

Лейкоз крупного рогатого скота

В.В. Макаров, доктор биологических наук, профессор Департамента ветеринарной медицины РУДН (vvm-39@mail.ru).

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6).

В аналитической лекции рассмотрены имеющиеся данные по мало обсуждаемым в отечественной литературе аспектам лейкоза крупного рогатого скота. С современных позиций паразитарной системы интерпретированы важнейшие элементы патобиоза — передача инфекции, патогенез, его клеточные и вирусологические механизмы, провирусная нагрузка и практическое значение ее измерения, заражение потомства и роль инфицированного молодняка в распространении лейкоза.

Ключевые слова: лейкоз, крупный рогатый скот, передача инфекции, патогенез, провирусная нагрузка, лейкоз у молодняка.

Enzootic bovine leucosis

V.V. Makarov, Grand Ph.D in Biology Science, professor of Veterinary medicine department PFUR (vvm-39@mail.ru).

People's Friendship University of Russian (6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, RF, 117198).

In an analytical discourse reviewed the available data on aspects of enzootic bovine leucosis that are little discussed in the domestic literature. The most important elements of pathobiosis as a transmission of infection and pathogenesis, its cellular and virological mechanisms, proviral load and the practical significance of its measurement, infection of the of newborns and the role of infected young animals in the spread of leucosis are interpreted from the current position of the parasitic system.

Keywords: enzootic bovine leucosis, transmission of infection, pathogenesis, proviral load, leucosis in young animals.

Сокращения: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, КВП — коэффициент вертикальной передачи, КРС — крупный рогатый скот, ЛКРС — лейкоз крупного рогатого скота, ПВН — провирусная нагрузка, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РИД — реакция радиальной иммунодиффузии, РНК — рибонуклеиновая кислота, СПИД — синдром приобретенного иммунодефицита, ТКЛЧ — Т-клеточный лейкоз человека

Этиология

Лейкоз крупного рогатого скота (в зарубежном определении энзоотический лейкоз) — контагиозный инфекционный рак крови (гемобластоз, точнее лимфобластоз) вирусной этиологии. Вирус ЛКРС относится к роду *Deltaretrovirus* подсемейства Orthoretrovirinae, семейства Retroviridae. Составляющие семейства — онкогенные, или ретровирусы, РНК-геномные, репродуцирующиеся через ДНК-интермедиат с помощью обратной транскрипции, с альтернативным диморфным существованием в виде зрелых вирусных частиц (межклеточная передача инфекции) или провируса (ДНК-копии вирусной РНК) в геномах зараженных гемопоэтических и иных клеток (персистенция, онкогенез, горизонтальная передача инфекции).

Ретровирусы таксономически различаются по видам хозяев и строго видоспецифичны (не отмечено никакой эпидемиологически значимой естественной полипатоген-

ности), что также может быть обусловлено «сверхспецифичностью» их интимных паразито-хозяинных взаимоотношений с клетками на самом глубоком, генетическом и биохимическом уровне паразитизма. Вирус ЛКРС — экзогенный ретровирус, опасности для человека и животных других видов не представляет, всевозможные спекуляции на этот счет не имеют оснований и не заслуживают серьезного обсуждения.

Обратная стратегия генома вируса ЛКРС и всех ретровирусов как патогенов представляет предел эволюционного совершенства паразитизма с сохранением их биологических видов на уровне только генотипа и полной утратой фенотипических признаков (структура, морфология, размножение). Это объясняет многие особенности патобиоза при лейкозе, прежде всего злокачественное перерождение клетки-хозяина и репродукцию вирусного генома в контексте неограниченной пролиферации трансформированных лимфоцитов, абсолютную иммунную эвазию в отношении тривиальных эффекторов противовирусной защиты, отсутствие как врожденного, так и приобретенного протективного иммунитета, внутриклеточную передачу инфекции по эпизоотической цепи.

Вирус ЛКРС сходен с другим дельтаретровирусом — возбудителем ТКЛЧ по всем свойствам с точки зрения геномной организации, вирусологии, патологии, эпидемиологии. Оба вируса вызывают хронические

лимфопролиферативные заболевания с поражением В-клеточной (КРС) и Т-клеточной (человек) систем, соответственно. Индуцированные ими инфекции принципиально схожи, с гемоконтактной передачей содержащих провирус лимфоцитов инфицированных животных или человека, чрезвычайно длительным инкубационным периодом, выраженной стадийностью развития, отсутствием хронической вирусемии, персистирующим лимфоцитозом, инфильтрацией лимфоидных органов с развитием клинического лейкоза у 1...5 % инфицированных. В виду такой общности результаты большинства исследований и имеющиеся данные относительно обоих дельтаретровирусов могут быть перекрестно и с большим эффектом экстраполированы в отношении как ЛКРС, так и ТКЛЧ [3].

Передача инфекции

Цепная трансмиссия и воспроизведение очередного, нового случая заражения при ЛКРС происходит не за счет зрелого вируса; трансмиссибельным инфектом являются инфицированные лимфоциты коров в состоянии персистентной инфекции или лимфоцитоза с интегрированным в их хромосомы провирусом (рис. 1), а бесклеточное инфицирование вирусом ЛКРС считается неэффективным. Внеорганизменным субстратом выделяемого инфекта служат любые жидкости организма с находящимися в них такими лимфоцитами, прежде всего кровь и ее примеси к другим жидкостям, в минимальном объеме которой содержатся многие тысячи клеток, молоко и молозиво, слюна, моча и проч. [4, 14]. В частности, обнаруживаемое количество копий провируса в образцах со слизистой носа и слюны ин-

фицированного КРС было близко к таковому в крови: > 14 000 против 18 000 копий / 10^5 клеток, соответственно, что прямо указывает на высокий риск передачи ЛКРС при прямом контакте [25].

Внутриклеточной передачей обуславливается сравнительная сложность горизонтального и вертикального пути распространения инфекции. Клеточная структурная организация инфекта, внутриклеточная персистенция и трансмиссия полностью исключают некоторые банальные элементы инфекционного патобиоза, в частности, вирусную нейтрализацию антителами, колостральный иммунитет, трансплацентарное заражение.

В то же время вероятность «успешного» заражения предполагает целый ряд нетривиальных условий, прежде всего (i) эффективное проникновение аллогенного лимфоцита инфицированной коровы-носителя провируса во внутреннюю среду и циркулирующие системы реципиента, а также (ii) максимальное сохранение целостности крайне неустойчивой во внешней среде эукариотической клетки-инфекта за счет теснейшего контакта между организмом — источником инфекции и восприимчивым организмом.

Первое реализуется вследствие разнообразных непредсказуемых естественных и особенно искусственных повреждений внешних и внутренних покровов животного-реципиента (кожи и слизистых), независимо от продуктивных, физических и иных кондиций, и гематогенной кросс-контаминации его кровотока жидкостями инфицированных животных. Подавляющее большинство случаев перезаражения происходит искусственно, или ятрогенно, при многократном использовании инъекционных игл, диагностического,

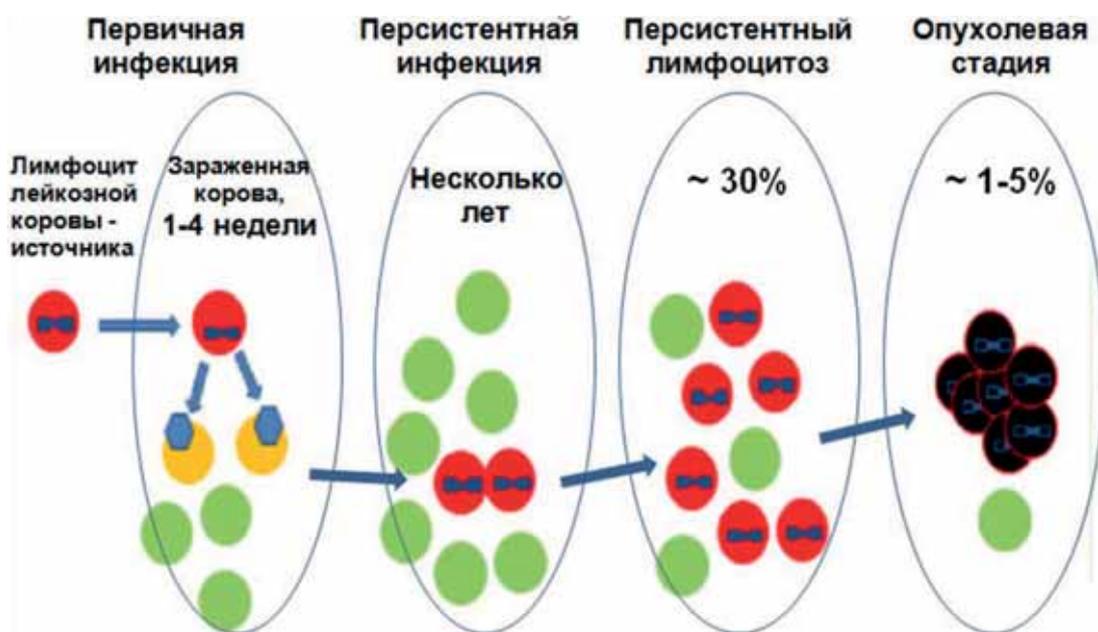


Рис. 1. Принципиальная схема патогенеза ЛКРС [4]: красные круги — инфицированные В-лимфоциты, содержащие провирус ВЛКРС (голубой); желтые — межклеточное распространение зрелого ВЛКРС (голубые гексагоны) в инфицированном организме; зеленые — неинфицированные В-лимфоциты; черные — клетки лимфомы, содержащие провирус ВЛКРС

Fig. 1. Schematic diagram of the pathogenesis of EBL [4]: red circles — infected B-lymphocytes containing the EBL provirus (blue); yellow — intercellular spread of mature virus EBL (blue hexagons) in the infected organism; green — uninfected B-lymphocytes; black - lymphoma cells containing the EBL provirus

терапевтического, акушерского, хирургического и иного медицинского инструментария, оборудования для искусственного осеменения, обработки копыт, обезроживания, мечения, при вакцинации и иных массовых инвазивных обработках, репродуктивных обследованиях, кастрации и т. п. Сюда относятся также такие факторы, как плодные жидкости и все, что сопутствует родам, кормление молозивом и молоком, открытые травмы, жалающие насекомые, кровь и другие выделения инфицированных животных.

Второе происходит, главным образом, в процессе самых ранних постнатальных отношений «мать↔новорожденный теленок», следствием чего является паравертикальное заражение¹ при прохождении родовых путей и далее через молозиво и слюну. В этом находит объяснение ПЦР-положительное тестирование новорожденных телочек с 15-дневного возраста, инфицированность молодняка КРС, высокий коэффициент паравертикальной передачи [1, 2].

Прямое проникновение инфекта в кровотоки восприимчивого животного-реципиента за счет гематогенной кросс-контаминации не встречает особых препятствий, и вероятность такой передачи достаточно высока в крупных группировках КРС, где обеспечивается необходимая популяционная плотность инфицированного и восприимчивого хозяина как первостепенное условие контагиозности и устойчивости данной паразитарной системы. По-видимому, главное при этом — эффективная инфицирующая доза, то есть количество передаваемых по цепи лимфоцитов, содержащих провирус.

Однако конкретные механизмы инвазивности аллогенного лимфоцита-инфекта, проникающего в восприимчивый организм алиментарно, неизвестны. Исходя из канонов инфекционного патогенеза, определено, что инфект в такой форме не может проследовать через желудок. Также остаются окончательно не выясненными механизмы реактивации в нем провируса, репродукции и экзоцитоза полноценного вируса ЛКРС «на новом месте», заражения интактных лимфоцитов в периферических органах иммунной системы нового организма (селезенка, лимфоузлы, лимфоидные скопления) и в целом судьбы инфицированных аллогенных клеток в этих условиях (см. рис. 1). Предположительно критическая роль в этом может принадлежать реакциям клеточного иммунитета животного-реципиента на анти(алло)генность последних, о чем косвенно свидетельствует образование полноценного вируса при стимуляции инфицированных клеток некоторыми митогенами.

Патогенез

Патогенетическая мишень вируса ЛКРС — зрелые В-лимфоциты фенотипа CD5⁺IgM⁺. Эта субпопуляция клеток образуется как одна из ветвей лимфоцитопоза в направлении «про-В → пре-В → В-лимфоциты», далее делящаясь на две ветви В-1 и В-2. В-2-лимфоциты фенотипа CD5⁺ — главная субпопуляция и анатомический субстрат гуморального звена адаптивного приобретенного иммунитета, дифференцирующаяся под действием антигенов и интерлейкинов в плазматические

клетки — продуценты антител тривиальных классов IgM, IgG, IgA, IgE с многочисленными подклассами.

Особенностью В-1, или CD5⁺IgM⁺В-лимфоцитов, является их меньшая дифференцированность, ранний ответ на антигенные детерминанты линейного типа (через 48 ч после контакта), образование антител ограниченной специфичности, преимущественно ранних (класса IgM), в основном, к Т-независимым наиболее общим полисахаридным антигенам бактерий, неспособность трансформироваться в клетки памяти. В течение жизни пул В-1-лимфоцитов поддерживается за счет активности специализированных клеток-предшественников, не происходящих из костного мозга. Их доля в общей популяции В-клеток составляет около 5 %, анатомическая ниша — приборьерные брюшная и плевральная полости [22].

В-1-лимфоциты скорее факторы врожденного (naïve), неспецифического, чем адаптивного, специфического иммунного ответа. Синтезируемые ими антитела не имеют значительного разнообразия переменных участков молекул иммуноглобулинов, ограничены в репертуаре распознаваемых антигенов, активны в отношении компонентов клеточных стенок наиболее распространенных бактерий. Все В-1-лимфоциты представляют общий, не строго специализированный, но определенно ориентированный антибактериальный клон. Переклечение классов иммуноглобулинов в В-1-лимфоцитах, за исключением IgM, не «предусмотрено». Образно говоря, это «отряд противобактериальных пограничников» в приборьерных полостях, предназначенный для быстрой реакции на «просачивающиеся» через барьеры патогенные микроорганизмы из числа широко распространенных. Преобладающая часть антител в сыворотке крови здорового человека — продукты синтеза В-1-лимфоцитов, относительно полиспецифичные иммуноглобулины антибактериального назначения [22].

Мишеневая роль В-лимфоцитов фенотипа CD5⁺IgM⁺ при ЛКРС заключается в том, что именно они являются единственными мононуклеарными клетками периферической крови, подверженными персистирующему лимфоцитозу. Хотя у инфицированного КРС провирус лейкоза обнаруживался в В-лимфоцитах других фенотипов, а также в Т-лимфоцитах фенотипов CD2⁺, CD3⁺, γ / δ и даже в хорошо известных функционально Т-хелперах и киллерах (CD4⁺ и CD8⁺), в моноцитах и гранулоцитах, их провирусная нагрузка в десятки раз ниже и не сопровождалась злокачественной трансформацией [19, 20, 23]. Принципиально аналогичны мишеневая роль при ТКЛЧ Т-лимфоцитов фенотипа CD4⁺ (хелперов), обнаружение провируса в клетках периферической крови других типов: CD8⁺Т-, В-лимфоцитах, дендритных клетках [5, 13].

Перечисленные радикальные особенности В-лимфоцитов фенотипа CD5⁺IgM⁺ — независимость от костномозговых клеток-предшественников, иммунологическая наивность, ограниченные анатомическая локализация и протективное значение могут в определенной мере служить гипотетическим объяснением предпочтительности их использования вирусом ЛКРС в качестве патогенетических мишеней. Физиологическая сущность и роль их в качестве анатомической мишени объясняет также отсутствие при ЛКРС приобретенного

¹ Внеутробная передача инфекции от матери потомству при родах и в неонатальном периоде.

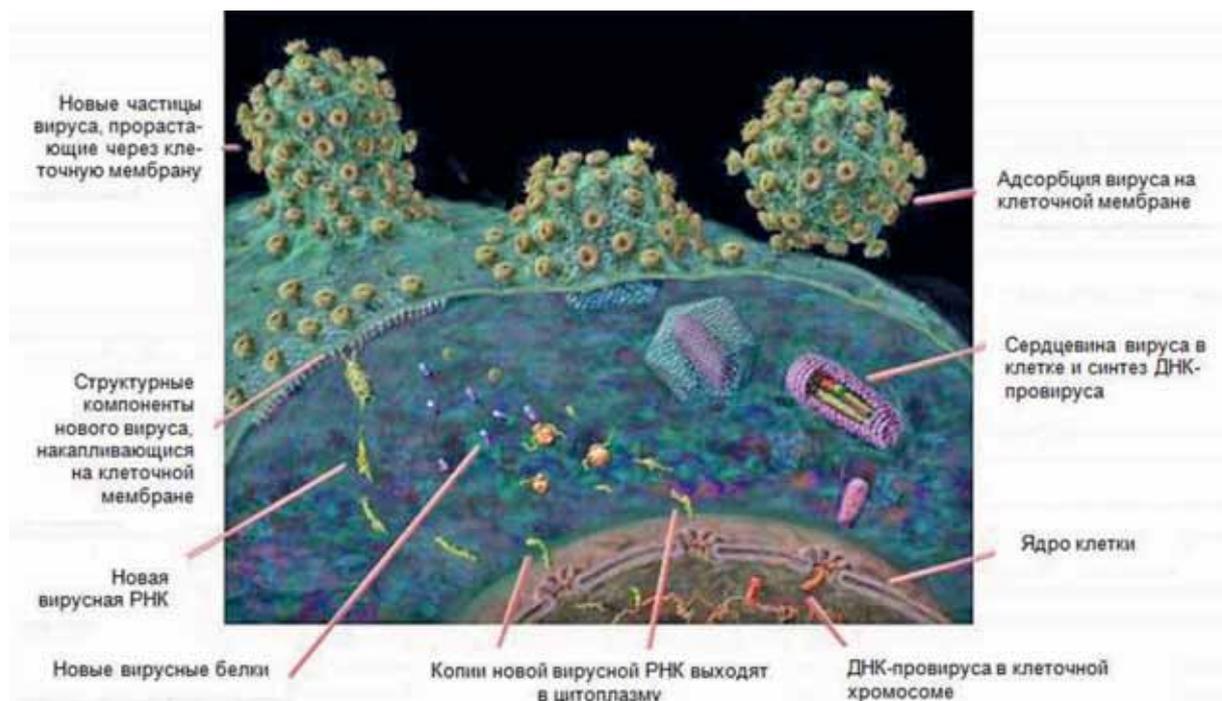


Рис. 2. Продуктивная инфекция ретровирусов на примере вируса иммунодефицита человека [https://ppt-online.org/]

Fig. 2. Productive retrovirus infection by the example of the human immunodeficiency virus [https://ppt-online.org/]

вирусного иммунодефицита (типа СПИД'а с поражением $CD4^+$ Т-лимфоцитов-хелперов как важнейшего звена адаптивного клеточного иммунитета), кроме некоторого снижения резистентности к банальным инфекциям в поздней ГЕМ-положительной стадии.

Механизм, с помощью которого вызывается неконтролируемая вирусиндуцированная не зависящая от интерлейкина-2 пролиферация $CD5^+IgM^+B$ -лимфоцитов, не выяснен. Вирус ЛКРС не имеет известного онкогена и не интегрируется в предпочитаемые участки геномов клеток-хозяев. Полноразмерный провирусный геном сохраняется у каждого животного на протяжении всего течения заболевания. При этом как большие, так и малые делеции провирусных геномов — очень редкие события [3].

Стадии инфекционного процесса при ЛКРС, как и других онкологических заболеваниях, характеризуются очень медленным, последовательным многоэтапным развитием с продолжительной инкубацией от нескольких месяцев до многих лет.

Инкубационный период заболевания протекает в две фазы, отражающие диморфизм существования ВЛКРС. Первичная острая инфекция аллогенных лимфоцитов-инфектов в организме зараженного животного сопровождается репродукцией вируса и его распространением в популяции интактных лимфоцитов последнего (рис. 2).

Естественно инфицированные лимфоциты даже в условиях продуктивной инфекции практически не производят полноценных внеклеточных инфекционных частиц вируса ЛКРС. Передачу и распространение инфекции обеспечивают специфический межклеточный контакт, большие поверхностные интерфейсы, называемые вирусными или инфекционными синапсами,

инвагинация (см. прорастание вируса на рисунке 2) и слияние клеточных мембран. Прямым свидетельством этого является поляризация цитоскелета инфицированной клетки, концентрация нуклеокапсидных комплексов в местах контактов и их межклеточный переход, установленные на примере вируса ТКЛЧ (рис. 3). Аналогичный механизм использования нормальной физиологии мишеневых клеток стереотипен и для других лимфотропных ретровирусов, в частности, вируса иммунодефицита человека [7, 9, 24].

Именно этим объясняется отсутствие при лейкозе КРС тривиальной вирусемии и делящихся клеток в крови на протяжении всего хронического течения инфекции, локализация пролиферирующих лейкозных клеток в лимфоузлах и селезенке, где обеспечиваются их тесные межклеточные структурные контакты.

Развивающийся в ответ на размножение вируса клеточный иммунитет вновь зараженного организма в течение первых недель прерывает продуктивную инфекцию, осуществляя негативную селекцию лимфоцитов, репродуцирующих вирусные частицы. В данном случае иммунологическому распознаванию и разрушению цитотоксическими Т-лимфоцитами-киллерами подвергаются инфицированные лимфоциты, репродуцирующие вирус ЛКРС и воспроизводящие инфекционный цикл его развития с антигенной модуляцией последних структурными компонентами нового вируса, экспонированными на их клеточной мембране (см. рис. 2).

Суть негативной селекции в том, что при этом остаются интактными трансформированные лимфоциты с прерванным инфекционным циклом на стадии ДНК-провируса в клеточной хромосоме, то есть содержащие провирус, но не воспроизводящие новый вирус и анти-

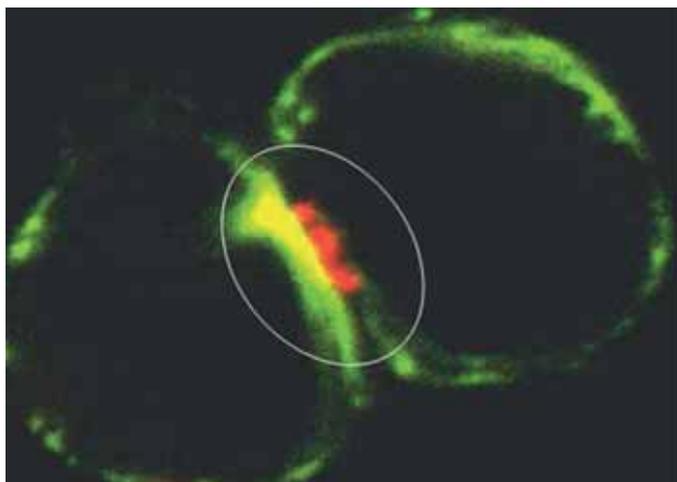


Рис. 3. Вирус ТКЛЧ и Т-лимфоциты: накопление в местах специфического контакта нуклеокапсидных комплексов (вирусные gag белок и геном), вирусный синапс и межклеточная передача (флуоресцентная конфокальная микроскопия) [9]

Fig. 3. HTLV virus and T-lymphocytes: accumulation of nucleocapsid complexes (viral gag protein and genome) at sites of specific contact, viral synapse and intercellular transmission (fluorescence confocal microscopy) [9]

генную модуляцию клеточных мембран, делающую их мишенями эффикторов противоклеточного иммунитета. Злокачественно трансформированные клетки, способные начать неограниченную пролиферацию с моно- или олигоклональной экспансией и тем самым пассивной репродукцией инфекта, обеспечивают ему абсолютную иммунную эвазию и объясняют отсутствие протективного иммунитета при ЛКРС.

При этом, как показано на модели ТКЛЧ, развивается состояние хронической адьювантной стимуляции лимфоцитарного звена, и активированная таким образом иммунная система организма, казалось бы, предназначенная для защиты от инфекции, в этих условиях парадоксально ускоряет межклеточное распространение вируса и кинетику лимфоцитоза [6].

Инфекция переходит во вторую фазу со становлением персистенции, в течение которой количество лимфоцитов с провирусом достигает 1 % от общего пула циркулирующих В-лимфоцитов крови, то есть более 50 тысяч структурных единиц инфекта в мл, или 1000 в капле крови (см. рис. 1) [4, 8].

Тем не менее, в ходе персистентной фазы инкубационного периода развивается гуморальный иммунный ответ на отдельные вирусспецифические антигены — продукты ограниченного и замедленного функционирования вирусного ДНК-интермедиата в составе генома медленно пролиферирующего лимфоцита-хозяина. По этой причине процесс накопления антител достаточно продолжителен: серопозитивность в пределах чувствительности реакции радиальной иммунодиффузии, общепринятой для ее регистрации (стадия РИД-позитивности), возникает через шесть месяцев после заражения и ретроспективно прямо указывает на инфицированность животных.

Выделяют два наиболее важных и функционально маркерных белка вируса ЛКРС — структурные

мажорные антигены p24, внутренний, капсидный белок, кодируемый геном gag (gag-белок), и gp51, наружный, оболочечный гликополипептид, кодируемый геном env². Их экспрессия и, соответственно, образование антител коррелируют с интенсивностью лейкозного процесса. Сильный иммунный ответ и титры антител на капсидный и оболочечный антигены развиваются у лейкоэмичных животных. Слабый ответ, главным образом на p24, характерен для алейкемичного состояния. Поскольку большинство инфицированного, но алейкемичного скота не вырабатывают антитела к оболочечному gp51, представляется, что их отсутствие может быть хорошим маркером состояния «безопасного инфицирования» [11].

Лейкемичная стадия (ГЕМ-позитивность) ЛКРС, гематологически регистрируемая с концентрации > 10 тысяч лимфоцитов/мкл крови, развивается только у ~ трети РИД-позитивных. Остальные инфицированные животные (70 % и более) остаются в алейкемическом состоянии в качестве бессимптомных провирусоносителей. Алейкемичные особи могут быть идентифицированы только по наличию провируса с помощью ПЦР и / или антителам к вирусным антигенам. Если содержание лимфоцитов в крови интактного КРС в среднем составляет 5000/мкл, то для достижения стартового уровня ГЕМ-позитивности путем клональной пролиферации онкогенно трансформированных клеток, несущих провирус, это количество должно быть удвоено. Отсюда одной из основных патогенетических характеристик кинетики опухолевого роста при лимфолейкозах является продолжительность периода воспроизведения дополнительного удвоенного числа лимфоцитов или время удвоения их количества (ВУКЛ) [15, 18].

Развитие клеточного клона при лимфоцитозе определяется имманентными свойствами лимфоцита независимо от этиологии и характеризуется определенной скоростью прироста клеток, которая, как установлено на модели хронического лимфоцитарного лейкоза человека, варьирует от 0,1 до более 1,0% клона в день. На активно прогрессирующий патологический процесс указывает экспоненциальный характер ежедневного прироста пролиферирующих лимфоцитов в этом диапазоне, начиная с 0,35% [15, 18]. Расчетная кинетика опухолевого роста, выполненная на этом количественном основании, приведена на рисунке 4.

Очевидно, что скорость прироста лимфоцитов обусловливает ВУКЛ (продолжительность периода воспроизведения их дополнительного удвоенного количества). При скорости 0,1 и 1,0 % результаты представляют «выпадающие» величины и не приемлемы для экстраполяции на ЛКРС. При 0,35%-м приросте для удвоения потребуется около семи лет с экспоненциальными признаками, весьма характерными для лимфоцитоза. Это позволяет определить вариации скорости удвоения количества лимфоцитов в этом диапазоне для инкубационных периодов развития ГЕМ-позитивности при ЛКРС различной продолжительности; например, при наиболее реальной средневзвешенной продолжительности в пять лет скорость прироста будет равна 0,47 %.

² gag (от group antigen), env (от envelope) — структурные гены вируса ЛКРС.

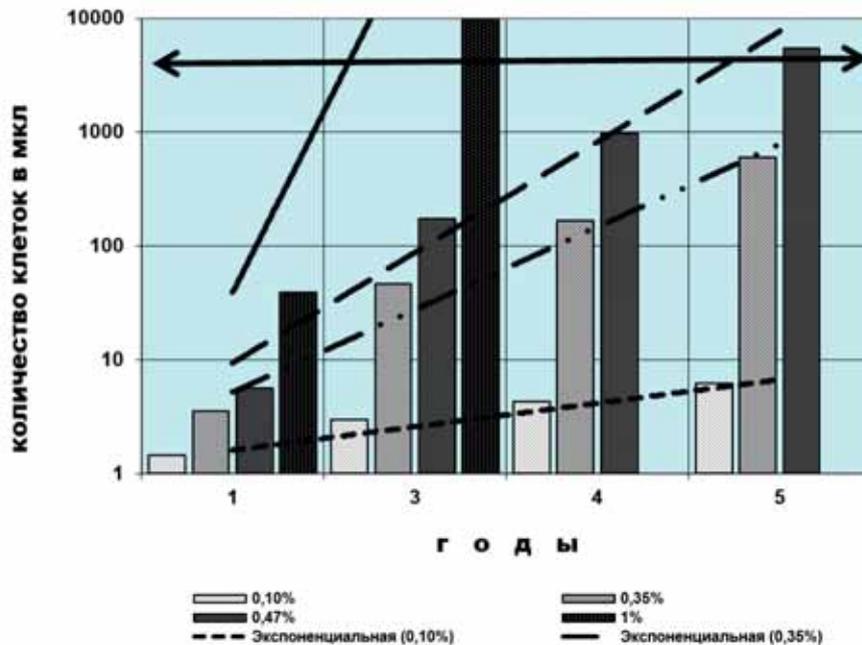


Рис. 4. Кинетика опухолевого роста и экспоненциальные тренды на модели хронического лимфоцитарного лейкоза человека в зависимости от скорости прироста (четыре последовательных столбца гистограмм): расчетное увеличение количества пролиферирующих лимфоцитов по накопительному итогу в течение пяти лет, начиная с одной трансформированной клетки, двойная стрелка – уровень 5000 клеток, вертикальная ось — количество лимфоцитов в логарифмическом масштабе

Fig. 4. Kinetics of tumor growth and exponential trends in a model of human chronic lymphocytic leukemia depending on the growth rate (four consecutive columns of histograms): calculated increase in the number of proliferating lymphocytes over a cumulative total over five years starting with one transformed cell, double arrow - level 5000 cells, the vertical axis is the number of lymphocytes on a logarithmic scale

Именно такой графический паттерн лимфопротективного процесса обуславливает облигатность неординарного по длительности инкубационного периода и экспоненциальную кинетику последующих стадий ЛКРС.

В отличие от транзиторных лейкомоидных реакций при воспалительных процессах, зачастую присутствующих у коров в условиях «не самого лучшего» содержания и эксплуатации (маститы, эндометриты, гнойная патология нижних отделов конечностей), лимфоцитоз при ЛКРС имеет персистентный характер. Стадия ГЕМ-позитивности в обычных зоотехнологических условиях отечественного животноводства с относительно непродолжительной продуктивной жизнью молочных коров (в среднем три лактации) не сопровождается какими-либо регистрируемыми клиническими отклонениями.

Но медленно прогрессирующий, неуклонный рост количества циркулирующих лимфоцитов со значительным превышением физиологических уровней (в исключительных случаях до многих десятков тысяч клеток в мкл крови) теоретически может приводить у более старых животных к драматическим последствиям, сходным с таковыми при хорошо изученных вирусных иммунодефицитах классического типа — СПИД'е человека и кошек (недостаточная защита от широко распространенных условно-патогенных микроорганизмов и оппортунистических инфекций, прежде всего маститов, факторных респираторных

и кишечных болезней, гнойно-воспалительной патологии).

Опухолевая стадия (конечная, летальная) с образованием лимфосарком за счет прогрессивного неконтролируемого накопления клона злокачественно перерожденных инфицированных лимфоцитов, увеличением лимфоидных (лимфоузлов, селезенки) и других внутренних органов наступает, как правило, в возрасте не менее восьми лет лишь у 1...5 % (см. рис. 1 и 4), то есть у старых животных [4]. Аналогичная возрастная подверженность онкологической патологии стереотипна и при ТКЛЧ [3, 18].

С точки зрения саморегуляции инфекционной паразитарной системы неблагоприятные хозяйственные группировки животных популяционно неоднородны по перечисленным трем стадиям течения ЛКРС в зависимости от их возрастного состава, зоотехнологической структуры, числа лактаций. Общеизвестно, что инфицированность КРС в молочном хозяйстве значительно возрастает, начиная с третьей лактации. Принципиальной особенностью эпизоотического процесса и энзоотичности ЛКРС является уже клинический диморфизм — (i) состояние скрытой инфицированности, абсолютное количественное и хронологическое преобладание инкубационного периода течения, по сути криптической формы инфекции на протяжении всей продуктивной жизни и (ii) собственно болезнь в патологическом смысле, чрезвычайно редкие, спорадические случаи манифестной формы лимфосаркоматоза,

возникающие и реально регистрируемые только у старых животных, за пределами продуктивного возраста, что иллюстрируется данными таблицы.

Суммарная характеристика частоты регистрации лимфосаркоматоза в некоторых странах [4] The total characteristic of the registration frequency lymphosarcomatosis in some countries [4]		
Страны	Годы	Средняя инцидентность, %, в числе убойного скота
Западная Германия	1985	1,0
Канада	1999–2014	0,5
США	1979–2007	0,8
Швеция	1960	1,0

Данное обстоятельство, то есть отсутствие патологии и прямого ущерба, создавало и создает реальные препятствия в контроле заболевания и эпизоотической обстановки в целом как с точки зрения профессиональной ветеринарии, так и прежде всего зоотехнологического менеджмента («нет болезни — нет проблемы»).

Провирусная нагрузка

Согласно многочисленным результатам исследований последних лет, количественную характеристику инфекционного процесса ЛКРС можно оценивать по аналогии с общепринятым титрованием биологической активности прочих возбудителей инфекций. Для этого определяется ПВН (proviral load) — число копий провируса в лимфоцитах в расчете на фикси-

рованное количество последних (или другие удельные показатели), определяемое с помощью ПЦР, начиная с самых ранних серонегативных и долейкемических этапов инфицирования [8, 10, 11, 15, 19, 25].

Фенотипическая характеристика В-лимфоцитов инфицированных, но клинически нормальных животных с ПВН > 100 копий на 10^5 клеток, показала наибольший процент клеток фенотипа $CD5^+IgM^+$, но не $CD5^+IgM^+$, Т-лимфоцитов $CD4^+$ и $CD8^+$. То есть популяция $CD5^+IgM^+$ В-лимфоцитов всех животных имела преобладающую ПВН по сравнению с другими клеточными популяциями, хотя провирус оставался интегрированным в геномную ДНК всех перечисленных клеток у инфицированных животных даже с ПВН < 100 копий на 10^5 клеток [20].

ПВН как интенсивный показатель инфекции *in vivo* сильно коррелирует с оценкой инфекционной активности вируса ЛКРС по другим патогенетическим элементам, в частности, образованию синцитиев, а также с прогрессированием $CD5^+IgM^+$ В-лимфоцитоза (рис. 5). У животных с низкой ПВН (число копий провируса до нескольких десятков на 10^5 лимфоцитов) очень низкой была и синцитий-образующая способность (единицы синцитиев на $5 \cdot 10^6$ лимфоцитов). Более высокой ПВН у других животных (от сотен до десятков тысяч) соответствовало высокое число синцитиев (также от сотен до десятков тысяч). Процентное содержание В-лимфоцитов фенотипа $CD5^+IgM^+$ было достоверно выше у животных с ПВН > 100 копий на 10^5 лимфоцитов (см. рис. 5) [20]. Эти данные ясно демонстрируют, что число копий провируса вируса ЛКРС возрастает с прогрессированием инфекции.

В развитие этих результатов принцип оценки индивидуальной ПВН предложен в качестве основы разработки новых подходов и способов контроля ЛКРС [10, 11]. По имеющимся данным, титр провируса ЛКРС в крови серопозитивных коров колеблется в

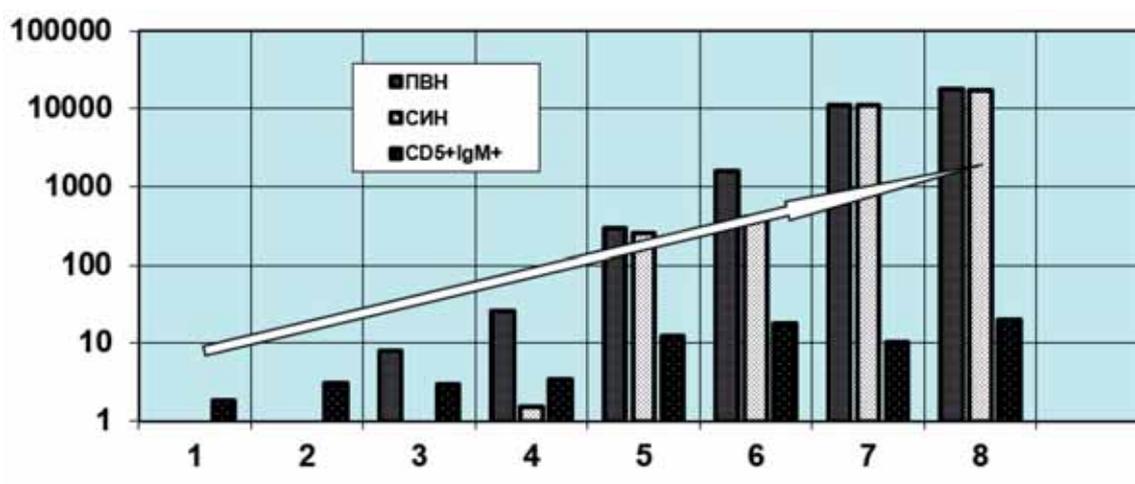


Рис. 5. Количественные корреляции основных патогенетических элементов ЛКРС. ПВН — число копий провируса на 10^5 лимфоцитов, СИН — число синцитиев на $5 \cdot 10^6$ лимфоцитов, $CD5^+IgM^+$ — количество, %, лимфоцитов этого фенотипа в общем пуле лимфоцитов крови. По вертикальной оси — количество лимфоцитов, по горизонтальной — 1...2 здоровые животные, 3...8 инфицированные [по 20]

Fig. 5. Quantitative correlations of the main pathogenetic elements of the bovine cattle. PVL is the number of copies of the provirus per 10^5 lymphocytes, SYN is the number of syncytia per $5 \cdot 10^6$ lymphocytes, $CD5^+ IgM^+$ is the % of lymphocytes of this phenotyp in the total pool of blood lymphocytes. On the vertical axis — the number of lymphocytes, on the horizontal — numbers of animals: 1...2 healthy, 3...8 infected [20]

диапазоне от 30 до $48\ 826 \cdot 10^4$ копий/мкл, то есть амплитуда индивидуальных различий — более 1 600 раз, или, в другом измерении — от 2 до более 2 000 копий на 50 нг геномной ДНК [17]. Это позволяет распределить животных в указанном диапазоне показателей на три группы опасности по содержанию копий провируса в мкл крови на уровне (i) десятков (очень низкая ПВН, контактной передачи инфекции не происходит), (ii) тысяч (низкая ПВН, передача инфекции непостоянна) и (iii) десятков тысяч (высокая ПВН у опасных супер-носителей), чего невозможно сделать с помощью серологических тестов. В прямых достоверных экспериментах подтверждено, что при совместном содержании 20 инфицированных коров первой группы, имеющих очень низкую ПВН, с группой из более 100 интактных коров передачи ЛКРС не происходило в течение 30 месяцев наблюдения. Аналогичные результаты получены при тестировании инфицированных быков. Преимущество данного подхода, основанного на применении ПЦР, особенно эффективного в количественном варианте (*real-time*), — возможность выявлять инфекцию задолго до обнаружения РИД-позитивности (несколько недель и месяцев) и независимо от присутствия материнских антител [1, 2, 21].

Актуальность и практическое значение результатов исследований ПВН при ЛКРС трудно переоценить. Поскольку риск передачи от алейкемичного скота различается в зависимости от ПВН, возникает возможность ускоренной и более чувствительной идентификации вируса ЛКРС и выявления реальных источников инфекции при проведении эрадикационных программ. Если алейкемичные животные с высокой ПВН могут быть источником инфекции столь же эффективным, как и лейкокемичные, то алейкемичные особи с низкой ПВН не представляют опасности в обычных условиях ведения животноводства.

Лейкоз регистрируют преимущественно в молочных стадах, и у большинства инфицированного скота заболевание протекает бессимптомно. Это способствует чрезвычайно высокому уровню превалентности во многих популяциях, однако генетический отбор резистентных животных выступает в качестве естественного фактора сдерживания распространения инфекции. Поэтому безальтернативная стратегия контроля ЛКРС — выявление и выбраковка зараженного скота не рациональна и не рентабельна для стад с высокой превалентностью.

Новый подход в ближайшей перспективе может существенно изменить жесткие программы контроля ЛКРС в сторону их либерализации: идентификация с помощью ПЦР инфицированных алейкемичных, в том числе серопозитивных животных, не являющихся источником инфекции, позволяет исключить чрезмерную и безальтернативную преждевременную выбраковку, минимизировать паравертикальное и горизонтальное распространение инфекции внутри стада с сохранением высокопродуктивного, генетически ценного и т. п. скота, сократить излишние потери.

Паравертикальная передача ЛКРС

Горизонтальная передача через контакты с биологическими жидкостями инфицированных животных — основное направление распространения ЛКРС, а скот

с высокой ПВН считается главным источником инфекции в стаде. Учитывая размерную «пропускную» способность плацентарного барьера и фактическое отсутствие в материнской крови внеклеточного инфекционного вируса ЛКРС независимо от уровня ПВН, реальность заражения плода во время пребывания в утробе матери минимальна и вообще сомнительна в контексте эпизоотического процесса.

Тем не менее, хотя лейкоз не специфичен для неонатального периода, телята подвергаются высокому риску заражения, особенно на молочных фермах, где они принимают молозиво и/или сырое молоко естественным или искусственным путем. По данным специальных исследований, не менее 10 % телят, рожденных инфицированными коровами, заражены при рождении, в большинстве случаев через вскармливание [8, 21]. Еще активнее (до 30 % и более) материнская передача ТКЛЧ [7, 12].

Фактические доказательства передачи инфекции в самом раннем возрасте на достоверном статистическом материале получены путем прямого выявления вируса ЛКРС с помощью ПЦР в рамках тестирования 15-дневных телочек в ходе широкомасштабных противолейкозных мероприятий. Эффективность передачи инфекции от коров потомству, выраженная как популяционный КВП отношением превалентности инфекции (РИД-позитивности) среди взрослого скота к ПЦР-позитивности телочек, оказалась различной в разных стадах и варьировалась в пределах целого порядка — от 0,07 до 0,72. Вариабельность КВП как эпизоотологический признак оказалась весьма существенной, и ее причины безусловно интересны. Помимо прочего, высокий КВП в отдельных стадах указывал на сомнительность вывода о колостральной защите потомства при ЛКРС, в частности, в устойчивости молодняка до 5...6-месячного возраста, что *a priori* вряд ли возможно для клеточно-ассоциированного вируса с интегративным типом вызываемой им инфекции [1, 2].

У телят, рожденных от коров с высокими уровнями ПВН и титров антител в крови, инфицированными мононуклеарными клетками с провирусом в молозиве, ПВН от низкой до высокой составляла более 1 % мононуклеарных клеток их периферической крови, возрастала в течение первых 12 месяцев и сохранялась на высоком уровне в течение многих лет. Достаточно высокие исходные титры молозивных антител в сыворотке телят от 5 до $8 \log_2$ (разведения 1:32...1:256) снижались в течение 3...6 месяцев и затем снова возрастали, что является прямым свидетельством приобретения инфекции не внутриутробно, а путем контакта во время родов или через потребление инфицированного молозива/молока (паравертикально). ПВН матерей достоверно коррелировала с частотой перинатальной передачи инфекции, достигающей, в прямой зависимости от этого, 40 % и более новорожденных телят [8, 16, 25].

Таким образом, телята — главный объект перемещения скота, будучи инфицированными в течение первой недели жизни могут играть активную роль в раннем распространении ЛКРС. Своевременная их идентификация и элиминация может предотвратить дальнейшую передачу инфекции молодым животным и их собственному потомству.

Заключение

В сложившейся ситуации по ЛКРС до последнего времени оставались объективные причины неблагополучия, требующие серьезной научной интерпретации и разрешения. Прежде всего, это сложность валидации и верификации результатов своевременного выявления инфицированных животных из-за отсутствия «золотого стандарта» — тестирования инфекционной активности вируса *in vitro*, клинических или патоморфологических признаков. Эффективность различных тестов, их сравнительная диагностическая чувствительность и специфичность могли быть объективно оценены только по последствиям их практического использования в условиях реальной эпизоотологии — срокам оздоровления неблагополучного хозяйства, которые с применением рутинной диагностики методом РИД занимают обычно десять и более лет [1, 2].

Вместе с этим зарубежные данные относительно трансмиссии, патогенеза, провирусной нагрузки, роли молодняка в патобиозе, отечественный и международный опыт вносят определенный оптимизм и свидетельствуют, что эпизоотологические перспективы ЛКРС не столь безутешны. Прямое быстрое обнаружение возбудителя (в состоянии провируса) с помощью ПЦР-тестирования, уже достаточно испытанное на полевом материале, апробированное наукой и спонтанно, самостоятельно применяемое в настоящее время на практике в ряде хозяйств, является единственно реальным направлением для эффективного оздоровления стад КРС от лейкоза и предупреждения распространения инфекции. Чрезвычайно важно, что ПЦР применима для обследования молодняка как самой критической группы риска, начиная с двухнедельного возраста. Своевременный вывод из оборота инфицированных телочек и их дальнейшее использование по различным сценариям позволяет минимизировать потери, быстро ликвидировать неблагополучие и обезопасить стадо (ферму) от возникновения случаев лейкоза КРС.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

References

- Makarov V.V., Grinishin D.P. E'pizootologicheskie perspektivy' lejkoza krupnogo rogatogo skota [Epizootological prospects for the bovine leucosis], *Vestnik Rossel' xozakademii [Herald of RAA]*, 2005, No. 2, pp. 70-73. (In russ.).
- Makarov V.V., Grinishin D.P. PCzR v diagnostike lejkoza krupnogo rogatogo skota [PCR in diagnostics of the bovine leucosis], *Veterinariya [Veterinary medicine]*, 2005, No. 4, pp. 9-11. (In russ.).
- Aida Y., Murakami H., Takahashi M., Takeshima S. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus, *Front. Microbiol.*, 2013, No. 4, pp. 328. doi: 10.3389/fmicb.2013.00328
- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), 2015. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis, *EFSA Journal*, 2015, Vol. 13(7), No. 4188, 63 p. doi:10.2903/j.efsa.2015.4188
- Hanon E., Stinchcombe J., Saito M., Asquith B., Taylor G., Tanaka Y., Weber J., Griffiths G., Bangham C. Fratricide among CD81 T Lymphocytes Naturally Infected with Human T Cell Lymphotropic Virus Type I, *Immunity*, 2000, Vol. 13, pp. 657-664.
- Höllsberg P., Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, No. 63, pp. 308-333.
- Hoshino H. Cellular factors involved in HTLV-1 entry and pathogenicity. *Front. Microbiol.*, 2012, No. 3, pp. 222. doi: 10.3389/fmicb.2012.0022.
- Gutiérrez G., Merlini R., Alvarez R., Rondelli F., Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection, *BMC Veterinary Research*, 2014, No. 10(1), pp. 82. doi: 10.1186/1746-6148-9-95.
- Igakura T., Stinchcombe J., Goon P., Taylor G., Weber J., Griffiths G., Tanaka Y., Osame M., Bangham C., Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton, *Science*, 2003, No. 299, pp. 1713-1716.
- Juliarena M., Barrios C., Lützelshwab C., Esteban E., Bovine leukemia virus: current perspectives, *Virus Adaptation and Treatment*, 2017, Vol. 9, pp. 13-26. doi.org/10.2147/VAAT.S113947
- Juliarena M., Gutierrez S., Ceriani C., Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis, *Am. J. Vet. Res.*, 2007 Nov, No. 68 (11), pp. 1220-5. DOI: 10.2460/ajvr.68.11.1220
- Kajiyama W., Kashiwagi J., Ikematsu H., Hayashi H., Nomura H., Okōchi K., Intrafamilial clustering of anti-ATLA-Positive persons, *Am J Epldemiol*, 1988, No. 124, pp. 800-806.
- Maguer-Satta V., Duc Dodon M., Human immature thymocytes as target cells of the leukemogenic activity of human T-cell leukemia virus type I, *Blood*, 1995, No. 86(4), pp. 1444-1452. DOI: 10.1182/blood.
- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2019 <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Mazzarello A., Fitch M., Hellerstein M., Chiorazzi N., Measurement of Leukemic B-Cell Growth Kinetics in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia, *Methods Mol. Biol.*, 2019, No. 1881, pp. 129-151. doi: 10.1007/978-1-4939-8876-1_11.
- Mekata H., Sekiguchi S., Konnai S., Kirino Y., Honkawa K., Nonaka N., Horii Y., Norimine J., Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus, *Vet. Record.*, 2015, No. 176(10), pp. 274. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.102464>
- Mekata H., Yamamoto M., Hayashi T., Kirino Y., Sekiguchi S., Konnai S., Horii Y., Norimine J., Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source, *Japanese J. of Vet. Res.*, 2018, No. 66(3), pp. 157-163. doi: 10.14943/jivr.66.3.157
- Messmer B., Messmer D., Allen S., Kudalkar P., Cesar D., Murphy E., Koduru P., Ferrarini M., Zupo S., Cutrona G., Damle R., Wasil T., Rai K., Hellerstein M., Chorazzi N., In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells, *J. Clin. Invest.*, 2005 Mar, No. 115(3), pp. 755-764.
- Mirsky M., Olmstead C., Da Y., Lewin H., The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection, *J. Virol.*, 1996, No. 70 (4), pp. 2178-2183.
- Panei C.J., Takeshima S.N., Omori T., Nunoya T., Davis W., Ishizaki H., Matoba K., Aida Y., Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leukosis using BLV-CoCoMo-qPCR, *BMC Vet. Res.* 2013; No. 9. doi: 10.1186/1746-6148-9-95.
- Ruiz V., Porta N., Lomónaco M., Trono K., Alvarez I., Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves. Risk Factors and Control Measures. *Front. Vet. Sci.*, 2018, No. 5, pp. 267. doi: 10.3389/fvets.2018.00267.
- Samitas K., Lötvall J., Bossios A. B cells: from early development to regulating allergic diseases, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2010, Vol. 58, Is. 3, pp. 209-225. doi:10.1007/s00005-010-0073-2.
- Schwartz I., Bensaid A., Polack B., Perrin B., Berthelemy M., Levy D., In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle, *Journal of Virology*, 1994, No. 68 (7), pp. 4589-96, doi: 10.1128/JVI.68.7.4589-4596.1994.
- Sherer N., Lehmann M., Jimenez-Soto L., Horensavitz C., Pypaert M., Mothes W., Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission, *Nat Cell Biol.*, 2007, No. 9, pp. 310-315. [PubMed: 17293854].
- Watanuki S., Takeshima S., Borjigin L., Sato H., Bai L., Murakami H., Aida Y., Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. *Vet Res.*, 2019 Nov, Vol. 29, No. 50(1), pp. 102. doi: 10.1186/s13567-019-0724-1.