem.ru/files/130720/02.pdf> (дата обращения: 08.04.2026).

120. Meat exports and imports in Russia [Электронный ресурс]. URL: https://tadviser.com/index.php/Article:Meat_exports_and_imports_in_Russia (дата обращения: 08.04.2026).

121. Zhao X., Buehring G. C. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: Possible effects of selection and escape // Virology. Virology, 2007. Т. 366, № 1. С. 150–165.

122. Inoue E. и др. L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus // Vet. Microbiol. Vet Microbiol, 2013. Т. 167, № 3–4. С. 364–371.

123. Blazhko N. V. и др. Association of haplotypes for SNPs in the LTR regions of bovine leukemia virus with hematological indices of cattle // Vavilovskii Zhurnal Genet. Selektcii. Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2019. Т. 23, № 3. С. 262–269.

124. Blazhko N. и др. Genotypes diversity of env gene of Bovine leukemia virus in Western Siberia // BMC Genet. BMC Genet, 2020. Т. 21, № Suppl 1.

125. Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 24.03.2021 № 156 · Официальное опубликование правовых актов [Электронный ресурс]. URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202104290036?index=15> (дата обращения: 13.04.2026).

126. Tamba M. и др. Overview of Control Programs for EU Non-regulated Cattle Diseases in Italy // Front. Vet. Sci. Frontiers Media S.A., 2021. Т. 8. С. 665607.

127. Khudhair Y. I. и др. Serological and molecular detection of bovine leukemia virus in cattle in Iraq // Emerg. Microbes Infect. Nature Publishing Group, 2016. Т. 5, № 6. С. e56.

128. Dolz G. и др. Evaluation of a Voluntary Control Program for the Detection of Bovine Leukemia Virus Antibodies Based on Agar Gel Immunodiffusion Test in Dairy Farms in Costa Rica // Open J. Vet. Med. Scientific Research Publishing, 2015. Т. 5, № 12. С. 229–233.

129. Choi K. Y., Liu R. B., Buehring G. C. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle // J. Virol. Methods. J Virol Methods, 2002. Т. 104, № 1. С. 33–39.

130. Simard C. и др. Agar gel immunodiffusion test for the detection of bovine leukemia virus antibodies: lack of trans-Atlantic standardization // Canadian Journal of Veterinary Research. 2000. Т. 64, № 2. С. 96.

131. Walsh R. B. и др. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of neosporosis and leukosis in lactating dairy cows // The Canadian Veterinary Journal. 2013. Т. 54, № 4. С. 347.

132. Nekouei O., Durocher J., Keefe G. Diagnostic performance of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect bovine leukemia virus antibodies in bulk-tank milk samples // The Canadian Veterinary Journal. Canadian Veterinary Medical Association, 2016. T. 57, № 7. С. 778.
133. Kuczewski A. и др. Short communication: Evaluation of 5 different ELISA for the detection of bovine leukemia virus antibodies // J. Dairy Sci. Elsevier, 2018. T. 101, № 3. С. 2433–2437.
134. Rusenova N., Chervenkov M., Sirakov I. Comparison Between Four Laboratory Tests for Routine Diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis // Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. Veteriner Fakultesi Dergisi, 2022. T. 28, № 1. С. 97–104.
135. Beier D. и др. Establishment of a new bovine leukosis virus producing cell line // J. Virol. Methods. 2004. T. 121, № 2. С. 239.
136. Resende C. F. и др. Indirect ELISA (iELISA) standardization for the diagnosis of bovine enzootic leukosis // Pesquisa Veterinaria Brasileira. Colegio Brasileiro de Patologia Animal, 2020. T. 40, № 12. С. 977–984.
137. Gulyukin M. I. и др. Выявление специфических антител классов G и M к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотках крови // Вопросы вирусологии. FBSI Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2019. T. 64, № 4. С. 173–177.
138. Erskine R. J. и др. Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin // Vet. Med. Int. 2011. T. 2011. С. 915747.
139. Sajiki Y. и др. Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load // J. Vet. Med. Sci. Japanese Society of Veterinary Science, 2017. T. 79, № 12. С. 2036.
140. Patel J. R. и др. Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control // Vaccine. 2012. T. 30, № 10. С. 1767.

141. Sargeant J. M. и др. Evaluation of a bulk-milk ELISA test for the classification of herd-level bovine leukemia virus status // *Prev. Vet. Med. Elsevier*, 1997. Т. 31, № 3–4. С. 223–230.
142. Nishimori A. и др. Direct polymerase chain reaction from blood and tissue samples for rapid diagnosis of bovine leukemia virus infection // *J. Vet. Med. Sci. Japanese Society of Veterinary Science*, 2016. Т. 78, № 5. С. 791.
143. Klintevall K. и др. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves // *Vet. Microbiol. Vet Microbiol*, 1994. Т. 42, № 2–3. С. 191–204.
144. Camargos M. F. и др. Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar gel immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection // *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP*, 2003. Т. 40, № 5.
145. Gorbunova M. E. и др. A New Approach to the Diagnosis of Enzootic Leukosis by Genetic Markers of Bovine Leukemia Virus. 2022. Т. 12. С. 4448–4462.
146. Kaltenboeck B., Wang C. Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics // *Adv. Clin. Chem.* 2006. Т. 40. С. 219.
147. Jaworski J. P. и др. Interlaboratory Comparison of Six Real-Time PCR Assays for Detection of Bovine Leukemia Virus Proviral DNA // *J. Clin. Microbiol. American Society for Microbiology*, 2018. Т. 56, № 7. С. e00304-18.
148. Heenemann K. и др. Development of a Bovine leukemia virus polymerase gene-based real-time polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene-based assay // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. SAGE Publications* Sage CA: Los Angeles, CA, 2012. Т. 24, № 4. С. 649–655.
149. Jimba M. и др. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm // *Retrovirology. BioMed Central Ltd.*, 2010. Т. 7, № 1. С. 91.

150. Fonseca Júnior A. A. и др. Evaluation of three different genomic regions for detection of bovine leukemia virus by real-time PCR // Brazilian Journal of Microbiology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021. Т. 52, № 4. С. 2483.
151. Jimba M. и др. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status // BMC Vet. Res. BMC Vet Res, 2012. Т. 8.
152. Quan P. L., Sauzade M., Brouzes E. dPCR: A Technology Review // Sensors (Basel). MDPI AG, 2018. Т. 18, № 4. С. 1271.
153. De Brun M. L. и др. Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus // J. Vet. Diagn. Invest. SAGE Publications Inc., 2022. Т. 34, № 3. С. 439.
154. Wu X. и др. Development of droplet digital PCR for quantification of bovine leukemia virus proviral load using unpurified genomic DNA // J. Virol. Methods. Elsevier, 2023. Т. 315. С. 114706.
155. Gregory L. и др. *Nested* polymerase chain reaction validated for sensitive detection of bovine leukemia virus in blood samples from brazilian cattle herds: comparison with conventional ELISA and agar gel immunodiffusion methods // Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo). Instituto Biológico, 2004. Т. 71, № 3. С. 303–308.
156. Rodríguez S. M. и др. Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV // Viruses. 2011. Т. 3, № 7. С. 1210.
157. Maunsell F., Donovan G. A. Biosecurity and Risk Management for Dairy Replacements // Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 2008. Т. 24, № 1. С. 155.
158. Hayashi T. и др. Cattle with the BoLA class II DRB3*0902 allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads // J. Vet. Med. Sci. Japanese Society of Veterinary Science, 2017. Т. 79, № 9. С. 1552.
159. Hamada R. и др. BoLA-DRB3 Polymorphism Associated with Bovine Leukemia Virus Infection and Proviral Load in Holstein Cattle in Egypt // Pathogens. Pathogens, 2023. Т. 12, № 12.

160. Aida Y. и др. A novel bovine leukemia virus peptide vaccine targeting susceptible cattle-Production by 3-D modelling and nanotechnology // *Retrovirology*. Springer Science and Business Media LLC, 2015. Т. 12, № Suppl 1. С. P48.
161. Abdala A. и др. BLV: lessons on vaccine development // *Retrovirology*. BioMed Central Ltd., 2019. Т. 16, № 1. С. 26.
162. Suárez Archilla G. и др. A safe and effective vaccine against bovine leukemia virus // *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*, 2022. Т. 13. С. 980514.
163. Gutiérrez G. и др. Vaccination against δ -retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm // *Viruses*. Viruses, 2014. Т. 6, № 6. С. 2416–2427.
164. Plotkin S. и др. The complexity and cost of vaccine manufacturing – An overview // *Vaccine*. Elsevier Ltd, 2017. Т. 35, № 33. С. 4064.
165. Sung H. и др. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *CA Cancer J. Clin.* American Cancer Society, 2021. Т. 71, № 3. С. 209–249.
166. McLaughlin-Drubin M. E., Munger K. Viruses associated with human cancer // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. Biochim Biophys Acta*, 2008. Т. 1782, № 3. С. 127–150.
167. Bautista J., Lopez-Cortes A. Oncogenic viruses rewire the epigenome in human cancer // *Front. Cell. Infect. Microbiol. Frontiers Media SA*, 2025. Т. 15. С. 1617198.
168. Gao A., Kouznetsova V. L., Tsigelny I. F. Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis // *Microb. Pathog. Academic Press*, 2020. Т. 149. С. 104417.
169. Saeedi-Moghaddam F., Mohammaditabar M., Mozhgani S. H. Bovine leukemia virus (BLV) and risk of breast cancer; a systematic review and meta-analysis // *Retrovirology*. Retrovirology, 2024. Т. 21, № 1.

170. Morales-Sánchez A., Fuentes-Pananá E. M. Human Viruses and Cancer // Viruses. MDPI AG, 2014. Т. 6, № 10. С. 4047.
171. Olaya-Galán N. N. и др. In vitro Susceptibility of Human Cell Lines Infection by Bovine Leukemia Virus // Front. Microbiol. Frontiers Media S.A., 2022. Т. 13. С. 793348.
172. Burny A. и др. Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer // Vet. Microbiol. 1988. Т. 17, № 3. С. 197–218.
173. Buehring G. C. и др. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue // Emerg. Infect. Dis. Emerg Infect Dis, 2014. Т. 20, № 5. С. 772–782.
174. Buehring G. C. и др. Bovine leukemia virus discovered in human blood // BMC Infect. Dis. BMC Infect Dis, 2019. Т. 19, № 1.
175. Buehring G. C. и др. Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study // PLoS One. Public Library of Science, 2015. Т. 10, № 9. С. e0134304.
176. Schwingel D. и др. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil // Scientific Reports 2019 9:1. Nature Publishing Group, 2019. Т. 9, № 1. С. 2949-.
177. Olaya-Galan N. N. и др. Risk factor for breast cancer development under exposure to bovine leukemia virus in Colombian women: A case-control study // PLoS One. Public Library of Science, 2021. Т. 16, № 9. С. e0257492.
178. Buehring G. C. и др. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development // PLoS One. PLoS One, 2017. Т. 12, № 6.
179. Baltzell K. A. и др. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas // Cancer. Cancer, 2018. Т. 124, № 7. С. 1342–1349.

180. Elmatbouly A. и др. Prevalence of Bovine leukemia virus in Egyptian women's breast cancer tissues // *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. Taylor & Francis, 2023. Т. 10, № 1. С. 824–834.
181. Blanco R., Quezada-Romegialli C., Muñoz J. P. Bovine Leukemia Virus and Human Breast Cancer: A Review of Clinical and Molecular Evidence. 2025.
182. Yu C. и др. Bovine leukemia virus: an emerging concern for zoonotic cross-species transmission // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* Frontiers Media SA, 2026. Т. 15. С. 1720247.
183. Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021г. 4; [Электронный ресурс]. URL: <https://www.stoma9.ru/sanpin-3-3686-21.html> (дата обращения: 18.04.2026).
184. Clark K. и др. GenBank // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2015. Т. 44, № Database issue. С. D67.
185. Okonechnikov K. и др. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. Oxford Academic, 2012. Т. 28, № 8. С. 1166–1167.
186. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11.
187. Huson D. H., Bryant D. The SplitsTree App: interactive analysis and visualization using phylogenetic trees and networks // *Nature Methods* 2024 21:10. Nature Publishing Group, 2024. Т. 21, № 10. С. 1773–1774.
188. Nguyen L. T. и др. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* Oxford University Press, 2014. Т. 32, № 1. С. 268.

189. Muhire B. M., Varsani A., Martin D. P. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation // PLoS One. Public Library of Science, 2014. Т. 9, № 9. С. e108277.
190. Waterhouse A. M. и др. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench // Bioinformatics. Oxford Academic, 2009. Т. 25, № 9. С. 1189–1191.
191. Kirkwood B. R., Sterne J. A. C. Essential Medical Statistics // Essential Medical Statistics. John Wiley & Sons, 2010. 420–422 с.
192. Приказ Минсельхозпрода РФ от 11.05.1999 N 359: СудАкт.ру [Электронный ресурс]. URL: <https://sudact.ru/law/prikaz-minselkhozproda-rf-ot-11051999-n-359/> (дата обращения: 18.04.2026).
193. Комитет по ветеринарии Республики Дагестан [Электронный ресурс]. URL: <https://dagvetkom.ru/index.php> (дата обращения: 18.04.2026).
194. Будулов Н. Р. Журнал «Ветеринария Кубани»: Оценка эпизоотической ситуации и оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота в республике Дагестан // Ветеринария Кубани. 2025. Т. 5.
195. Mikailov M. M. и др. Overview of animal infectious disease situation in the Republic of Dagestan in 2023 // Veterinary Science Today. FGI Federal Centre for Animal Health (FGI ARRIA), 2024. Т. 13, № 3. С. 255–260.
196. Гунашев Ш. А. и др. Динамика распространения лейкоза крупного рогатого скота в племенных хозяйствах Республики Дагестан // Ветеринария сегодня. FGI Federal Centre for Animal Health (FGI ARRIA), 2025. Т. 14, № 4. С. 344–352.
197. Yang Y. и др. Molecular characterization of bovine leukemia virus reveals existence of genotype 4 in Chinese dairy cattle // Virol. J. Virol J, 2019. Т. 16, № 1.

198. Wang H., Norris K. M., Mansky L. M. Involvement of the matrix and nucleocapsid domains of the bovine leukemia virus Gag polyprotein precursor in viral RNA packaging // J. Virol. J Virol, 2003. T. 77, № 17. C. 9431–9438.
199. Wang H., Norris K. M., Mansky L. M. Analysis of Bovine Leukemia Virus Gag Membrane Targeting and Late Domain Function // J. Virol. American Society for Microbiology, 2002. T. 76, № 16. C. 8485–8493.
200. Sun M. и др. Retrovirus-specific differences in matrix and nucleocapsid protein-nucleic acid interactions: Implications for genomic RNA packaging // J. Virol. American Society for Microbiology, 2014. T. 88, № 2. C. 1271–1280.
201. Qualley D. F. и др. Solution Conformation of Bovine Leukemia Virus Gag Suggests an Elongated Structure // J. Mol. Biol. Academic Press, 2019. T. 431, № 6. C. 1203–1216.
202. Mark-Danieli M. и др. Single Point Mutations in the Zinc Finger Motifs of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Alter RNA Binding Specificities of the Gag Protein and Enhance Packaging and Infectivity // J. Virol. American Society for Microbiology, 2005. T. 79, № 12. C. 7756.
203. Schmidt T., Situ A. J., Ulmer T. S. Structural and thermodynamic basis of proline-induced transmembrane complex stabilization // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2016. T. 6. C. 29809.
204. Eksmond U. и др. Mutation of the Putative Immunosuppressive Domain of the Retroviral Envelope Glycoprotein Compromises Infectivity // J. Virol. J Virol, 2017. T. 91, № 21.
205. Menéndez-Arias L. Mutation Rates and Intrinsic Fidelity of Retroviral Reverse Transcriptases // Viruses. 2009. T. 1, № 3. C. 1137.
206. Engelman A., Cherepanov P. Retroviral Integrase Structure and DNA Recombination Mechanism // Microbiol. Spectr. / под ред. Sandmeyer S., Craig N. 2014. T. 2, № 6. C. 1.

207. Willems L. и др. Mutations in the bovine leukemia virus Tax protein can abrogate the long terminal repeat-directed transactivating activity without concomitant loss of transforming potential // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. T. 89, № 9. С. 3957–3961.
208. Boxus M. и др. The HTLV-1 Tax interactome // Retrovirology. 2008. Т. 5. С. 76.
209. Rovnak J., Casey J. W. Assessment of Bovine Leukemia Virus Transcripts In Vivo // J. Virol. American Society for Microbiology, 1999. Т. 73, № 10. С. 8890.
210. Lefèbvre L. и др. Oncoviral Bovine Leukemia Virus G4 and Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 p13II Accessory Proteins Interact with Farnesyl Pyrophosphate Synthetase // J. Virol. American Society for Microbiology, 2002. Т. 76, № 3. С. 1400.
211. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics // Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, 1987.
212. Dong L. и др. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material // Scientific Reports 2015 5:1. Nature Publishing Group, 2015. Т. 5, № 1. С. 13174-.
213. Behl J. D. и др. The Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review // ISRN Vet. Sci. Hindawi Limited, 2012. Т. 2012. С. 872710.
214. Fukushi N. и др. Impact of BoLA-DRB3 Polymorphisms on Clonality of Bovine Leukaemia Virus-Infected Cells of Cattle With Lymphoma // HLA. 2026. Т. 107, № 2. С. e70561.
215. Notsu K. и др. Identifying Pathogen and Allele Type Simultaneously in a Single Well Using Droplet Digital PCR // mSphere. American Society for Microbiology, 2023. Т. 8, № 1. С. e00493-22.
216. Armbruster D. A., Pry T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation // Clin. Biochem. Rev. 2008. Т. 29, № Suppl 1. С. S49.

217. Han R. и др. The association of herd performance indicators with dairy cow longevity: An empirical study // PLoS One. Public Library of Science, 2022. Т. 17, № 12. С. e0278204.
218. Yang Y. и др. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score // J. Dairy Sci. Elsevier, 2016. Т. 99, № 5. С. 3688–3697.
219. Gulyukin A. и др. Epizootic situation with bovine leukemia in the Central Federal District of the Russian Federation in 2012–2016 // BIO Web Conf. EDP Sciences, 2020. Т. 27.
220. Ochirkhuu N. и др. Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle // Arch. Virol. Arch Virol, 2016. Т. 161, № 4. С. 985–991.
221. Ostrovskii A. и др. Development and application of a quantitative polymerase chain reaction assay for the detection and genotyping of bovine leukemia virus in cattle from Kazakhstan // Vet. World. Veterinary World, 2025. Т. 18, № 8. С. 2320.
222. Ruzina M. N. и др. Specific genetic features of the Russian forms of bovine leukemia virus // Genetika. Genetika, 2013. Т. 49, № 8. С. 975–980.
223. Stefanovich Abakin S. и др. Genotyping the Isolates of Bovine Leukemia Virus, Circulating In the Stavropol Territory.
224. Rola-Lsuszczak M. и др. Baculovirus Expression and Potential Diagnostic Application of the Gp51 Envelope Glycoprotein of Genetic Mutants of the Bovine Leukaemia Virus // J. Vet. Res. Sciendo, 2019. Т. 63, № 1. С. 1.
225. Wang H., Machesky N. J., Mansky L. M. Both the PPPY and PTAP Motifs Are Involved in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Particle Release // J. Virol. American Society for Microbiology, 2004. Т. 78, № 3. С. 1503.

226. Rayne F. и др. The NH₂-Terminal Domain of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Capsid Protein Is Involved in Particle Formation // J. Virol. American Society for Microbiology, 2001. Т. 75, № 11. С. 5277.
227. Herrmann D. и др. Structural Insights into the Mechanism of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Gag Targeting to the Plasma Membrane for Assembly // J. Mol. Biol. Academic Press, 2021. Т. 433, № 19.
228. Ali A. и др. Molecular Basis for Drug Resistance in HIV-1 Protease // Viruses. 2010. Т. 2, № 11. С. 2509.
229. Dunn B. M. и др. Retroviral proteases // Genome Biol. 2002. Т. 3, № 4. С. reviews3006.1.
230. Galiano L. и др. Drug pressure selected mutations in HIV-1 protease alter flap conformations // J. Am. Chem. Soc. J Am Chem Soc, 2009. Т. 131, № 2. С. 430–431.
231. Ramírez J. A., Nyborg J. K. Molecular characterization of HTLV-1 TAX interaction with the KIX domain of CBP/p300 // J. Mol. Biol. Academic Press, 2007. Т. 372, № 4. С. 958.
232. Farjami Z., Akbarin M. M. Exploitation of CREB signaling by HTLV-1 and BLV: A central axis in viral persistence and leukemogenesis // Med. Oncol. Springer, 2026. Т. 43, № 4. С. 164.
233. Chlichlia K. и др. Redox events in HTLV-1 Tax-induced apoptotic T-cell death // Antioxid. Redox Signal. Antioxid Redox Signal, 2002. Т. 4, № 3. С. 471–477.
234. Tajima S. и др. A Mutant Form of the Tax Protein of Bovine Leukemia Virus (BLV), with Enhanced Transactivation Activity, Increases Expression and Propagation of BLV In Vitro but Not In Vivo // J. Virol. American Society for Microbiology, 2003. Т. 77, № 3. С. 1894.
235. Tajima S., Aida Y. The Region between Amino Acids 245 and 265 of the Bovine Leukemia Virus (BLV) Tax Protein Restricts Transactivation Not Only via the

BLV Enhancer but Also via Other Retrovirus Enhancers // J. Virol. American Society for Microbiology, 2000. Т. 74, № 23. С. 10939.

236. Murakami H. и др. Bovine leukemia virus G4 enhances virus production // Virus Res. Elsevier B.V., 2017. Т. 238. С. 213–217.

237. Lairmore M. D. и др. Molecular Determinants of Human T-lymphotropic Virus Type 1 Transmission and Spread // Viruses. 2011. Т. 3, № 7. С. 1131.

238. Tajima S., Aida Y. Mutant Tax Protein from Bovine Leukemia Virus with Enhanced Ability To Activate the Expression of c-fos // J. Virol. American Society for Microbiology, 2002. Т. 76, № 5. С. 2557.

239. Barez P. Y. и др. Recent Advances in BLV Research // Viruses. MDPI AG, 2015. Т. 7, № 11. С. 6080.

240. Chevallier N. и др. Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphocytosis and Increased Cell Survival Mainly Involve the CD11b⁺ B-Lymphocyte Subset in Sheep // J. Virol. American Society for Microbiology, 1998. Т. 72, № 5. С. 4413.

241. Gillet N. A. и др. Massive Depletion of Bovine Leukemia Virus Proviral Clones Located in Genomic Transcriptionally Active Sites during Primary Infection // PLoS Pathog. 2013. Т. 9, № 10. С. e1003687.

242. Einsiedel L. и др. Human T-Lymphotropic Virus type 1c subtype proviral loads, chronic lung disease and survival in a prospective cohort of Indigenous Australians // PLoS Negl. Trop. Dis. PLoS Negl Trop Dis, 2018. Т. 12, № 3.

243. Shrestha S. и др. Removing bovine leukemia virus-infected animals with high proviral load leads to lower within-herd prevalence and new case reduction // J. Dairy Sci. J Dairy Sci, 2024. Т. 107, № 8. С. 6015–6024.

Приложения

Приложение А (обязательное)

Показатели идентичности по генотипам ВЛКРС

Таблица А.1– Показатели идентичности по генотипам ВЛКРС

Генотип из исследования	Сравниваемый генотип	Медиана идентичности, %	Минимальная идентичность, %	Максимальная идентичность, %
G4	G1	96.4	95.1	96.9
G4	G2	96.7	95.0	97.3
G4	G3	95.7	94.2	96.6
G4	G4	99.3	94.3	100.0
G4	G5	96.0	95.0	96.9
G4	G6	97.5	95.3	98.0
G4	G7	96.9	96.1	97.5
G4	G8	96.7	95.1	97.1
G4	G9	96.7	95.1	97.1
G4	G10	96.0	94.4	96.9
G4	G12	97.1	95.5	97.5
G7	G1	96.4	91.9	96.7
G7	G2	96.6	92.5	97.1
G7	G3	95.9	91.4	96.4
G7	G4	96.7	93.6	97.5
G7	G5	95.5	91.2	96.4
G7	G6	97.1	91.6	97.6
G7	G7	99.5	95.4	100.0
G7	G8	96.7	92.3	97.1
G7	G9	96.4	92.1	96.7
G7	G10	96.0	91.6	96.2
G7	G12	97.6	93.2	98.0

Приложение Б (справочное)

Список депонированных нуклеотидных последовательностей гена env ВЛКРС из международной базы GenBank

Таблица Б.2 – Список депонированных нуклеотидных последовательностей гена env ВЛКРС из международной базы GenBank

Номер	GenBank ID	Изолят	Регион	Генотип	Длина в п.н.
1	PX983326.1	01_Barabinsk	Барабинский район	4	804
2	PX983327.1	02_Barabinsk	Барабинский район	4	804
3	PX983328.1	04_Barabinsk	Барабинский район	4	804
4	PX983329.1	05_Barabinsk	Барабинский район	4	804
5	PX983330.1	06_Barabinsk	Барабинский район	4	804
6	PX983331.1	07_Barabinsk	Барабинский район	4	804
7	PX983332.1	08_Barabinsk	Барабинский район	4	804
8	PX983333.1	09_Barabinsk	Барабинский район	4	804
9	PX983334.1	10_Barabinsk	Барабинский район	4	804
10	PX983335.1	11_Barabinsk	Барабинский район	4	804
11	PX983336.1	12_Barabinsk	Барабинский район	4	804
12	PX983337.1	13_Barabinsk	Барабинский район	4	804
13	PX983339.1	14_Barabinsk	Барабинский район	4	804
14	PX983340.1	15_Barabinsk	Барабинский район	4	804
15	PX983341.1	16_Barabinsk	Барабинский район	4	804
16	PX983342.1	17_Barabinsk	Барабинский район	4	804
17	PX983343.1	18_Barabinsk	Барабинский район	4	804
18	PX983344.1	19_Barabinsk	Барабинский район	4	804
19	PX983345.1	20_Barabinsk	Барабинский район	4	804
20	PX983346.1	21_Barabinsk	Барабинский район	4	804
21	PX983347.1	22_Barabinsk	Барабинский район	4	804
22	PX983348.1	23_Barabinsk	Барабинский район	4	804
23	PX983349.1	24_Barabinsk	Барабинский район	4	804
24	PX983350.1	25_Barabinsk	Барабинский район	4	804
25	PX983351.1	26_Barabinsk	Барабинский район	7	804
26	PX983352.1	27_Barabinsk	Барабинский район	4	804
27	PX983353.1	28_Barabinsk	Барабинский район	4	804
28	PX983354.1	29_Barabinsk	Барабинский район	4	804
29	PX983355.1	30_Barabinsk	Барабинский район	4	804
30	PX983356.1	31_Barabinsk	Барабинский район	4	804
31	PX983357.1	32_Barabinsk	Барабинский район	4	804
32	PX983358.1	33_Barabinsk	Барабинский район	4	804
33	PX983359.1	35_Barabinsk	Барабинский район	4	804
34	ON799063.1	01_Bol	Болотнинский район	4	1038
35	ON799064.1	02_Bol	Болотнинский район	4	1167
36	ON799065.1	03_Bol	Болотнинский район	4	1208

Продолжение таблицы Б.2

37	ON799066.1	04_Bol	Болотнинский район	4	1094
38	ON799067.1	05_Bol	Болотнинский район	4	1207
39	ON799068.1	06_Bol	Болотнинский район	4	1126
40	ON799069.1	08_Bol	Болотнинский район	4	1155
41	ON799070.1	10_Bol	Болотнинский район	4	1126
42	PX983388.1	11_Bolotnoye	Болотнинский район	4	804
43	ON799071.1	12_Bol	Болотнинский район	4	896
44	ON799072.1	13_Bol	Болотнинский район	4	996
45	PX983389.1	14_Bolotnoye	Болотнинский район	4	804
46	PX983390.1	15_Bolotnoye	Болотнинский район	4	804
47	ON799073.1	16_Bol	Болотнинский район	4	1092
48	ON799074.1	17_Bol	Болотнинский район	4	1054
49	ON799075.1	20_Bol	Болотнинский район	4	985
50	ON799076.1	21_Bol	Болотнинский район	4	1069
51	ON799077.1	22_Bol	Болотнинский район	4	1111
52	ON799078.1	23_Bol	Болотнинский район	4	1096
53	ON799079.1	24_Bol	Болотнинский район	4	1116
54	ON799080.1	26_Bol	Болотнинский район	4	927
55	ON799081.1	27_Bol	Болотнинский район	4	1014
56	ON799082.1	28_Bol	Болотнинский район	4	1202
57	ON799083.1	30_Bol	Болотнинский район	4	1014
58	ON799084.1	31_Bol	Болотнинский район	4	1072
59	ON799085.1	32_Bol	Болотнинский район	4	1173
60	ON799086.1	33_Bol	Болотнинский район	4	1073
61	ON799087.1	34_Bol	Болотнинский район	4	1119
62	ON799088.1	35_Bol	Болотнинский район	4	1085
63	ON799089.1	37_Bol	Болотнинский район	4	1120
64	ON799090.1	38_Bol	Болотнинский район	4	1011
65	ON799091.1	39_Bol	Болотнинский район	4	1070
66	ON799092.1	41_Bol	Болотнинский район	4	909
67	ON799093.1	42_Bol	Болотнинский район	4	979
68	ON799094.1	43_Bol	Болотнинский район	4	1111
69	ON799095.1	45_Bol	Болотнинский район	4	1077
70	ON799096.1	48_Bol	Болотнинский район	4	995
71	ON799097.1	49_Bol	Болотнинский район	4	907
72	ON799098.1	50_Bol	Болотнинский район	4	1156
73	ON799099.1	51_Bol	Болотнинский район	4	878
74	ON799100.1	53_Bol	Болотнинский район	4	845
75	ON799101.1	54_Bol	Болотнинский район	4	902
76	ON799102.1	55_Bol	Болотнинский район	4	1141
77	ON799103.1	56_Bol	Болотнинский район	4	1073
78	ON799104.1	57_Bol	Болотнинский район	4	1080
79	ON799105.1	58_Bol	Болотнинский район	4	1145
80	ON799106.1	59_Bol	Болотнинский район	4	1126
81	ON799107.1	60_Bol	Болотнинский район	4	837

Продолжение таблицы Б.2

82	PX983394.1	9_Bolotnoye	Болотнинский район	4	804
83	OL660368.1	10_Koch	Коченевский район	4	1328
84	OL660339.1	10m_Koch	Коченевский район	4	1548
85	OL660369.1	14_Koch	Коченевский район	4	1379
86	OL660370.1	15_Koch	Коченевский район	4	1381
87	OL660371.1	16_Koch	Коченевский район	4	1315
88	OL660373.1	18_Koch	Коченевский район	4	1379
89	OL660374.1	19_Koch	Коченевский район	4	1350
90	OL660359.1	1_Koch	Коченевский район	4	1329
91	OL660336.1	1m_Koch	Коченевский район	4	1548
92	OL660361.1	2-4_Koch	Коченевский район	4	1322
93	OL660376.1	20_Koch	Коченевский район	4	1337
94	OL660340.1	20m_Koch	Коченевский район	4	1548
95	OL660377.1	21_Koch	Коченевский район	4	1336
96	OL660341.1	21m_Koch	Коченевский район	4	1548
97	OL660342.1	22m_Koch	Коченевский район	4	1548
98	OL660378.1	23_Koch	Коченевский район	4	1336
99	OL660343.1	25m_Koch	Коченевский район	4	1548
100	OL660379.1	27_Koch	Коченевский район	4	1335
101	OL660380.1	29_Koch	Коченевский район	4	1328
102	OL660381.1	30_Koch	Коченевский район	4	1293
103	OL660382.1	31_Koch	Коченевский район	4	1323
104	OL660383.1	32_Koch	Коченевский район	4	1400
105	OL660344.1	32m_Koch	Коченевский район	4	1548
106	OL660394.1	34_Koch	Коченевский район	7	1364
107	OL660355.1	34m_Koch	Коченевский район	7	1548
108	OL660395.1	35_Koch	Коченевский район	7	1353
109	OL660384.1	36_Koch	Коченевский район	4	1369
110	OL660345.1	36m_Koch	Коченевский район	4	1548
111	OL660385.1	37_Koch	Коченевский район	4	1341
112	OL660396.1	38_Koch	Коченевский район	7	1340
113	OL660356.1	38m_Koch	Коченевский район	7	1548
114	OL660397.1	39_Koch	Коченевский район	7	1342
115	OL660357.1	39m_Koch	Коченевский район	7	1548
116	OL660362.1	3_Koch	Коченевский район	4	1384
117	OL660386.1	40_Koch	Коченевский район	4	1346
118	OL660346.1	40m_Koch	Коченевский район	4	1548
119	OL660398.1	41_Koch	Коченевский район	7	1305
120	OL660387.1	44_Koch	Коченевский район	4	1317
121	OL660352.1	44i_Koch	Коченевский район	4	1548
122	OL660399.1	45_Koch	Коченевский район	7	1350
123	OL660353.1	45i_Koch	Коченевский район	4	1548
124	OL660400.1	49_Koch	Коченевский район	7	1363
125	OL660354.1	49i_Koch	Коченевский район	4	1548
126	OL660358.1	49m_Koch	Коченевский район	7	1548

Продолжение таблицы Б.2

127	OL660363.1	4_Koch	Коченевский район	4	1346
128	OL660388.1	50_Koch	Коченевский район	4	1363
129	OL660347.1	50m_Koch	Коченевский район	4	1548
130	OL660389.1	51_Koch	Коченевский район	4	1320
131	OL660390.1	52_Koch	Коченевский район	4	1335
132	OL660348.1	52m_Koch	Коченевский район	4	1548
133	OL660401.1	53_Koch	Коченевский район	7	1347
134	OL660391.1	54_Koch	Коченевский район	4	1333
135	OL660349.1	54m_Koch	Коченевский район	4	1548
136	OL660392.1	55_Koch	Коченевский район	4	1373
137	OL660350.1	55m_Koch	Коченевский район	4	1548
138	OL660393.1	57_Koch	Коченевский район	4	1207
139	OL660351.1	57m_Koch	Коченевский район	4	1548
140	OL660364.1	5_Koch	Коченевский район	4	1080
141	OL660366.1	7_Koch	Коченевский район	4	1336
142	OL660337.1	7m_Koch	Коченевский район	4	1548
143	OL660367.1	8_Koch	Коченевский район	4	1362
144	OL660338.1	8m_Koch	Коченевский район	4	1548
145	PX983421.1	Kochenevo1	Коченевский район	4	804
146	PX983422.1	Kochenevo10M	Коченевский район	7	804
147	PX983395.1	Kochenevo11M	Коченевский район	4	804
148	PX983423.1	Kochenevo13M	Коченевский район	4	804
149	PX983424.1	Kochenevo14	Коченевский район	7	804
150	PX983425.1	Kochenevo15	Коченевский район	4	804
151	PX983426.1	Kochenevo18	Коченевский район	4	804
152	PX983396.1	Kochenevo18M	Коченевский район	4	804
153	PX983397.1	Kochenevo1N	Коченевский район	4	804
154	PX983398.1	Kochenevo20	Коченевский район	4	804
155	PX983399.1	Kochenevo21	Коченевский район	4	804
156	PX983400.1	Kochenevo23	Коченевский район	4	804
157	PX983401.1	Kochenevo25	Коченевский район	7	804
158	PX983402.1	Kochenevo26	Коченевский район	7	804
159	PX983403.1	Kochenevo27	Коченевский район	7	804
160	PX983404.1	Kochenevo2M	Коченевский район	4	804
161	PX983405.1	Kochenevo2_1N	Коченевский район	4	804
162	PX983407.1	Kochenevo30	Коченевский район	4	804
163	PX983427.1	Kochenevo33	Коченевский район	4	804
164	PX983408.1	Kochenevo35	Коченевский район	4	804
165	PX983409.1	Kochenevo36	Коченевский район	4	804
166	PX983428.1	Kochenevo38I	Коченевский район	4	804
167	PX983410.1	Kochenevo3N	Коченевский район	7	804
168	PX983429.1	Kochenevo3t	Коченевский район	4	804
169	PX983430.1	Kochenevo3zv	Коченевский район	4	804
170	PX983431.1	Kochenevo40	Коченевский район	4	804
171	PX983411.1	Kochenevo43	Коченевский район	4	804

Продолжение таблицы Б.2

172	PX983412.1	Kochenevo44Izv	Коченевский район	7	804
173	PX983432.1	Kochenevo45I	Коченевский район	7	804
174	PX983413.1	Kochenevo47	Коченевский район	4	804
175	PX983433.1	Kochenevo49I	Коченевский район	4	804
176	PX983414.1	Kochenevo4_1N	Коченевский район	4	804
177	PX983415.1	Kochenevo5M	Коченевский район	7	804
178	PX983416.1	Kochenevo5_1N	Коченевский район	7	804
179	PX983417.1	Kochenevo6	Коченевский район	4	804
180	PX983418.1	Kochenevo6N	Коченевский район	7	804
181	PX983436.1	Kochenevo6zv	Коченевский район	4	804
182	PX983437.1	Kochenevo7	Коченевский район	4	804
183	PX983438.1	Kochenevo7zv	Коченевский район	4	804
184	PX983439.1	Kochenevo8	Коченевский район	4	804
185	PX983440.1	Kochenevo8t	Коченевский район	4	804
186	PX983441.1	Kochenevo9	Коченевский район	4	804
187	PX983420.1	KochenevoNN1	Коченевский район	4	804
188	OL660264.1	100_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1137
189	OL660265.1	101_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1149
190	OL660266.1	102_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1209
191	OL660267.1	103_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	883
192	OL660268.1	104_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1135
193	OL660269.1	107_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1101
194	OL660323.1	108_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	962
195	OL660324.1	110_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1163
196	OL660325.1	112_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1185
197	OL660270.1	114_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1108
198	OL660271.1	115_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1206
199	OL660272.1	116_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1149
200	OL660273.1	117_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1203
201	OL660274.1	118_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1201
202	OL660275.1	119_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1209
203	OL660276.1	122_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1202
204	OL660326.1	126_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1115
205	OL660277.1	131_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1184
206	OL660278.1	134_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1208
207	OL660279.1	135_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	919
208	OL660327.1	136_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1093
209	OL660280.1	138_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1109
210	OL660281.1	139_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1098
211	OL660226.1	13_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	928
212	OL660282.1	140_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	846
213	OL660283.1	141_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1182
214	OL660284.1	142_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1148
215	OL660285.1	143_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1195
216	OL660286.1	144_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1105

Продолжение таблицы Б.2

217	OL660328.1	147_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1200
218	OL660287.1	148_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1149
219	OL660329.1	151_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1201
220	OL660288.1	155_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1124
221	OL660289.1	156_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1097
222	OL660290.1	158_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1105
223	OL660330.1	159_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1149
224	OL660318.1	15_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	983
225	OL660291.1	161_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1117
226	OL660292.1	162_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1112
227	OL660331.1	163_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1115
228	OL660293.1	164_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1149
229	OL660294.1	165_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1049
230	OL660295.1	166_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1085
231	OL660296.1	167_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1132
232	OL660297.1	168_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1114
233	OL660332.1	169_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1113
234	OL660227.1	16_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	990
235	OL660298.1	172_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1099
236	OL660299.1	174_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1097
237	OL660300.1	175_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1101
238	OL660301.1	176_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1131
239	OL660302.1	179_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1097
240	OL660228.1	17_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1013
241	OL660303.1	180_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1096
242	OL660304.1	181_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1209
243	OL660305.1	182_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1087
244	OL660306.1	184_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1086
245	OL660307.1	185_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1032
246	OL660308.1	186_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1166
247	OL660309.1	189_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1119
248	OL660310.1	190_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1132
249	OL660311.1	191_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1132
250	OL660333.1	192_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1177
251	OL660312.1	193_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1086
252	OL660334.1	194_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	894
253	OL660313.1	195_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1120
254	OL660314.1	196_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	972
255	OL660335.1	197_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1150
256	OL660315.1	199_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1146
257	OL660229.1	19_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	804
258	OL660221.1	1_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	964
259	OL660230.1	20_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	952
260	OL660231.1	22_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	977
261	OL660232.1	33_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1046

Продолжение таблицы Б.2

262	OL660234.1	44_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1096
263	OL660235.1	45_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	981
264	OL660236.1	47_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1064
265	OL660237.1	48_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	996
266	OL660238.1	49_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1102
267	OL660239.1	50_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1115
268	OL660240.1	53_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	989
269	OL660241.1	59_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	961
270	OL660319.1	61_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1000
271	OL660242.1	64_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1093
272	OL660243.1	67_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1047
273	OL660244.1	68_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	962
274	OL660245.1	71_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	897
275	OL660320.1	72_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1069
276	OL660246.1	73_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	938
277	OL660247.1	74_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1039
278	OL660248.1	75_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1049
279	OL660249.1	76_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1029
280	OL660321.1	77_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	983
281	OL660250.1	80_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1068
282	OL660251.1	82_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1099
283	OL660252.1	83_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1006
284	OL660253.1	85_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1000
285	OL660254.1	87_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1097
286	OL660255.1	89_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1045
287	OL660256.1	90_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	979
288	OL660257.1	91_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1077
289	OL660322.1	93_Razd	Коченевский район/Раздольное	7	1071
290	OL660258.1	94_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	995
291	OL660259.1	95_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	861
292	OL660260.1	96_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1119
293	OL660261.1	97_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1195
294	OL660262.1	98_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1091
295	OL660263.1	99_Razd	Коченевский район/Раздольное	4	1064
296	PX983371.1	Dovolnoe1071	Коченевский район/Раздольное	4	804
297	PX983372.1	Dovolnoe1125	Коченевский район/Раздольное	4	804
298	PX983373.1	Dovolnoe137	Коченевский район/Раздольное	4	804
299	PX983374.1	Dovolnoe152	Коченевский район/Раздольное	4	804
300	PX983375.1	Dovolnoe1777	Коченевский район/Раздольное	4	804
301	PX983376.1	Dovolnoe1791	Коченевский район/Раздольное	4	804
302	PX983377.1	Dovolnoe192	Коченевский район/Раздольное	4	804
303	PX983378.1	Dovolnoe2057	Коченевский район/Раздольное	4	804
304	PX983379.1	Dovolnoe2057_2	Коченевский район/Раздольное	7	804
305	PX983380.1	Dovolnoe2057_3	Коченевский район/Раздольное	4	804
306	PX983381.1	Dovolnoe210	Коченевский район/Раздольное	4	804

Продолжение таблицы Б.2

307	PX983382.1	Dovolnoe37	Коченевский район/Раздольное	4	804
308	PX983383.1	Dovolnoe39	Коченевский район/Раздольное	7	804
309	PX983384.1	Dovolnoe49	Коченевский район/Раздольное	4	804
310	PX983385.1	Dovolnoe641	Коченевский район/Раздольное	4	804
311	PX983386.1	Dovolnoe790	Коченевский район/Раздольное	7	804
312	PX983387.1	Dovolnoe810	Коченевский район/Раздольное	4	804
313	PX983360.1	Tatarsk1	Татарский район	7	804
314	OP850709.1	Tatarsk10	Татарский район	4	1116
315	OP850710.1	Tatarsk11	Татарский район	4	995
316	OP850711.1	Tatarsk12	Татарский район	4	1038
317	OP850712.1	Tatarsk13	Татарский район	4	1097
318	OP850713.1	Tatarsk14	Татарский район	7	925
319	OP850714.1	Tatarsk15	Татарский район	4	1145
320	OP850715.1	Tatarsk16	Татарский район	7	927
321	OP850716.1	Tatarsk17	Татарский район	7	1047
322	OP850717.1	Tatarsk19	Татарский район	4	1120
323	PX983362.1	Tatarsk2	Татарский район	4	804
324	OP850718.1	Tatarsk20	Татарский район	7	1008
325	OP850719.1	Tatarsk21	Татарский район	4	1038
326	OP850720.1	Tatarsk22	Татарский район	4	1034
327	OP850721.1	Tatarsk23	Татарский район	7	1004
328	OP850722.1	Tatarsk24	Татарский район	4	1093
329	PX983361.1	Tatarsk25	Татарский район	4	804
330	OP850723.1	Tatarsk26	Татарский район	4	975
331	OP850724.1	Tatarsk27	Татарский район	7	1043
332	OP850725.1	Tatarsk29	Татарский район	7	1055
333	OP850726.1	Tatarsk30	Татарский район	4	1037
334	OP850727.1	Tatarsk31	Татарский район	7	1074
335	PX983363.1	Tatarsk31	Татарский район	7	804
336	OP850728.1	Tatarsk32	Татарский район	4	1116
337	OP850729.1	Tatarsk33	Татарский район	4	1033
338	OP850730.1	Tatarsk34	Татарский район	4	878
339	PX983364.1	Tatarsk34	Татарский район	4	804
340	OP850731.1	Tatarsk35	Татарский район	4	1050
341	OP850732.1	Tatarsk37	Татарский район	7	979
342	OP850733.1	Tatarsk38	Татарский район	7	953
343	OP850734.1	Tatarsk39	Татарский район	4	1116
344	OP850704.1	Tatarsk4	Татарский район	4	1048
345	OP850735.1	Tatarsk41	Татарский район	4	1025
346	OP850736.1	Tatarsk42	Татарский район	4	1037
347	OP850737.1	Tatarsk43	Татарский район	4	985
348	OP850738.1	Tatarsk44	Татарский район	7	1065
349	OP850739.1	Tatarsk45	Татарский район	4	1045
350	OP850740.1	Tatarsk47	Татарский район	4	1026
351	OP850741.1	Tatarsk48	Татарский район	4	1072

Продолжение таблицы Б.2

352	OP850742.1	Tatarsk49	Татарский район	7	1026
353	OP850705.1	Tatarsk5	Татарский район	4	1093
354	OP850743.1	Tatarsk50	Татарский район	7	1026
355	OP850744.1	Tatarsk51	Татарский район	4	972
356	OP850745.1	Tatarsk52	Татарский район	4	1198
357	OP850746.1	Tatarsk53	Татарский район	4	947
358	PX983365.1	Tatarsk53	Татарский район	4	804
359	OP850747.1	Tatarsk54	Татарский район	4	1110
360	OP850748.1	Tatarsk55	Татарский район	4	1127
361	OP850749.1	Tatarsk56	Татарский район	4	1165
362	OP850750.1	Tatarsk57	Татарский район	4	1159
363	OP850751.1	Tatarsk58	Татарский район	4	1121
364	OP850752.1	Tatarsk59	Татарский район	4	1094
365	OP850706.1	Tatarsk6	Татарский район	7	1032
366	OP850753.1	Tatarsk60	Татарский район	4	1145
367	OP850707.1	Tatarsk8	Татарский район	4	1101
368	OP850708.1	Tatarsk9	Татарский район	7	1135
369	OP850754.1	Toguchin1	Тогучинский район	7	1187
370	OP850760.1	Toguchin10	Тогучинский район	7	1126
371	OP850761.1	Toguchin11	Тогучинский район	4	1143
372	OP850762.1	Toguchin12	Тогучинский район	7	1202
373	OP850763.1	Toguchin13	Тогучинский район	7	1151
374	OP850764.1	Toguchin14	Тогучинский район	4	1102
375	OP850765.1	Toguchin15	Тогучинский район	4	1134
376	OP850766.1	Toguchin16	Тогучинский район	7	1097
377	PX983367.1	Toguchin17	Тогучинский район	7	804
378	OP850767.1	Toguchin18	Тогучинский район	7	1150
379	OP850768.1	Toguchin19	Тогучинский район	7	1150
380	OP850755.1	Toguchin2	Тогучинский район	7	1126
381	OP850769.1	Toguchin20	Тогучинский район	7	1124
382	OP850770.1	Toguchin21	Тогучинский район	7	1150
383	OP850771.1	Toguchin22	Тогучинский район	7	1199
384	OP850772.1	Toguchin23	Тогучинский район	7	1205
385	OP850773.1	Toguchin24	Тогучинский район	7	1127
386	PX983368.1	Toguchin25	Тогучинский район	4	804
387	OP850774.1	Toguchin26	Тогучинский район	7	1179
388	OP850775.1	Toguchin28	Тогучинский район	7	1199
389	OP850776.1	Toguchin29	Тогучинский район	4	1141
390	OP850777.1	Toguchin30	Тогучинский район	7	1103
391	OP850778.1	Toguchin31	Тогучинский район	7	698
392	PX983366.1	Toguchin31	Тогучинский район	4	804
393	OP850779.1	Toguchin32	Тогучинский район	7	1089
394	OP850780.1	Toguchin33	Тогучинский район	7	1037
395	OP850781.1	Toguchin35	Тогучинский район	7	985
396	OP850782.1	Toguchin39	Тогучинский район	7	1163

Окончание таблицы Б.2

397	ОР850756.1	Toguchin4	Тогучинский район	7	1163
398	ОР850783.1	Toguchin40	Тогучинский район	4	1079
399	ОР850784.1	Toguchin42	Тогучинский район	7	1070
400	ОР850785.1	Toguchin43	Тогучинский район	7	1045
401	ОР850786.1	Toguchin44	Тогучинский район	7	902
402	ОР850787.1	Toguchin45	Тогучинский район	7	1091
403	ОР850788.1	Toguchin46	Тогучинский район	7	1068
404	ОР850789.1	Toguchin47	Тогучинский район	7	1037
405	ОР850790.1	Toguchin49	Тогучинский район	4	1053
406	PX983369.1	Toguchin5	Тогучинский район	4	804
407	ОР850791.1	Toguchin50	Тогучинский район	7	1024
408	ОР850792.1	Toguchin51	Тогучинский район	7	985
409	ОР850793.1	Toguchin52	Тогучинский район	7	1069
410	ОР850794.1	Toguchin53	Тогучинский район	7	1028
411	ОР850795.1	Toguchin55	Тогучинский район	4	1032
412	ОР850796.1	Toguchin56	Тогучинский район	7	1019
413	ОР850797.1	Toguchin57	Тогучинский район	7	1004
414	PX983370.1	Toguchin6	Тогучинский район	4	804
415	ОР850757.1	Toguchin7	Тогучинский район	7	1114
416	ОР850758.1	Toguchin8	Тогучинский район	4	1180
417	ОР850759.1	Toguchin9	Тогучинский район	4	1145