

МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА, ВЫЗЫВАЕМОГО ВИРУСОМ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ВЛКРС)

MODEL FOR STUDYING BOVINE LEUKEMIA VIRUS

Степанова Т.В., научный сотрудник лаборатории лейкозологии
Иванова Л.А., кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории лейкозологии
Гулюкин М.И., доктор ветеринарных наук, проф., главный научный сотрудник лаборатории лейкозологии
Козырева Н.Г., кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории лейкозологии
Стаффорд В.В., старший научный сотрудник сектора патоморфологии

ФГБНУ Федеральный научный центр – «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)
 109428, Россия, г. Москва, Рязанский проспект, дом 24, корп. 1
 E-mail: admin@viev.ru

В серии из трех опытов смоделирован процесс, имеющий место в естественных условиях у телят, когда источником их заражения служит молоко инфицированной ВЛКРС коровы-матери. В условиях эксперимента на кроликах было установлено, что возможно их заражение ВЛКРС алиментарным путем. В результате кормления молоком или молоком с добавлением крови инфицированной ВЛКРС коровы у кроликов развивались такие признаки инфекции, как наличие антител к антигенам вируса в сыворотке и провирусной ДНК в лимфоцитах крови. Факт заражения кроликов при пероральном приеме молока инфицированной коровы может свидетельствовать о возможности заражения людей вирусом лейкоза. Определены минимальные дозы ДНК провируса, вызывающие инфекционный процесс при введении внутривенно и перорально, составляющие $3,6 \times 10^7$ копий и $2,7 \times 10^9$ копий, соответственно.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота, естественный хозяин, ксеногенный хозяин, модель межвидовой передачи.

Введение

Лейкоз крупного рогатого скота — одно из наиболее широко распространенных злокачественных заболеваний вирусной природы. Возбудитель болезни — вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) — относится к семейству Retroviridae, роду Deltaretrovirus. Это экзогенный вирус, в естественных условиях поражающий только крупный рогатый скот и вызывающий латентную инфекцию. Овцы могут заражаться при контакте с инфицированным крупным рогатым скотом и их, как чувствительный к ВЛКРС вид, часто используют для постановки диагностической биопробы. Чувствительны к ВЛКРС также козы. Природный резервуар ВЛКРС не найден.

Вместе с тем, одним из важнейших аспектов изучения биологических свойств ВЛКРС является потенциальная способность вируса поражать ксеногенные виды животных, в том числе и человека, употребляющего в пищу продукты животноводства и тесно контактирующего с крупным рогатым скотом в процессе хозяйственной деятельности.

С медицинской точки зрения, этот вопрос важен потому, что способность других вирусов этого семейства довольно легко преодолевать межвидовые барьеры свидетельствует о том, что нельзя исключить возможность передачи ВЛКРС человеку, а вирулентность в таком случае может оказаться не только очень высокой, но и с поражением клеток-мишеней различной локализации (нервной системы, молочных желез, и, как приня-

Stepanova T.V., Researcher at the Laboratory for Leucosis Research

Ivanova L.A., Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher at the Laboratory for Leucosis Research

Gulyukin M.I., Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Senior Researcher at the Laboratory for Leucosis Research

Kozyreva N.G., Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher at the Laboratory for Leucosis Research

Stafford V.V., Senior Researcher at Pathologic Sector

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko
 Ryazansky pr., 24-1, Moscow, 109428
 E-mail: admin@viev.ru

In a series of three tests, a process of infection through the milk obtained from a cow infected with bovine leukemia virus was simulated in calves under natural conditions. The test on rabbits showed that their infection with bovine leukemia virus is possible through alimentary canal. Feeding rabbits with milk or milk with blood taken from the cow infected with bovine leukemia virus caused the following signs: antibodies to virus antigens in the serum and proviral DNA in the blood lymphocytes. Such infection of the rabbits after oral administration of milk obtained from the cow infected with bovine leukemia virus indicates the risk of infection for people. The minimum doses of proviral DNA were established. These doses cause infectious process after intravenous and oral administration of $3,6 \times 10^7$ copies and $2,7 \times 10^9$ copies, respectively.

Key words: bovine leukemia virus, natural host, xenogeneic host, interspecies transmission model.

то считать, образовывать злокачественные заболевания лимфоидной ткани).

Межвидовая передача вируса лейкоза крупного рогатого скота вновь приобрела актуальность в свете последних данных о выявлении в ДНК клеток рака молочной железы людей последовательностей генома ВЛКРС [3, 4]. Однако для разрешения вопросов, возникающих при изучении путей и факторов передачи этиологического агента, особенностей вызываемого им инфекционного процесса, необходимо использовать лабораторных животных, недорогих и отличающихся небольшими размерами.

Моделирование вызываемого ВЛКРС инфекционного или эпизоотологического процессов на чувствительных животных позволяет изучить некоторые особенности этой латентной болезни, для развития которой требуются многие годы. Наличие такой модели позволит проследить за молекулярно-генетическими и иммуноморфологическими изменениями в организме зараженного животного в динамике инфекционного процесса [5, 6]. Данная статья отражает результаты первого этапа разработки модели, включающего стандартизацию условий заражения кроликов.

Методика

В трех опытах проводили заражение ВЛКРС-содержащим материалом 53 кроликов калифорнийской породы в возрасте 3 мес. Заражающим материалом

служили молоко и кровь больных энзоотическим лейкозом коров. Наблюдения проводили в течение 270–380 суток.

Серологические исследования проводили в реакции диффузионной преципитации (РДП) с использованием коммерческого набора для диагностики лейкоза крупного рогатого скота производства Курской биофабрики и методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических тест-систем в блокирующем варианте (INGENAZIM BLV Compact, INGENASA и Enzoitic Bovine Leukosis Virus (BLV) gp51 Antibody Test Kit IDEXX Leikosis Blocking P02140–07 с некоторыми модификациями).

Идентификацию фрагментов основных провирусных генов BLV проводили: в опыте 1 — методом гнездовой полимеразной цепной реакции с праймерами OBLV1A OBLV6A для первой реакции и OBLV3 и OBLV5 для второй реакции, согласно рекомендациям МЭБ [2]; в опыте 2 — методом ПЦР фрагмента провирусного гена *pol* BLV с использованием праймеров PF2/PR2 [7]; фрагмента гена *env* BLV — методом «гнездовой» ПЦР с использованием праймеров OBLV1A-6A (*out*, внешние), OBLV3-5 (*in*, внутренние), согласно рекомендациям МЭБ [2] в нашей модификации; *env5032*, *env5099*, *env5521r*, *env5608r* [8] в нашей модификации; выявление участков генов *tax/rex* и *gag* проводили согласно инструкции производителя диагностических наборов; в опыте 3 — методом ПЦР в режиме «реального времени» тест-системой в формате «мультиплекс» — 3 канала детекции — для обнаружения различных участков (*tax/rex*, *pol*) генома ВЛКРС, включая участок генома крупного рогатого скота в качестве внутреннего контроля работы тест-системы, разработанной на базе ВИЭВ.

Для верификации результатов исследований использовали коммерческий набор «ЛЕЙКОЗ» (вариант FRT) для выявления лейкоза крупного рогатого скота (КРС) методом полимеразной цепной реакции отечественного производителя ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, согласно прилагаемой инструкции.

Количественное определение содержания провируса в заражающем материале проводили в количественном варианте qPCR в формате «мультиплекс» с использованием генно-инженерной конструкции — плазмиды pBLV*pol* с известной концентрацией, разработанной ранее на базе ВИЭВ. Схема опытов и результаты представлены в таблице 1.

Результаты и обсуждение

В опыте 1 в первой группе, у 3 из 4 кроликов этой группы наблюдали положительные результаты в ПЦР. В РИД в двух случаях отмечена слабopоложительная реакция, в том числе у 1 кролика, не прореагировавшего положительно в ПЦР. Исследования методом ИФА не дали положительного результата. Таким образом, признаки циркуляции вируса выявлены у всех 4 кроликов.

Таблица 1.

Схема опытов по экспериментальному заражению кроликов ВЛКРС

Группы животных	N	Заражающая доза лимфоцитов/копий провируса	Фактор передачи	Способ введения	Продолжительность наблюдений, сутки	Признаки инфекции РИД+ИФА+ПЦР
Опыт 1						
1	4	Н.о*	молоко	перорально	0–270	4/4
2	4	8,6×10 ⁹ лим/-	молоко + кровь	перорально		3/4
3	5	2,9×10 ⁷ лим/-	кровь	внутривенно		5/5
4	3	Контроль интактный				0/3
Опыт 2						
1	6	Н.о*	молоко	перорально	0–300	6/6
2	6	2,9×10 ¹⁰ лим/-	молоко + кровь	перорально		6/6
3	6	1,9×10 ⁷ лим/-	кровь	внутривенно		6/6
4	5	Молоко от здоровой коровы перорально				0/5
Опыт 3						
1	3	Н.о.	молоко	перорально	0–380	1/3
2	4	6,0×10 ⁹ лим/ 8,1×10 ⁹ копий	молоко + кровь	перорально		2/4
3	4	2,0×10 ⁹ лим/ 2,7×10 ⁹ копий	молоко + кровь	перорально		2/4
4	3	2,7×10 ⁷ лим/ 3,6×10 ⁷ копий	кровь	внутривенно		2/3
5	1	Контроль				0/1

Примечание: *В молоке больных лейкозом коров-доноров инфекционного материала лимфоциты не были обнаружены. В настоящее время продолжается разработка ПЦР для выявления провируса в молоке. Поэтому точно определить дозу, полученную кроликами при выпаживании их молоком, не представлялось возможным.

Во второй группе из 4 кроликов, вирусспецифический фрагмент ДНК был выявлен только у 1 кролика. В ИФА антитела к ВЛКРС были выявлены в пробах сыворотки крови 3 из 4, в РИД — у 1 из 4 кроликов.

Таким образом, в этой группе по данным молекулярно-генетической и серологической диагностики признаки инфекции выявлены у 3 из 4 кроликов; иммунологические признаки преобладали.

В третьей группе выявлены вирусспецифические фрагменты ДНК в пробах крови 2 кроликов из 5. По результатам РИД и ИФА сероконверсия произошла у всех 5 кроликов этой группы [9].

В опыте 2 при проведении серологических исследований методами РДП и блокирующего ИФА у кроликов первой опытной группы не были выявлены антитела против гликопротеидного антигена gp51 BLV.

Во второй опытной группе антитела против gp51 BLV были выявлены у 3 из 6 животных, методом конкурентного ИФА — у 5 из 6 кроликов.

По данным обоих серологических тестов, у всех 6 из 6 кроликов третьей группы внутривенное введение крови инфицированной коровы вызвало развитие гуморального иммунного ответа на BLV.

В различных вариантах ПЦР были выявлены последовательности ДНК провируса ВЛКРС у всех кроликов в опыте 2.

В опыте 3 в первой группе кроликов, получавших перорально молоко инфицированной коровы, сероконверсия произошла у 1 из 3 кроликов; провирусная ДНК в крови не выявлена ни у одного животного.

Во второй и третьей группах антитела к ВЛКРС и провирусная ДНК выявлены у 2 из 4 животных.

В четвертой группе антитела и провирусная ДНК выявлены у 2 из 3 животных.

У кроликов контрольных групп всех опытов не выявлено признаков индуцированной ВЛКРС инфекции.

В трех опытах на кроликах был смоделирован процесс, имеющий место в естественных условиях у телят, когда источником их заражения служит молоко инфицированной ВЛКРС коровы-матери. В условиях эксперимента на кроликах было установлено, что возможно их заражение ВЛКРС алиментарным путем. В результате кормления молоком или молоком с добавлением крови инфицированных ВЛКРС коровы у кроликов соответствующих групп во всех трех опытах развивались такие признаки инфекции, как наличие антител к антигенам вируса в сыворотке и/или провирусной ДНК в лимфоцитах крови.

Результаты свидетельствуют о потенциальной опасности употребления в пищу молока инфицированных и больных лейкозом коров. Учитывая этот важный медико-социальный аспект, необходимо продолжить эксперименты по воспроизведению индуцированной ВЛКРС инфекции у гетерологичных видов животных кровью и молоком.

Кролики как модель индуцированной ВЛКРС инфекции хорошо зарекомендовали себя, поскольку оказались достаточно чувствительными как к внутривенному, так и алиментарному заражению. Одновременно в этих опытах была отработана методика заражения и оценки заражающей дозы. Если в первых экспериментах ее оценивали по количеству лимфоцитов, что не давало возможности объективно оценить количество провируса, то в третьем опыте для оценки применили определение количества копий провирусной ДНК методом qPCR с использованием плазмиды pBLVpol с известной концентрацией. Минимальная заражающая доза при внутривенном введении содержала $2,7 \times 10^7$ лимфоцитов или $3,6 \times 10^7$ копий провируса. При пероральном введении как $2,0 \times 10^9$ лимфоцитов или $2,7 \times 10^9$ копий провируса, так и в 3 раза более высокой дозы ($6,0 \times 10^9$ лимфоцитов или $8,1 \times 10^9$ копий), признаки инфекции выявлены у 50% кроликов.

Вклад авторов

Коллектив данных авторов разработали эксперимент, проанализировали данные и написали статью. Все авторы прочитали и одобрили заключительный вариант рукописи.

Конфликтные интересы

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stoye J.P., Blomberg J., Coffin J.M., Fan H. et al. Retroviridae // King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (eds). Virus Taxonomy, 9th Rep. Intern. Comm. Taxonomy of Viruses. Elsevier Ac. Press. London, Waltham, San Diego. 2012. P. 481–495.
2. World Organization of Animal Health (OIE). Enzootic bovine leucosis // Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 2008. № 2. P. 729–738.
3. Buehring G.C., Choi K.Y., Jensen H.M. Bovine leukemia virus in human breast tissues. Breast Cancer Res. 2001. № 3 (suppl. 1). A14, P. 1–24.
4. Mesa G., Ulloa J.C., Uribe A.M., Gutierrez M.F. Bovine Leukemia Virus Gene Segment Detected in Human Breast Tissue // Open Journal of Medical Microbiology. 2013. № 3. P. 84–90.
5. Dimitrov P., Simeonov K., Todorova K., Ivanova Z., Toshkova R., Shikova E., Russev R. Pathological features of experimental bovine leukemia viral (BLV) infection in rats and rabbits // Bull Vet Inst Pulawy. 2012. № 56. P. 115–120.

В этих опытах был смоделирован процесс, имеющий место в естественных условиях у телят, когда источником их заражения служит молоко инфицированной ВЛКРС коровы-матери. Факт заражения кроликов при пероральном приеме молока инфицированной коровы может свидетельствовать о возможности заражения людей вирусом лейкоза.

Заключение

В условиях эксперимента на кроликах было установлено, что возможно их заражение ВЛКРС алиментарным путем. В результате кормления молоком или молоком с добавлением крови инфицированной ВЛКРС коровы у 25–50% кроликов развивались такие признаки инфекции, как наличие антител к антигенам вируса в сыворотке и провирусной ДНК в лимфоцитах крови. Внутривенное введение крови инфицированной коровы вызывало развитие инфекционного процесса в 100% случаев в 2 из 3 опытов, что было установлено методами РИД и ИФА по наличию антител в сыворотке крови. Вместе с тем, ПЦР с праймерами, рекомендованными МЭБ, выявление провирусных последовательностей за период наблюдений было непостоянным и наблюдалось только у 20–40% животных этой группы.

Этот факт, а также данные литературы и результаты экспериментов, проведенных ранее, послужили поводом к проведению испытаний нескольких тест-систем для выявления ДНК-провирусных последовательностей ВЛКРС. Так, результаты исследования РИД-позитивных животных в тест-системе ПЦР с праймерами на ген gag «Изоген» были отрицательными в 41,5% случаев.

Выяснение причин столь частого несовпадения результатов диагностических тестов требует проведения дальнейших исследований. Кроме совершенствования диагностики, необходимо выяснить особенности инфекционного процесса на ранних стадиях развития инфекции, вызванной малыми дозами заражающего материала. Особого внимания требует вопрос о миграции в организме инфицированных животных лимфоцитов, несущих ДНК провируса.

Финансирование

Спонсоры не участвовали в составлении плана исследований, сборе данных и анализе, в подготовке к публикации или в подготовке рукописи.

Работа проводилась в рамках выполнения государственного задания по программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук по теме № 0578–2018-0003.

6. Michael D. Lairmore Animal Models of Bovine Leukemia Virus and Human T-Lymphotropic Virus Type-1: Insights in Transmission and Pathogenesis // Annu. Rev. Anim. Biosci. 2014. № 2. P. 189–208

7. Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuzmak J. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing // Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 2001. 114. no. 7–8. P. 252–256.

8. Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Гулюкин М.И., Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж., Калабеков И.М., Малоголовкин А.С. / Оптимизация ПЦР для выявления ДНК провируса лейкоза КРС с использованием сконструированных праймеров, комплементарных участку провирусного гена pol // Ветеринария и Кормление. — 2011. — № 1. — С. 16–17.

9. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В. и др. Межвидовая передача вируса лейкоза крупного рогатого скота в эксперименте // Вопросы вирусологии. — 2015. — Т. 60. — № 5. — С. 32–37.