

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЭНЗООТИЧЕСКОГО ЛЕЙКОЗА У МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Н. В. БАБАХИНА

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026*

(Поступила в редакцию 07.02.2022)

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота – хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы, которая протекает бессимптомно или проявляется лимфоцитозом и злокачественными новообразованиями в кроветворных и других органах и тканях. В сыворотке крови телят до 6 мес. возраста, полученных от коров неблагополучного по энзоотическому лейкозу стада, постоянно обнаруживаются колостральные специфические антитела. В связи с этим существующие в настоящее время методы диагностики (ИФА) не пригодны для обнаружения антигена у телят этой возрастной группы. Полимеразно-цепная реакция дает возможность раннего выявления инфицированных животных и удаления их из стада, что особенно актуально при выращивании быков на элеверах.

Ключевые слова: *полимеразно-цепная реакция, иммуноферментный анализ, сыворотка крови, энзоотический лейкоз крупного рогатого скота.*

Enzootic bovine leukemia is a chronic infectious disease of a tumor nature that is asymptomatic or manifests itself as lymphocytosis and malignant neoplasms in hematopoietic and other organs and tissues. In the blood serum of calves up to 6 months of age, obtained from cows of a herd disadvantaged for enzootic leukemia, colostral specific antibodies are constantly detected. In this regard, the currently existing diagnostic methods (ELISA) are not suitable for antigen detection in calves of this age group. The polymerase chain reaction makes it possible to detect infected animals early and remove them from the herd, which is especially important when growing bulls on elevers.

Key words: *polymerase chain reaction, enzyme immunoassay, blood serum, enzootic bovine leukemia.*

Введение. На всех этапах развития нашей страны увеличение производства молока, мяса и других продуктов питания было и остается одной из главных задач работников агропромышленного комплекса Республики Беларусь. Одной из ведущих отраслей животноводства в Республике Беларусь является скотоводство. Поэтому увеличение численности здорового и высокопродуктивного скота является первостепенной задачей ветеринарной службы нашей страны. Наиболее актуальными среди инфекционных болезней крупного рогатого скота, со-

провожающимися высоким экономическим ущербом являются энзоотический лейкоз, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея.

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота (ЭЛ КРС) – хроническая вирусная инфекционная болезнь, протекающая чаще бессимптомно, с развитием необратимого инфекционного процесса, проявляющегося персистентным (*persistens* – сохранившимся, оставленным) лимфоцитозом, злокачественным разрастанием кроветворных и лимфоидных клеток с нарушением их способности к морфологической дифференцировке и физиологическому созреванию, с последующей диффузной инфильтрацией органов этими клетками или образованием опухолей [3, 4, 5].

Возбудителем лейкоза крупного рогатого скота является экзогенный вирус, относящийся к семейству *Retroviridae* роду *Deltaretrovirus* (ВЛ КРС). Это такие вирусы, с РНК в качестве их генетического материала и имеющие промежуточную стадию жизненного цикла в виде ДНК в цикле репликации. Ретровирусы имеют одноцепочечный РНК-геном но, обратная транскриптаза, вирусный белок поставляемый самим вирусом, после распаковки вирусной частицы, конвертирует вирусную РНК в комплементарную цепь ДНК, которая после синтеза второй ДНК цепи превращается в двуцепочечную молекулу вирусной ДНК. После этого ДНК интегрируется в геном хозяина используя вирусный белок интегразу, экспрессия закодированных генов может приводить к формированию новых вирионов.

Клетками-мишенями для ВЛКРС являются В-лимфоциты с поверхностными иммуноглобулинами IgM, белком главного комплекса гистосовместимости класса II, а также с маркерами, но только в В-лимфоцитах происходит транскрипция провирусной ДНК. Встретив В-лимфоцит, вирионы связываются со специфическими рецепторами этой клетки и путем виропексиса попадают в ее цитоплазму, где происходит разрушение внешней мембраны вируса и освобождение его генома из капсида. Одна молекула вирусной РНК служит матрицей для синтеза вирусных белков – структурных и энзиматических (обратная транскриптаза, протеаза и интегразы). Вторая геномная РНК становится матрицей для синтеза ДНК, которая проникает в ядро клетки и встраивает вирусную ДНК в геном клетки, возникает новая форма существования вируса – провирус ВЛ КРС.

Когда провирус оказывается в активной зоне хромосомы, он может начать функционировать сразу, если в «молчашей» – то длительное

время может себя не проявлять. Это зависит от многих факторов в конкретной клетке и в соответствующей фазе ее развития.

Очевидный парадокс данной инфекции состоит в том, что лейкомогенез протекает в отсутствие вирусной экспрессии. Лейкомогенез характеризуется длительной хронической болезнью, сопровождающейся аккумуляцией генетических модификаций в геноме клеток хозяина. Наиболее общие из них – приобретение дополнительных мелких хромосом, трисом, транслокаций и изохромосомных преобразований. Считается, что существенные изменения генома хозяина происходят в клетках, активно экспрессирующих вирионы, что обеспечивают селективный рост именно таких трансформированных клеток, приводя их к образованию злокачественных опухолей.

ВЛ КРС обладает тремя способами распространения в организме:

- 1) путем репродукции вируса – вирусемией;
- 2) путем митоза клеток со встроенной в их геном вирусной ДНК, синтезированной на матрице геномной РНК ВЛ КРС, т. е. клональной экспансией;
- 3) с помощью циркулирующей в крови внеклеточной провирусной ДНК в виде иммунного комплекса.

В патогенезе лейкоза крупного рогатого скота важное значение имеет образование циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Они образуются в биологических жидкостях организма или на поверхности клеток в виде комплекса «антиген-антитело». Иммунные комплексы в сыворотке крови животных могут формироваться из любых классов или подклассов иммуноглобулинов, свойства которых определяют биологические свойства комплексов. Антитела при лейкозном процессе могут оказывать иммуносупрессивное действие как сами по себе, так и в комбинации с опухолевыми и вирусными антигенами в составе иммунных комплексов. Связывание вирусов с антителами, лишенными нейтрализующей активности, имеет одно необычное патологическое следствие: эти иммунные комплексы поглощаются макрофагами, в которых вирус восстанавливает свою вирулентность, что и является одной из причин рецидивов ЭЛ КРС в ранее оздоровленных хозяйствах.

Устойчивость телят, вскормленных инфицированными ВЛ КРС козками, в течение первых месяцев жизни обусловлена, вероятно, материнскими вируснейтрализующими антителами, которые приобретают все телята, получающие молозиво. Но если теленок заразился вирусом во внутриутробный период, то колостральные антитела не влияют на

персистенцию вируса. В последствии материнские антитела исчезают в течение 4–6 мес после рождения.

В сперме инфицированных быков вирус отсутствует. Однако у быков с воспалением генитального тракта (баланопостит) в сперму добавляются лимфоциты, инфицированные ВЛ КРС. Экспериментально установлено, что коров можно инфицировать путем нанесения таких лимфоцитов на слизистую оболочку матки [1, 6].

Поэтому, исходя из особенностей патогенеза, энзоотический лейкоз крупного рогатого скота регистрируется во многих странах мира. Высокий уровень инфицированности животных вирусом ЭЛ КРС установлен в отдельных регионах России и других странах СНГ. В некоторых странах мира ситуация по ЭЛКРС остается неизвестной, так как они не предоставляют соответствующую информацию в МЭБ.

Возникновение ЭЛ КРС ставит под угрозу сохранение племенных качеств животных, ведение селекционно-племенной работы, а также продажу и обмен животными и продуктами животного происхождения. Экономический ущерб от этой болезни складывается из потерь, связанных с выбраковкой инфицированных вирусом лейкоза животных, недополучением мясной и молочной продукции, ограничениями в экспорте крупного рогатого скота и продуктов его убоя, а также затрат на утилизацию туш, проведение диагностических исследований и комплекса мероприятий по профилактике и ликвидации болезни.

В 80-е годы прошлого столетия ЭЛ КРС регистрировался в 98 % хозяйств республики. Для диагностики болезни использовали гематологический метод, который базировался на выявлении у животных персистентного (сохранившегося) лимфоцитоза.

Внедрение в ветеринарную практику метода серологического исследования – реакции иммунодиффузии (РИД), как более совершенного, в то время метода диагностики ЭЛКРС, дающего возможность выявлять инфицированных животных уже на стадии антителообразования, а в систему мероприятий по профилактике и ликвидации болезни – проведение диагностических исследований в 6, 12, 18 и 24 мес. возрасте и удаления из стада реагирующих в РИД животных, позволило относительно стабилизировать в стране ситуацию по ЭЛ КРС. На начальном этапе проведения таких мероприятий в стране ежегодно выявлялось и подвергалось убою до 50 000 инфицированного крупного рогатого скота. Инфицированность крупного рогатого скота к 2010 году снизилась с 19,6 % до 0,01–0,02 %. В связи с трудоемкостью

постановки и интерпретацией результатов РИД в нашей республике широко стали использовать иммуноферментный анализ (ИФА) [3].

В 2010 году были «унифицированы» ветеринарно-санитарные правила профилактики и ликвидации ЭЛ КРС, которые исключили исследования в неблагополучных по этой патологии хозяйствах животных в 6-месячном возрасте. В результате ситуация по ЭЛ КРС в республике ухудшилась. В отдельных хозяйствах инфицированность крупного рогатого скота составила более 25 %, а на племпредприятиях стали выявляться инфицированные вирусом лейкоза крупного рогатого скота быки-производители (один бык дает до 50 000 доз спермы в год, которая может быть контаминирована вирусом ЭЛ КРС). А с 2018 года согласно ветеринарно-санитарным правилам в благополучных хозяйствах исследования животных начинаются лишь в 24-месячном возрасте. Таким образом, в настоящее время ЭЛ КРС в РБ может получить широкое распространение и нанести значительный экономический ущерб животноводству. Используемые методы диагностики ЭЛ КРС в РБ не дают возможность со 100 % вероятностью выявлять инфицированных животных в инкубационную стадию развития инфекционного процесса. Необходимость совершенствования диагностики и системы профилактики и ликвидации ЭЛ КРС объясняется и социальной значимостью болезни. В последние годы получен ряд научных доказательств об опасности вируса ЭЛ КРС для человека.

Большой интерес представляют проблемы потенциальной опасности для человека продуктов питания от животных из стад, неблагополучных по ЭЛ КРС, влияния вредных метаболитов, накапливающихся в организме больных коров, на организм человека, а также использование животных для получения биопрепаратов. Установлено, что молоко и мясо больных лейкозом животных содержат метаболиты триптофана и других циклических аминокислот, потенциально опасных для человека. При производстве молочных продуктов используются различные режимы пастеризации. Так, при производстве сметаны, масла, кисломолочных напитков, йогуртов чаще всего применяют пастеризацию при 85–87 °С с выдержкой 5–7 мин или 90–95 °С с выдержкой 2–3 мин. Однако при производстве сыров такие температурные режимы пастеризации не приемлемы, так как ухудшают способность молока к сычужному свертыванию. В сыроделии используется режим – 72 °С с выдержкой 15 с, что может быть недостаточно для инактивации ВЛКРС.

Применение эффективных способов выявления и борьбы с лейкозом крупного рогатого скота на самой ранней стадии развития инфекционного процесса является одной из важнейших задач не только ветеринарной медицины, животноводства, но и биологии, и экологии в целом, имеющих непосредственное отношение к безопасности здоровья человека) [4, 5].

Основная часть. Исследования проводились в условиях аккредитованной лаборатории ПЦР-диагностики, АРТ БиоТех. г. Минск, Республика Беларусь. Материалом для исследования явилась стабилизированная кровь от 128 телят в возрасте 20–100 дн, оздоравливаемого от энзоотического лейкоза стада.

Методы, используемые для диагностики: ПЦР.

Объекты исследований: кровь от телят старше 20-дневного возраста.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Обычный метод ПЦР с детекцией на геле представляет собой простой, быстрый и чувствительный метод для обнаружения генома вируса лейкоза в образцах крови.

Методика проведения анализа с использованием метода ПЦР включает три этапа: выделение РНК из клинического образца (пробоподготовка); амплификация специфических фрагментов НК (ПЦР); детекция продуктов амплификации.

Выделение РНК: на данной стадии проведения анализа клиническая проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций и получение раствора ДНК или РНК, свободной от ингибиторов и готовой для дальнейшей амплификации. Выбор методики выделения ДНК (РНК) в основном определяется характером обрабатываемого клинического материала.

Постановка ПЦР: Приготовление реакционной смеси. Разнесение ее по пробиркам. Внесение ДНК исследуемых проб. Загрузка амплификатора. Введение программы амплификации.

Амплификация (копирование): процесс состоит из 30–40 циклов, каждый цикл включает этапы: денатурация 93–95 °С. Отжиг (присоединение праймеров) 50–65 °С. Дотравивание второй цепи ДНК 70–72 °С.

Детекция продуктов амплификации (учет результатов): приготовление агарозного геля. Внесение амплификационной смеси в лунки геля. Электрофорез. Просмотр геля в ультрафиолетовых лучах.

В результате исследований (табл. 1) у 19 животных выявлен генетический материал ВЛ КРС, что составляет 14.8 %. Это свидетельству-

ет о достаточно высокой степени инфицирования крупного рогатого скота данной половозрастной группы.

Таблица 1. Результаты исследования крови телят неблагополучного по энзоотическому лейкозу хозяйств методом ПЦР

Возраст животных (дней)	Количество исследуемых проб	Количество положительных проб	% инфицированности
20–30	30	5	
40–60	42	6	
70–100	56	8	
Всего	128	19	14,8

Заключение. По результатам проведенной работы можно сделать следующие выводы: применение метода ПЦР диагностики позволяет выявить животных-носителей провируса с самого раннего возраста, в то время как другими существующими методами это невозможно. В следствие этого инфицированное животное остается в стаде до первого исследования методом ИФА (иммуоферментный анализ), которое согласно Ветеринарно-санитарным правилам в благополучном стаде будет через 2 года, а в неблагополучном – через 12 месяцев, если % инфицирования выше 0,2, а если ниже, то через 24 месяца, перезаражая здоровое поголовье, что в последствие может привести к значительному распространению ЭЛ КРС. Нахождение в стаде вирусоносителей приводит к дальнейшему перезаражению животных стада и влечет значительные экономические затраты на выращивание животного, которое впоследствии будет сдано на мясокомбинат до получения от него продукции.

Подводя итог вышесказанного для минимализации распространения ЭЛ КРС необходимо внедрение в систему диагностических исследований ДНК диагностики, что позволит выявить животных – носителей провируса ЭЛ КРС, в том числе телят в возрасте до 6 мес, для исследования которых непригодны серологические методы диагностики. На показания ПЦР диагностики не влияют иммунный статус животного и его физиологическое состояние (стельность). Особенно ценным будет использование ПЦР–диагностики для массового скрининга за быками, носителями провируса на элеварах и госплемпредприятиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов, А. Д. О патогенезе лейкозов крупного рогатого скота / А. Д. Белов, Л. В. Рогожина, Г. В. Сноз // Ветеринария. – 1997. – № 2. – С. 16–20.

2. Глазко, В. И. Современные направления использования ДНК-технологий / В. И. Глазко, Н. Н. Доманский, А. А. Созинов // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, № 5. – С. 80–93.

3. Русинович, А. А. Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота, меры борьбы и профилактики в Республике Беларусь: монография / А. А. Русинович. – Витебск: ВГАВМ, 2016. – 204 с.

4. Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота: социально-экономическая значимость, диагностика, профилактика и ликвидация болезни / В. Максимович, И. Субботина, Н. Бабахина, Л. Кашпар // Ветеринарное дело. – 2019. – № 2. – С. 5–11.

5. Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота: социально-экономическая значимость, диагностика, профилактика и ликвидация болезни / В. Максимович, И. Субботина, Н. Бабахина, Л. Кашпар // Ветеринарное дело. – 2019. – № 3. – С. 4–9.

6. Патогенез энзоотического лейкоза крупного рогатого скота [Электронный ресурс]. – Режим доступа : https://studref.com/329322/meditsina/patogenez_leykoza_krupnogo_rogatogo_skota. – Дата доступа: 15.09.2021.