ПОИСК ВОЗМОЖНЫХ ФАКТОРОВ ПЕРЕДАЧИ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЭНДОБИОТИЧЕСКИМ ПУТЕМ

Шибитов С. К.¹,

К.В.Н., В.Н.С.

Сафиуллин Р. Т.¹,

д.в.н., профессор

Козырева Н. Г.²,

К.б.Н., В.Н.С.

Аннотация

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) позвоночных колонизирован чрезвычайно разнообразным анаэробным микробным сообществом, состоящим из архей, бактерий, грибов и различных простейших. Трихостомические инфузории являются одними из наиболее характерных и крупнейших протистов этой сложной ферментативной ассоциации, населяющей как переднюю, так и заднюю части желудочно-кишечного тракта, питаются желудочные инфузории растительными клетками, микроорганизмами, другими инфузориями и возможно клетками крови при микротравмах ЖКТ. Передача инфузорий – эндобионтов происходит чаще, когда животные вступают в контакт с другим животными стада. Регургитация жвачки у крупного рогатого скота происходит рефлекторно, регулярно и часто, в то время как значительное количество инфузорий проникает в полость рта. У большинства жвачных животных такое социальное поведение, как уход за шерстью, включает облизывание морды и иногда ротовой полости сородичей, при этом некоторые инфузории переносятся изо рта одного животного в рот другого и вскоре проглатываются. По результатам ПЦР – исследований эндобиотических инфузорий из рубца коров на наличие в них вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛК) – во всех образцах получен отрицательный результат. Таким образом, в го-

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (117218, Москва, ул. Б. Черёмушkinsкая, д. 28), samshib@ya.ru

² «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», Лаборатория лейкозологии

могенизированном материале, состоящем из разных типов инфузорий от 12 коров, спонтанно инфицированных, методом ПЦР был получен отрицательный на наличие генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота. По нашему мнению, полученные данные не полностью опровергают гипотезу эндобактериальной передачи ВЛК из-за относительно небольшой выборки животных-носителей и недостаточного совершенствования метода диагностики ПЦР, и эти исследования следует продолжить с использованием большего числа больных ВЛК и разными методами диагностики.

Ключевые слова: инфузории, ВЛК, вирус лейкоза, крупный рогатый скот, коровы, ПЦР.

SEARCH OF THE POSSIBLE FACTORS OF TRANSMISSION OF THE LEUKOSIS VIRUS OF CATTLE BY ENDOBIOTIC WAYS

Shibitov S. K.¹,

Candidate of Veterinarian Sciences, Leading Researcher

Safiullin R. T.¹,

Doctor of Veterinarian Sciences, Professor

Kozyreva N. G.²,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher

Abstract

The gastrointestinal tract (GIT) of vertebrates is colonized by an extremely diverse anaerobic microbial community consisting of archaea, bacteria, fungi, and various protozoa. Trichostomic ciliates are among the most characteristic and largest protists of this complex enzymatic association, inhabiting both the anterior and posterior parts of the gastrointestinal tract. The transfer of ciliates – endobionts, occurs more often when animals come into contact with other animals of the herd. Regurgitation in cattle occurs reflexively, regularly and frequently, while a significant number of ciliates penetrate the oral cavity. In most ruminants, such social behavior as grooming involves licking the muzzle and sometimes the oral cavity of relatives, with some ciliates being transferred from the mouth of one animal to the mouth of another and soon swallowed. According to the results of PCR-studies of endobiotic

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants – a Branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences” (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia)

² All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterenarian Medicine of the Russian Academy of Sciences»

ciliates from the rumen of cows for the presence of bovine leukemia virus (BLV) in them, a negative result was obtained in all samples. Thus, in a homogenized material consisting of different types of ciliates from 12 cows that were spontaneously infected, a PCR methods was obtained negative for the presence of the genetic material of bovine leukemia virus. In our opinion, the data obtained do not completely disprove the hypothesis of endobiotic transmission of BLV due to the relatively small sample of carrier animals and insufficient improvement of the PCR diagnostic method, and these studies should be continued using a larger number of infected with BLV animals and different diagnostic methods.

Keywords: ciliates, BLV, leukemia virus, cattle, cows, PCR.

Введение. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) позвоночных колонизирован чрезвычайно разнообразным анаэробным микробным сообществом, состоящим из архей, бактерий, грибов и различных простейших. Трихостомные инфузории являются одними из наиболее характерных и крупнейших протистов этой сложной ферментативной ассоциации, населяющей как переднюю, так и заднюю части желудочно-кишечного тракта. По мнению Williams and Coleman, мутуалистические и комменсальные инфузории преджелудков жвачных не имеют существенного значения для выживания их хозяев, о чем свидетельствует вполне нормальная жизнь животных, инфузорная микробиота которых была удалена экспериментально или утрачена в зоологических садах [5].

В рубце жвачных обычно встречаются две большие группы простейших — энтодиниоморфы и голотрихии (рис. 1), утилизирующие крахмал и растворимые сахара. Простейшие обладают ферментативной активностью и способствуют стабилизации рубцовой среды. Они прикрепляются к крупным частицам корма, что препятствует их выходу из рубца с жидкой фазой. Средняя продолжительность пребывания инфузорий в рубце — 10 ч. Степень адгезии является благоприятным фактором для их жизнедеятельности. Некоторые представители рода *Epidinium* выделяют ферменты, лизирующие межклеточное вещество, вследствие чего растительные ткани распадаются и пищевой субстрат фрагментируется. После этого они, как и энтодиниоморфы, заглатывают и внутриклеточно утилизируют крупные частицы субстрата. Большое количество голотрихий может также скапливаться на слизистой оболочке преджелудков [2]. Около 20% метана продуцируется бактериями, связанными с инфузориями. Так, метаногенные археобактерии образуют 9–25% от общего количества метана в рубцовой жидкости, а удаление инфузорий из рубца (дефаунизация) снижает

интенсивность метаногенеза. Этот процесс зависит от состава рациона животных и наблюдается при превалировании концентрированных кормов над грубыми. Однако применение химических средств дефаунизации на практике осложняется их токсичностью для других микроорганизмов или животного-хозяина [1].

Рис. 1. Инфузории семейства Ophryoscolecidae из рубца жвачных:

А - *Entodinium simplex*; Б - *Anoplodinium denticulatum*; В - *Eudiplodinium neglectum*; Г - *Polyplastron multivesiculatum* с левой стороны; Д - то же с правой стороны; Е - *Ophryoscolex caudatus*; Ж - *Epidinium ecaudatum*.

1 - околоротовая ресничная зона; 2 - большое ядро (макронуклеус); 3 - малое ядро (микронуклеус); 4 - сократительная вакуоль; 5 - спинная ресничная зона; 6 - скелетные пластинки

По типу питания выделены трофические группы инфузорий, питающихся преимущественно: растительными клетками и волокнами; зернами крахмала; бактериями и другими микроорганизмами; инфузориями. Для нормального размножения и роста молодых особей им необходимо поедать бактерий [3]. У офриосколецид наблюдается иногда хищничество. Более крупные виды пожирают более мелкие. Хищничество (рис. 2) сочетается со способностью тех же видов питаться растительными частицами.

Рис. 2. Хищные инфузории семейства Ophryoscolecidae:

1 – *Anoplodinium costatum*, заглотивший несколько инфузорий рода *Entodinium*; 2 – *Entodinium vorax*, проглотивший *Entodinium simplex*

Передача эндобионтных инфузорий происходит чаще при контакте животных в стаде. Отыгивание жвачки у крупного рогатого скота происходит рефлекторно, регулярно и часто, при этом в ротовую полость вместе с жвачкой попадает значительное число инфузорий из рубца. У большинства жвачных парнокопытных такое социальное поведение как груминг включает в себя облизывание морды и иногда ротовой полости сородичей, при этом часть жвачки переносится изо рта одного животного в рот другого и вскоре проглатывается [3]. Таким образом, животные могут контаминировать слюной, содержащей инфузорий преджелудков, места общего поения и кормления животных.

Гипотетически при микротравмах рубца и сетки (гельминты-гематофаги, инородные тела, грубый корм) у зараженного ВЛК крупного рогатого скота в просвет его содержимого могут попадать клетки крови и их фрагменты, содержащие вирусный агент лейкоза крупного рогатого скота, которые в свою очередь могут захватываться инфузориями и передаваться от животного животному контактным путем. Подобное исследование [4] было проведено в 2018 году на примере цистообразующих инфузорий кишечника крупного рогатого скота *Buxtonella sulcata*.

Целью нашего исследования было выявление возможной роли эндобиотических инфузорий рубца крупного рогатого скота в передаче ВЛК.

Материалы и методы. Отбор проб проводили в мае-июне 2018 года в животноводческом комплексе Жуковского района, Калужской области. Содержимое рубца от 12-ти РИД положительных коров (виру-

соносителей) отбирали при помощи зонда. В условиях лаборатории санитарной паразитологии ВНИИП и лаборатории лейкозологии ВИЭВ методами последовательных промываний выделяли инфузории, микроскопически подсчитывали количество и отбирали для исследований 500-700 экземпляров инфузорий из каждой пробы. Трофозоиты инфузорий рубца от РИД-положительных животных исследовали в ПЦР-РВ, предварительно разрушив их механически или при помощи жидкого азота, экстракцию РНК/ДНК из 100 мкл суспензии цист инфузорий проводили методом преципитации НК изопропанолом (набор реагентов «Рибо-Преп»). Элюировали РНК/ДНК в 50 мкл ТЕ-буфера, кДНК на матрице РНК получали при проведении реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) с использованием набора реагентов «Реверта-L». Амплификацию (ПЦР-РВ) осуществляли с помощью тест-системы «ЛЕЙКОЗ» (вариант FRT) для обнаружения ДНК провируса лейкоза КРС. Пробы анализировали коммерческими наборами реагентов производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора согласно соответствующим прилагаемым инструкциям. Всего было исследовано 12 проб. Результаты обрабатывали статистически в программе MS Excel.

Результаты исследований. По результатам ПЦР – исследований трофозоитов эндобактериальных инфузорий из рубца крупного рогатого скота во всех пробах получен отрицательный результат.

Заключение. Таким образом, в гомогенизированном материале состоящим из разных видов инфузорий рубца от 12 коров, РИД положительных ВЛК, методом ПЦР был получен отрицательный результат на наличие генетического материала вируса лейкоза крупного рогатого скота у вирусоносителей (РИД положительные). По нашему мнению, полученные данные полностью не опровергают гипотезу эндобактериальной передачи ВЛК, в связи с относительно не большой выборкой животных – вирусоносителей и не достаточным совершенством ПЦР метода диагностики, а данные исследования необходимо продолжить, используя большее количество положительных на ВЛК животных в том числе клинически больных, а также совершенствовать разные методы диагностики для обнаружения ВЛК в инфузориях рубца.

Литература

1. Богданов Г.О. и др. Биохимические и физиологические предпосылки уменьшения эмиссии метана жвачными животными // Сельскохозяйственная биология. 2010. № 4. С. 13–24.

2. Грушкин А.Г., Шевелев Н.С. О морфофункциональных особенностях микробиоты рубца жвачных животных и роли целлюлозолитических бактерий в рубцовом пищеварении // Сельскохозяйственная биология. 2008. № 2. С. 12–19.
3. Корнилова О.А. Определитель инфузорий, обитающих в пищеварительном тракте млекопитающих // В сб.: Функциональная морфология, экология и жизненные циклы животных. Научные труды кафедры зоологии РГПУ им. А.И. Герцена. 2010. Т. 10. С. 59–95.
4. Шибитов С.К. и др. Показатели и влияние инвазивности *Buxtonella sulcata* (Jameson, 1926) при лейкозе крупного рогатого скота // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2018. Т. 236. № 4. С. 216–220.
5. Vďačný P. Evolutionary Associations of Endosymbiotic Ciliates Shed Light on the Timing of the Marsupial–Placental Split // Molecular biology and evolution. 2018. Т. 35. № 7. С. 1757–1769.

References

1. Bogdanov G. O. et al. Biochemical and physiological prerequisites for reducing methane emissions by ruminants. *Agricultural Biology*. 2010; (4): 13–24. (In Russ.)
2. Grushkin A.G., Shevelev N.S. On the morphofunctional features of the microbiota of the rumen of ruminants and the role of cellulolytic bacteria in cicatricial digestion. *Agricultural Biology*. 2008; (2): 12–19. (In Russ.)
3. Kornilova, O. A., The determinant of ciliates inhabiting the digestive tract of mammals. In Coll.: *Functional morphology, ecology, and life cycles of animals. Scientific works of the Department of Zoology of the A.I. Herzen Russian State Pedagogical University*. 2010; 10: 59–95. (In Russ.)
4. Shibitov S.K. et al. Indicators and effects of *Buxtonella sulcata* (Jameson, 1926) invasiveness in cattle leukemia. *Scientific notes of the N.E. Bauman Kazan State Academy of Veterinary Medicine*. 2018; 236(4): 216–220 (In Russ.)
5. Vďačný P. Evolutionary Associations of Endosymbiotic Ciliates / Split Light. *Molecular biology and evolution*. 2018; 35(7): 1757–1769.