

Проблемы диагностики инфекционных агентов

УДК 636.2:575.174.015.3:578.2:577.2.08:51-76

doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.391rus

**ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ И ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ У КОРОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ
Anaplasma marginale И ВИРУСОМ БЫЧЬЕГО ЛЕЙКОЗА**Г.Ю. КОСОВСКИЙ¹, В.И. ГЛАЗКО^{1, 2}, С.Н. КОВАЛЬЧУК¹, Т.Т. ГЛАЗКО^{1, 2}

Глобальное распространение инфекционных заболеваний вместе с широким импортом генетических ресурсов крупного рогатого скота приводит к необходимости разрабатывать методы выявления инфицированных особей, опасностей одновременных инфекций разными патогенами и их влияния на адаптивный потенциал животных. В этой связи в настоящей работе выполнен анализ изменчивости диагностических эритроцитарных и лейкоцитарных характеристик (морфологический состав крови, объем и диаметр эритроцитов) у специализированного молочного черно-пестрого голштинизированного скота, естественно инфицированного возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота *Anaplasma marginale* и вирусом бычьего лейкоза (Bovine leukemia virus, BLV). Обнаружено, что инфицирование животных BLV не способствует перекрестному заражению анаплазмозом; более того, среди свободных от *A. marginale* особей больше половины были инфицированы BLV и почти у трети отмечали выраженный лейкоцитоз. За исключением повышенного числа лейкоцитов и лимфоцитов, связанного с ретровирусной инфекцией, свободные от бактериальной инфекции животные отличались от инфицированных только отсутствием статистически достоверной корреляции между числом эритроцитов и нейтрофилов, что позволяет предположить активацию у инфицированной *A. marginale* группы механизмов неспецифического иммунного ответа. При тестировании животных на инфицированность BLV в реакции иммунодиффузии (РИД) и с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) обнаружено, что у одной РИД-отрицательной коровы в геноме присутствовала провирусная ДНК; у 7 из 34 РИД-положительных коров провирусная ДНК отсутствовала. При этом только у 6 РИД-положительных особей с провирусной ДНК BLV выявлен лейкоцитоз (более 20×10^9 кл/л). При инфицированности BLV единственной общей характеристикой для животных с умеренным и высоким лейкоцитозом оказался тромбоцитоз, а также разрушение корреляционных взаимоотношений между представленностью агранулоцитов и гранулоцитов в периферической крови. По-видимому, именно такое нарушение сетевых взаимодействий между различными популяциями лейкоцитов отражает глубокие функциональные изменения иммунной системы, индуцируемые ретровирусным инфекционным процессом. У коров с выраженным лейкоцитозом наблюдали дефицит нейтрофилов, что совпадает с данными литературы (M. Nishiike et al., 2016) о нейтрофилопении в молоке инфицированных BLV коров с лейкоцитозом. Отсутствие методов, исключающих ложноположительные или ложноотрицательные результаты выявления инфицированных BLV животных, позволяет полагать, что наиболее эффективным подходом для оздоровления стад может быть одновременная оценка вирусной нагрузки (количества вирусной РНК BLV в периферической крови) с выраженностью лейкоцитоза.

Ключевые слова: анаплазмоз, вирус бычьего лейкоза, вирусная нагрузка, лейкоцитоз, нейтропения, эритроцитарные и лейкоцитарные характеристики.

Одну из глобальных ключевых проблем современного животноводства составляют потери от инфекционных заболеваний (1, 2). Существенно изменить ситуацию не удастся, несмотря на совершенствование вакцин и антибиотиков и их активное применение. Предполагается, что более перспективным направлением может стать формирование групп животных с повышенной устойчивостью к наиболее распространенным патогенам. Однако для этого необходимы углубленные представления о механизмах развертывания инфекционного процесса и ключевых звеньях взаимодействия между патогеном и организмом хозяина.

В молочном скотоводстве самая распространенная причина экономических убытков — инфицированность вирусом энзоотического бычьего лейкоза (*Bovine leukemia virus*, BLV) (3, 4). В некоторых странах Южной Америки, например в Аргентине, 90,9 % стад крупного рогатого скота (КРС) заражено BLV (5). В связи со сложным влиянием на иммунную систему хозяина до сих пор не удается разработать методы эффективной вакцинации жи-

вотных, защищающей их от этого ретровируса (6, 7). Контроль распространения BLV дополнительно осложняется тем, что, как правило, иммунная система хозяина осуществляет негативную селекцию против В-лимфоцитов, продуцирующих полноразмерные вирусные частицы (8). Для того чтобы предупредить распространение BLV, предложены различные программы по выявлению инфицированных животных на основании идентификации антител к BLV в периферической крови и (или) провирусной ДНК в геномах. В дополнение к иммунологическому и генетическому тестам применяют подсчет лимфоцитов в периферической крови животных. Сочетание всех трех методов наиболее эффективно и позволяет повысить надежность выявления инфицированных коров (1). Однако нужно учитывать, что инфицированность животных BLV часто сопровождается повышением чувствительности к бактериальным инфекционным агентам, таким как *Mycobacterium bovis* (9), к *Escherichia coli* (10), ростом заболеваемости маститом (11), что может, в свою очередь, приводить к изменению числа лейкоцитов в периферической крови.

Анаплазмоз крупного рогатого скота, вызываемый *Anaplasma marginale* (отряд *Rickettsiales*, семейство *Anaplasmataceae*), — еще один источник значительных экономических потерь в животноводстве (12-14). Частота зараженности КРС этим патогеном зависит от географического региона. Так, в государствах Северной Африки, например в Марокко и Тунисе, она составляет соответственно 25,4 и 29,1 % (15, 16), тогда как в странах Центральной и Южной Африке этот показатель колеблется от 38 до 100 % (17, 18). В Российской Федерации, согласно ветеринарной отчетности, к неблагополучным по анаплазмозу относятся южные области России, Брянская, Калужская, Рязанская, Калининградская, Саратовская, Тюменская, Владимирская, Нижегородская, Новосибирская и Ульяновская области, Алтайский край (19). Так, зараженность крупного рогатого скота *A. marginale* на юге Тюменской области составляет 21,4-56,0 % (20). В разных климато-географических регионах летальность при анаплазмозе КРС также неодинакова и колеблется от 10-30 % (21, 22) до 100 % (23). *A. marginale* относится к эритроцитарным паразитам. Доля пораженных эритроцитов при острой стадии анаплазмоза КРС может составлять 70 % и выше (24, 25), степень паразитемии в крови — более 10^9 кл/мл (26-28). К основным клиническим проявлениям анаплазмоза относится анемия с уменьшением числа эритроцитов до $1,5 \times 10^6$ /мм³, гемоглобина — до 4-2 г% (21) и желтуха, развивающиеся вследствие разрушения эритроцитов клетками ретикулоэндотелиальной системы (29, 30). Другими симптомами могут быть лихорадка, снижение живой массы, нарушение работы сердечно-сосудистой системы (аритмичный пульс) и желудочно-кишечного тракта (атония преджелудков, запоры); при тяжелой форме отмечают аборт, мышечную дрожь и судороги (12, 19). Минимальная заражающая доза *A. marginale*, приводящая к развитию клинических признаков, составляет $1,5 \times 10^5$ (21), однако у штаммов *A. marginale* это значение может различаться. Переболевшие животные становятся пожизненно анаплазмоносителями, для которых характерна степень риккетсемии 10^2 - 10^7 анаплазм на 1 мл крови (28).

Механизмы иммунного ответа на инвазию *A. marginale* изучены недостаточно полно, но известно, что у КРС активируются CD4+ Т-лимфоциты, секретирующие γ -интерферон, а также выработка антител IgG1 и IgG2 (преимущественно к иммунодоминантному и гипервариабельному поверхностному белку MSP2 *A. marginale*, а также к белкам MSP1, MSP3, MSP4 и MSP5) (31-35). Предполагается, что действие антител направлено на нейтрализацию клеток *A. marginale* до их внедрения в эритроциты и (или) на опсонизацию с последующим фагоцитозом макрофагами (22).

В последние годы в качестве маркеров хронического воспаления, связанного, в том числе, с преднеопластическими состояниями при различных заболеваниях, широко используются соотношение числа нейтрофилов и лимфоцитов, число тромбоцитов и изменчивость эритроцитов по морфологическим характеристикам (36). Эти параметры можно определить на автоматическом гемоанализаторе, что позволяет получать достаточно объективные данные о модификациях гемопоэза при развитии патологии.

Для того чтобы оценить чувствительность скота, инфицированного BLV, к бактериальным инфекциям, и сопутствующие этому изменения морфологических показателей крови, в настоящей работе мы впервые протестировали коров голштинизированной черно-пестрой породы на присутствие провирусной ДНК BLV в геномах и *A. marginale* — в эритроцитах с учетом клеточного состав периферической крови (численность эритроцитов и лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов). Кроме того, сравнили средний объем и гетерогенность эритроцитов по диаметру (анизоцитоз) как показатели, отражающие изменение состояния (например, при приеме ряда антимикробных препаратов) и развитие патологий, включая гормональные отклонения, нарушения в работе костного мозга при лейкоцитозе, некоторые злокачественные заболевания. Обнаружено, что инфицирование животных BLV не способствует перекрестному заражению анаплазмой, более того, среди свободных от *A. marginale* больше половины животных инфицированы BLV и почти у трети выражен лейкоцитоз.

Цель работы заключалась в изучении изменчивости эритроцитарных и лейкоцитарных характеристик у специализированного молочного скота, естественно инфицированного *Anaplasma marginale* и вирусом бычьего лейкоза *Bovine leukemia virus*.

Методика. Кровь для исследования отбирали из яремной вены у черно-пестрых голштинизированных коров (67 гол.) в возрасте 2-5 лет (ЗАО «Можайское», Московская обл.).

Эритроцитарные и лейкоцитарные профили и характеристики эритроцитов определяли на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus junior Vet5 («Diatron», Австрия; принцип работы основан на методе Культера). Использовали индивидуальные образцы свежей цельной периферической крови каждого животного (100 мкл), стабилизированной EDTA.

Носителей провирусной ДНК BLV выявляли с использованием радиальной иммунодиффузии по Манчини (РИД) и методом ПЦР, разработанным нами ранее (37). Методы оценки инфицированности животных *A. marginale* и степени риккетсемии подробно описаны нами ранее (38, 39).

Данные анализировали в программе Statistica 6.0 («StatSoft Inc.», США). Значимыми считали различия при $P < 0,05$. В таблицах приведены средние арифметические (\bar{X}) и ошибки средних арифметических (x).

Результаты. Из 20 особей, свободных от провирусной ДНК BLV по двум тестам (реакция иммунодиффузии — РИД и ПЦР), 13 (65 %) были инфицированы *A. marginale*, а из 22 носителей провирусной ДНК BLV *A. marginale* выявили у 11 (50 %). То есть в группе животных, инфицированных BLV, не наблюдалось повышенной чувствительности к *A. marginale*.

Анализируя вовлеченность разных популяций клеток периферической крови в развитие инфекции *A. marginale*, мы определили их представленность у инфицированных *A. marginale* и свободных от инфекции коров (табл. 1). Согласно прилагаемым рекомендациям производителя гемоанализатора, все изученные показатели соответствовали физиологической норме для вида *Bos taurus*, за исключением явно повышенного содержания лейкоцитов у коров, не инфицированных бактериальным патогеном. То, что у

инфицированных *A. marginale* животных число эритроцитов тоже оставалось в пределах нормы, может объясняться персистирующей стадией инфекционного процесса, на что указывали характерные при анаплазмозителестве значения риккетсемии (от $1,58 \times 10^5$ до $2,31 \times 10^6$ /мл крови) (28).

Статистически достоверные различия ($P < 0,05$) между инфицированными и свободными от *A. marginale* особями проявились только по лейкоцитам и лимфоцитам — в сторону уменьшения их популяции у инфицированных животных (см. табл. 1). Очевидно, что эти различия обусловлены тем, что в группу не инфицированных бактериальным патогеном попали инфицированные BLV животные с высоким лейкоцитозом (см. табл. 1). При этом из 6 коров с высоким лейкоцитозом ($> 20 \times 10^9$ /л) лишь одна была заражена *A. marginale*, а 5 вошли в группу из 18 особей, свободных от анаплазмы. Следовательно, изменения в профилях популяций лейкоцитов, индуцируемые BLV, не повышали вероятность инфицирования *A. marginale*.

1. Эритроцитарные и лейкоцитарные профили периферической крови у чернопестрых голштинизированных коров, инфицированных *Anaplasma marginale* и свободных от инфекции ($\bar{X} \pm x$, ЗАО «Можайское», Московская обл.)

Показатель	Допустимые пределы для <i>Bos taurus</i>	Не инфицированные <i>A. marginale</i>		Инфицированные <i>A. marginale</i> ($n = 23$)
		всего ($n = 18$)	свободные от <i>Bovine leukemia virus</i> ($n = 7$)	
Клеточная популяция:				
эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	5-10	6,53 \pm 0,18	6,83 \pm 0,18	6,23 \pm 0,18
лейкоциты, $\times 10^9$ /л	4-12	15,21 \pm 1,63*	10,18 \pm 0,67	10,87 \pm 0,98*
лимфоциты, $\times 10^9$ /л	2,5-7,5	9,85 \pm 1,77*	4,85 \pm 0,83	5,62 \pm 1,00*
моноциты, $\times 10^9$ /л	0-0,84	0,74 \pm 0,17	0,52 \pm 0,11	0,34 \pm 0,08
нейтрофилы, $\times 10^9$ /л	0,6-6,7	4,07 \pm 0,69	4,54 \pm 0,48	4,41 \pm 0,50
эозинофилы, $\times 10^9$ /л	0,1-1,0	0,51 \pm 0,09	0,45 \pm 0,05	0,49 \pm 0,06
базофилы, $\times 10^9$ /л	0-0,5	0,0089 \pm 0,0011	0,0110 \pm 0,0010	0,0104 \pm 0,0020
тромбоциты, $\times 10^9$ /л	100-800	87,72 \pm 35,23	10,29 \pm 6,32	86,91 \pm 33,94
Морфология эритроцитов:				
средний объем, ф	40-60	45,56 \pm 0,89	44,86 \pm 0,82	45,00 \pm 0,73
изменчивость по диаметру, %		19,66 \pm 0,33	20,83 \pm 0,40	19,63 \pm 0,38

* Различия между инфицированными и свободными от инфекции особями статистически значимы при $P < 0,05$.

По эритроцитарной компоненте у неинфицированных животных статистически достоверными ($P < 0,05$) были корреляции между числом эритроцитов и эозинофилов ($r = -0,5$), эритроцитов и тромбоцитов ($r = -0,5$); между гетерогенностью эритроцитов по диаметру и числом лейкоцитов ($r = -0,5$), лимфоцитов ($r = -0,5$), тромбоцитов ($r = -0,6$) и базофилов ($r = +0,6$). То есть у неинфицированных животных наблюдалась взаимосвязь между увеличением числа эритроцитов и уменьшением — эозинофилов и тромбоцитов (маркеры воспалительных процессов), а повышенная изменчивость эритроцитов по морфологии коррелировала с пониженной представленностью лейкоцитов и лимфоцитов. Несколько иные достоверные корреляционные взаимоотношения выявили у инфицированных животных: между числом эритроцитов и нейтрофилов — $r = +0,5$, эритроцитов и базофилов — $r = +0,5$; между гетерогенностью эритроцитов по диаметру и числом базофилов — $r = +0,4$, числом тромбоцитов — $r = -0,7$ и средним объемом эритроцитов — $r = -0,6$. Положительная корреляция числа эритроцитов и нейтрофилов позволяет предположить активацию неспецифического иммунного ответа у инфицированных *A. marginale* коров.

Таким образом, общепринятое представление, что инфицирование животных одним патогеном, сопровождаемое изменением иммунореактивности, способствует повышению чувствительности к другому, в случае инфекций *A. marginale* и BLV не получает подтверждения. В целом это соответствует заключению ряда авторов о том, что каждый инфекционный

агент специфически взаимодействует с иммунной системой хозяина, и для разных патогенов такие механизмы часто не пересекаются (40).

Инфицированность животных ретровирусом BLV (без учета наличия анаплазмы, поскольку ее присутствие, судя по представленным данным, не меняет численного соотношения клеточных популяций) (см. табл. 1) оценивали в традиционном тесте на наличие антител к белкам оболочки BLV в периферической крови (РИД) и по интеграции провирусной ДНК BLV в геном хозяина. Из 67 исследованных коров 33 были серонегативными в РИД, но при этом у одной в геноме содержалась провирусная ДНК BLV. У 7 из 34 животных с положительным результатом в РИД отсутствовала провирусная ДНК BLV. Эти данные соответствуют выводам выполненных нами ранее исследований, в которых также не наблюдали полного совпадения между оценками инфицированности животных в РИД и результатами обнаружения провирусной ДНК BLV (41). Следует отметить, что такое несовпадение наблюдалось при использовании для выявления интеграции провирусной ДНК BLV разных вирусных генов (*env*, *gag*, *pol*). Полученные данные согласуются с недавним сообщением М. Nishiike и соавт. (1). Обследовав 774 коровы, они показали, что у 7 % животных при наличии в крови антител к BLV провирусная ДНК BLV, присутствие которой в геноме животных оценивали по наличию нуклеотидных последовательностей вирусного гена *tax*, не выявлялась.

Не исключено, что в основе такого расхождения могут лежать различия между животными по числу В-лимфоцитов, инфицированных BLV, и иммунному ответу на инфекцию. В этой связи мы сравнили распределение популяций клеток периферической крови у инфицированных и неинфицированных BLV коров (табл. 2).

2. Эритроцитарные и лейкоцитарные профили периферической крови у чернопестрых голштинизированных коров, свободных от инфекции и инфицированных вирусом бычьего лейкоза при разном развитии лейкоцитоза ($\bar{X} \pm x$, ЗАО «Можайское», Московская обл.)

Показатель	РИД ⁻ , BLV ⁻ (n = 21)	РИД ⁺ , BLV ⁺	
		без высокого лейкоцитоза (n = 18)	с максимальным лейкоцитозом (n = 6)
Клеточная популяция:			
эритроциты, $\times 10^{12}/л$	6,59 \pm 0,19	6,15 \pm 0,17	6,34 \pm 0,36
лейкоциты, $\times 10^9/л$	10,00 \pm 0,56	11,73 \pm 0,88	25,49 \pm 1,01
лимфоциты, $\times 10^9/л$	4,14 \pm 0,24	6,12 \pm 0,73*	21,70 \pm 1,08**
моноциты, $\times 10^9/л$	0,35 \pm 0,06	0,28 \pm 0,09*	1,61 \pm 0,24*
нейтрофилы, $\times 10^9/л$	5,10 \pm 0,44	4,63 \pm 0,83**	1,66 \pm 0,36**
эозинофилы, $\times 10^9/л$	0,43 \pm 0,06	0,59 \pm 0,09	0,51 \pm 0,18
базофилы, $\times 10^9/л$	0,0119 \pm 0,0011	0,0088 \pm 0,0027	0,0067 \pm 0,0021
тромбоциты, $\times 10^9/л$	12,90 \pm 9,91	160,81 \pm 47,55**	122,33 \pm 78,28**
Нейтрофилы:лимфоциты	1,26 \pm 0,10	0,88 \pm 0,21*	0,08 \pm 0,02*
Морфология эритроцитов:			
средний объем, fl	44,19 \pm 0,83	46,12 \pm 0,86	46,50 \pm 1,09
изменчивость по диаметру, %	20,84 \pm 0,27	18,55 \pm 0,34	18,83 \pm 0,31

Примечание. РИД — реакция иммунодиффузии, BLV — вирус бычьего лейкоза (определяли по наличию провирусной ДНК в геноме методом ПЦР).

*, ** Соответственно $P < 0,05$ и $P < 0,01$ — пороги статистической достоверности различий между инфицированными и свободными от инфекции BLV особями.

У животных с высоким лейкоцитозом наблюдалось статистически достоверное ($P < 0,05$) повышение числа лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов, понижение — нейтрофилов и, соответственно, соотношения числа нейтрофилов и лимфоцитов. У инфицированных BLV коров без выраженного лейкоцитоза существенные отличия от неинфицированных обнаруживались только по числу тромбоцитов (см. табл. 2). При этом у 7 коров с РИД⁺, но без встройки провирусной ДНК BLV распределение клеточных популяций в периферической крови соответствовало физиологической

норме (табл. 3). Особенностью этой группы животных оказался необычно высокий статистически достоверный ($P < 0,05$) коэффициент корреляции между числом лейкоцитов и нейтрофилов ($r = 0,871178$).

3. Распределение клеток периферической крови у черно-пестрых голштинизированных коров с антителами к вирусу бычьего лейкоза в отсутствие провирусной ДНК ($n = 7$, $X \pm x$, ЗАО «Можайское», Московская обл.)

Клеточная популяция	Показатель
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	6,40 \pm 0,19
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	8,11 \pm 0,47
Лимфоциты, $\times 10^9/л$	3,57 \pm 0,13
Моноциты, $\times 10^9/л$	0,31 \pm 0,10
Нейтрофилы, $\times 10^9/л$	3,59 \pm 0,61
Эозинофилы, $\times 10^9/л$	0,64 \pm 0,13
Базофилы, $\times 10^9/л$	0,0042 \pm 0,0020

Примечание. Наличие антител определяли в реакции иммунодиффузии (РИД), провирусной ДНК вируса бычьего лейкоза в геноме коров — методом ПЦР.

У коров, свободных от BLV (по результатам РИД и отсутствию провирусной ДНК) обнаружилось множество положительных корреляций между числом агранулоцитов и гранулоцитов, а также тромбоцитов (табл. 4): между числом лимфоцитов и моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов, лимфоцитов и базофилов, моноцитов и эозинофилов, нейтрофилов и базофилов, эозинофилов и базофилов, моноцитов и тромбоцитов, эозинофилов и тромбоцитов (см. табл. 4). То

есть у животных, свободных от инфекции, изменения в представленности производных белого ростка в периферической крови были тесно взаимосвязаны. Инфицированность BLV (РИД⁺ и встройка провирусной ДНК) сопровождалась фактическим разрушением всех этих положительных корреляций в группе клеток белого ростка крови. У зараженных особей проявлялись положительные корреляции между числом лимфоцитов и моноцитов, отрицательные — базофилов и тромбоцитов, лимфоцитов и моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов. В группе инфицированных коров при относительно низком лейкоцитозе статистически достоверными были только две корреляции: положительная — между размером популяций лимфоцитов и моноцитов, отрицательная — базофилов и тромбоцитов, а на фоне высокого лейкоцитоза ($> 20 \times 10^9/л$) сохранялась только одна статистически достоверная негативная корреляция — для соотношения лимфоцитов и базофилов.

4. Коэффициенты корреляции между числом агранулоцитов, гранулоцитов и тромбоцитов в образцах периферической крови у черно-пестрых голштинизированных коров, свободных от вируса бычьего лейкоза ($n = 20$, ЗАО «Можайское», Московская обл.)

Клеточная популяция	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Тромбоциты
Лимфоциты	1,000000	0,514220*	0,507795*	0,382689	0,591109*	0,064150
Моноциты	0,514220*	1,000000	-0,244767	0,675024*	0,147069	0,488814*
Нейтрофилы	0,507795*	-0,244767	1,000000	0,151900	0,626046*	-0,285535
Эозинофилы	0,382689	0,675024*	0,151900	1,000000	0,464138*	0,558992*
Базофилы	0,591109*	0,147069	0,626046*	0,464138*	1,000000	-0,055497
Тромбоциты	0,064150	0,488814*	-0,285535	0,558992*	-0,055497	1,000000

Примечание. У животных не выявлялись антитела к вирусу бычьего лейкоза в реакции иммунодиффузии и провирусная ДНК в геноме при определении методом ПЦР.

* Корреляции статистически значимы при $P < 0,05$.

В целом, с учетом физиологической нормы для разных популяций клеток периферической крови выраженные отличия инфицированных BLV животных от контрольной группы проявились в тромбоцитозе, на фоне лейкоцитоза — в резком падении количества нейтрофилов.

Нейтрофилы формируют первую линию клеточной защиты от патогенов, в значительной мере обеспечивая врожденный иммунитет против микроорганизмов. При фагоцитировании патогена нейтрофилы продуцируют свободные радикалы, которые его разрушают. Обнаружено, что в молоке коров, зараженных BLV, содержание нейтрофилов существенно умень-

шается (11), при этом для особей с лейкоцитозом и высокой нагрузкой провирусной ДНК BLV характерна пониженная экспрессия γ -интерферона (IFN- γ) моноцитами периферической крови. IFN- γ способствует фагоцитозу и продукции свободных радикалов нейтрофилами, что может, в частности, объяснять снижение функции нейтрофилов наряду с уменьшением их количества у инфицированных BLV коров. В ранних публикациях также отмечался тот факт, что сыворотка крови инфицированных BLV коров подавляет фагоцитарную активность нейтрофилов (42).

Накоплен большой объем данных о выраженном влиянии экспрессии провирусной ДНК BLV, в частности гена *tax*, на клеточную стресс-реактивность, апоптоз, темпы клеточного обновления, иммунную систему инфицированных животных (7, 43, 44). Ранее нами было показано, что именно у животных с высоким лейкоцитозом удается выявить экспрессию вирусной РНК BLV в RT-PCR (4). Эти данные совпадают с результатами многих исследователей, в частности японских, которые обнаружили наибольшее количество вирусной РНК BLV в периферической крови коров с самым высоким лейкоцитозом (1). Очевидно, что повышенная экспрессия провирусной ДНК BLV, которая сопровождается лейкоцитозом, неизбежно будет приводить к изменениям сетевых взаимоотношений между различными популяциями лейкоцитов, что мы наблюдали в своем исследовании.

Таким образом, выявленная нами распространенность сочетанной инфекции BLV и *A. marginale* и изменения в клеточных популяциях периферической крови коров не отражают взаимного увеличения чувствительности к этим патогенам. Одна из особенностей профилей популяции лейкоцитов (в основном, соответствующих норме), отличающая инфицированных *A. marginale* коров от неинфицированных, — статистически достоверная положительная корреляция между числом эритроцитов и нейтрофилов.

В отношении BLV полученные данные свидетельствуют о том, что ни один из имеющих к настоящему времени методов подтверждения инфицированности этим вирусом (обнаружение антител к антигенам BLV в РИД, ПЦР-анализ на наличие провирусной ДНК BLV, превышение числа лейкоцитов относительно физиологической нормы $10-12 \times 10^9/\text{л}$) не исключает ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Самое существенное отличие при инфицированности BLV (даже на фоне низкого лейкоцитоза) заключается в исчезновении существующих в норме корреляционных связей между размером разных популяций лейкоцитов, свидетельствующее о разрушении сетевых взаимоотношений между ними. Обращает на себя внимание то, что у животных с высоким лейкоцитозом наблюдается выраженная нейтрофилопения, что совпадает с данными литературы об изменении содержания нейтрофилов в молоке на фоне инфицированности BLV и высокого лейкоцитоза (11). Учитывая необходимость в более простом способе выявления наиболее инфекционно опасных животных в промышленных условиях, по-видимому, целесообразно одновременно оценивать вирусную нагрузку (количество вирусной РНК BLV в периферической крови) и выраженность лейкоцитоза.

Итак, инфицирование вирусом бычьего лейкоза (BLV) не способствует перекрестному заражению *Anaplasma marginale*. Статистически достоверные корреляции ($P < 0,05$) по эритроцитарной компоненте у неинфицированных и инфицированных анаплазмой животных неодинаковы, а положительная связь между количеством эритроцитов и нейтрофилов позволяет предположить активацию неспецифического иммунного ответа при инфекции *A. marginale*. Инфицированность BLV приводит к разрушению всех имеющихся положительных корреляций между размером популяций

клеток белого ростка крови, наблюдаемых у неинфицированных особей. Выраженные достоверные различия проявляются в развитии тромбоцитоза, а у особей с лейкоцитозом — в резком падении количества нейтрофилов. При выявлении в стадах инфекционно опасных по BLV животных наиболее целесообразно оценивать степень лейкоцитоза в сочетании с вирусной нагрузкой (количеством РНК BLV в периферической крови).

¹ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии
и репродуктивных биотехнологий,
127422 Россия, г. Москва, ул. Костякова, 12, стр. 4,
e-mail: vigvalery@gmail.com, gkosovsky@mail.ru, s.n.kovalchuk@mail.ru,
tglazko@rambler.ru;
²ФГБОУ ВПО Российский государственный
аграрный университет—МСХА им. К.А. Тимирязева,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

Поступила в редакцию
5 декабря 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 2, pp. 391-400

CHANGES IN LEUKOCYTE AND ERYTHROCYTE BLOOD PROFILE AND PARAMETERS UNDER A COMBINED *Anaplasma marginale* AND BOVINE LEUKEMIA VIRUS INFECTION IN CATTLE

G. Yu. Kosovskii¹, V.I. Glazko^{1, 2}, S.N. Koval'chuk¹, T.T. Glazko^{1, 2}

¹Center for Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology, Federal Agency of Scientific Organizations, 12/4, ul. Kostyakova, Moscow, 127422 Russia, e-mail vigvalery@gmail.com, gkosovsky@mail.ru, s.n.kovalchuk@mail.ru, tglazko@rambler.ru (corresponding author);

²K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University—Moscow Agrarian Academy, 49, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia

ORCID:

Kosovskii G.Yu. orcid.org/0000-0003-3808-3086

Koval'chuk S.N. orcid.org/0000-0002-5029-0750

Glazko V.I. orcid.org/0000-0002-8566-8717

Glazko T.T. orcid.org/0000-0002-3879-6935

The authors declare no conflict of interests

Received December 5, 2016

doi: 10.15389/agrobiologia.2017.2.391eng

Abstract

The global spread of infectious diseases and large-scale import of cattle genetic resources lead to necessity of developing screening methods that estimate the danger of co-infection with different pathogens and its impact on animal adaptiveness. In this regard here we analyzed the variability of erythrocyte and leukocyte characteristics in dairy Black-and-White holsteinized cattle naturally infected by *Anaplasma marginale*, the causative agent of bovine anaplasmosis, and bovine leukemia virus (BLV). The results showed that BLV infection of cattle did not facilitate the cross-infection with *A. marginale* in cattle since more than half of *A. marginale*-free animals were BLV-infected, and about one-third cows were characterized by leukocytosis. Except an increased number of leukocytes and lymphocytes due to retroviral infection, *A. marginale*-free animals were characterized only by the absence of statistically significant correlation between the counts of erythrocytes and neutrophils as compared to *A. marginale*-infected cows, which may point at the activation of nonspecific defense mechanisms in *A. marginale*-infected animals. Testing animals for BLV infection by agar gel immunodiffusion (AGID) and polymerase chain reaction (PCR) assays revealed the proviral DNA integration in one AGID-negative cow, whereas in seven out of thirty four AGID-positive cows the proviral DNA was absent. Leukocytosis ($> 20 \times 10^9$ blood leukocytes per liter) was revealed only in six AGID- and PCR-positive cows. The only common feature of BLV-infected animals with moderate and severe leukocytosis was thrombocytosis, as well as disruption of correlational relationships between the number of agranulocytes and granulocytes in peripheral blood. The detected disruption of the network relationships between different leukocyte populations reflects deep changes in the immune system functioning induced by retroviral infection. We observed a deficiency of neutrophils in cows with leukocytosis, which is in consistency with the data on neutropenia in milk of BLV-infected cows with leucosis (M. Nishiike et al., 2016). Considering the absence of BLV diagnostic tests that are able to reliably exclude the false-positive or false-negative results, it seems that the most effective approach for herd sanitation may consist in a simultaneous quantification of viral load (the number of BLV RNA in peripheral blood cells) and estimation of leukocytosis severity.

Keywords: anaplasmosis, bovine leukemia virus, viral load, leukocytosis, neutropenia, erythrocyte and leukocyte characteristics.

REFERENCES

1. Nishiike M., Haoka M., Doi T., Kohda T., Mukamoto M. Development of a preliminary diagnostic measure for bovine leukosis in dairy cows using peripheral white blood cell and lymphocyte counts. *J. Vet. Med. Sci.*, 2016, 78(7): 1145-1151 (doi: 10.1292/jvms.16-0022).
2. Raszek M.M., Guan L.L., Plastow G.S. Use of genomic tools to improve cattle health in the context of infectious diseases. *Front. Genet.*, 2016, 7: 30 (doi: 10.3389/fgene.2016.00030).
3. Ott S.L., Johnson R., Wells S.J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev. Vet. Med.*, 2003, 61(4): 249-262 (doi: 10.1016/j.prevetmed.2003.08.003).
4. Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., Balon H., Bouzar A.B., Defoiche J. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 2007, 4: 18 (doi: 10.1186/1742-4690-4-18).
5. Polat M., Takeshima S.N., Hosomichi K., Kim J., Miyasaka T., Yamada K., Arainga M., Murakami T., Matsumoto Y., de la Barra Diaz V., Panei C.J., González E.T., Kanemaki M., Onuma M., Giovambattista G., Aida Y. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*, 2016, 13: 4 (doi: 10.1186/s12977-016-0239-z).
6. Gutiérrez G., Rodríguez S.M., de Brogniez A., Gillet N., Golime R., Burny A., Jaworski J.P., Alvarez I., Vagnoni L., Trono K., Willems L. Vaccination against δ -retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses*, 2014, 6(6): 2416-2427 (doi: 10.3390/v6062416).
7. Ohira K., Nakahara A., Konnai S., Okagawa T., Nishimori A., Maekawa N., Ikebuchi R., Kohara J., Murata S., Ohashi K. Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF- β secretion from regulatory T cells. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2016, 4(1): 52-63 (doi: 10.1002/iid3.93).
8. Ikebuchi R., Konnai S., Okagawa T., Nishimori A., Nakahara A., Murata S., Ohashi K. Differences in cellular function and viral protein expression between IgM high and IgM low B-cells in bovine leukemia virus-infected cattle. *J. Gen. Virol.*, 2014, 95(8): 1832-1842 (doi: 10.1099/vir.0.065011-0).
9. Fitzgerald S.D., Sledge D.G., Maes R., Wise A., Kiupel M. Coinfection of a cow with Bovine leukemia virus and *Mycobacterium bovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2009, 21(6): 878-882.
10. Erskine R.J., Bartlett P.C., Sabo K.M., Sordillo L.M. Bovine leukemia virus infection in dairy cattle: effect on serological response to immunization against J5 *Escherichia coli* bacterin. *Vet. Med. Int.*, 2011, 2011: Article ID 915747 (doi: 10.4061/2011/915747).
11. Della Libera A.M.M.P., de Souza F.N., Batista C.F., Santos B.P., de Azevedo L.F.F., Sanchez E.M.R., Diniz S.A., Silva M.X., Haddad J.P., Blagitz M.G. Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Vet. Res.*, 2015, 46: 2 (doi: 10.1186/s13567-014-0125-4).
12. Kocan K.M., de la Fuente J., Guglielmo A.A., Melendez R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003 16: 698-712 (doi: 10.1128/CMR.16.4.698-712.2003).
13. Kivaria F.M. Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania. *Trop. Anim. Health. Prod.*, 2006, 38(4): 291-299 (doi: 10.1007/s11250-006-4181-2).
14. Kocan K.M., de la Fuente J., Blouin E.F., Coetzee J.F., Ewing S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.*, 2010, 167: 95-107 (doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.012).
15. Belkahia H., Ben Said M., Alberti A., Abdi K., Issaoui Z., Hattab D., Gharbi M., Messadi L. First molecular survey and novel genetic variants' identification of *Anaplasma marginale*, *A. centrale* and *A. bovis* in cattle from Tunisia. *Infect. Genet. Evol.*, 2015, 34: 361-371 (doi: 10.1016/j.meegid.2015.06.017).
16. Ait Hamou S., Rahali T., Sahibi H., Belghyti D., Losson B., Goff W., Rhallem A. Molecular and serological prevalence of *Anaplasma marginale* in cattle of North Central Morocco. *Res. Vet. Sci.*, 2012, 93: 1318-1323 (doi: 10.1016/j.rvsc.2012.02.016).
17. Kubelová M., Mazancová J., Siroký P. *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* detected by PCR in ruminant herds at Bié Province, Angola. *Parasite*, 2012, 19: 417-422 (doi: 10.1051/parasite/2012194417).
18. Mutshembele A.M., Cabezas-Cruz A., Mtshali M.S., Thekisoe O.M., Galindo R.C., de la Fuente J. Epidemiology and evolution of the genetic variability of *Anaplasma marginale* in South Africa. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2014, 5: 624-631 (doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.04.011).
19. Georgiu Kh., Belimenko V.V. *Sel'skokhozyaistvennyye zhivotnye*, 2015, 1: 5-7 (in Russ.).
20. Liberman E.L., Khlyzova T.A. *Educatio*, 2015, 3: 46-50 (in Russ.).
21. Kazakov N.A. *Vetpatologiya*, 2008, 2: 68-70 (in Russ.).

22. Brown W.C. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, 35(3): 241-252 (doi: 10.1016/j.cimid.2011.12.002).
23. Waal D.T. Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000, 916: 474-483 (doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05327.x).
24. Ristic M. Bovine anaplasmosis. In: *Parasitic Protozoa*. J. Kreier (ed.). Academic Press, NY, 1977. V. 4: 235-249.
25. Richey E.J. Bovine anaplasmosis. In: *Current veterinary therapy food animal practice*. R.J. Howard (ed.). The W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1981.
26. Palmer G.H., Rurangirwa F.R., Kocan K.M., Brown W.C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology*, 1999, 15(7): 281-286.
27. Futsé J.E., Ueti M.W., Knowles D.P., Palmer G.H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41: 3829-3834 (doi: 10.1128/JCM.41.8.3829-3834.2003).
28. Han S., Norimine J., Brayton K.A., Palmer G.H., Scoles G.A., Brown W.C. *Anaplasma marginale* infection with persistent high-load bacteremia induces a dysfunctional memory CD4+ T lymphocyte response but sustained high IgG titers. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, 17: 1881-1890 (doi: 10.1128/CVI.00257-10).
29. de la Fuente J., Garcia-Garcia J.C., Blouin E.F., McEwen B.R., Clawson D., Kocan K.M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.*, 2001, 31: 1705-1714 (doi: 10.1016/S0020-7519(01)00287-9).
30. Kocan K.M., de la Fuente J., Guglielmone A.A., Melendez R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, 16: 698-712 (doi: 10.1128/CMR.16.4.698-712.2003).
31. Palmer G.H., McGuire T.C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immunol.*, 1984; 133: 1010-1015.
32. Tebele N., McGuire T.C., Palmer G.H. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.*, 1991, 59: 3199-3204.
33. Palmer G.H., Eid G., Barbet A.F., McGuire T.C., McElwain T.F. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP-2) is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.*, 1994, 62: 3808-3816.
34. Palmer G.H., McElwain T.F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasitol.*, 1995, 57: 233-253.
35. Lopez J.E., Siems W.F., Brayton K.A., Palmer G.H., McGuire T.C., Brown W.C. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect. Immun.*, 2005, 73: 8109-8118 (doi: 10.1128/IAI.73.12.8109-8118.2005).
36. Auezova R., Ryskeldiev N., Doskaliyev A., Kuanyshev Y., Zhetpisbaev B., Aldiyarova N., Ivanova N., Akshulakov S., Auezova L. Association of preoperative levels of selected blood inflammatory markers with prognosis in gliomas. *Oncotargets Ther.*, 2016, 9: 6111-6117 (doi: 10.2147/OTT.S113606).
37. Kosovskii G.Yu., Sotnikova E.A., Mudrik N.N., Cuong V.C., Toan T.X., Hoan T.X., Glazko V.I. *Veterinariya*, 2013, 8: 58-61 (in Russ.).
38. Koval'chuk S.N., Kosovskii G.Yu., Arkhipov A.V., Glazko T.T., Glazko V.I. Development of real-time PCR assay for detection of *Anaplasma marginale*. *Agricultural Biology*, 2015, 50(6): 825-831 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.825eng) (in Engl.).
39. Koval'chuk S.N., Babii A.V., Arkhipova A.L., Arkhipov A.V., Kosovskii G.Yu. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2016, 3: 98-105 (in Russ.).
40. Raszek M.M., Guan L.L., Plastow G.S. Use of genomic tools to improve cattle health in the context of infectious diseases. *Front. Genet.*, 2016, 7: 30 (doi: 10.3389/fgene.2016.00030).
41. Oblap R.V., Glazko V.I., Sozinov A.A. *Tstologiya i genetika*, 1997, 31(2): 41-43 (in Russ.).
42. Takamatsu H., Inumaru S., Nakajima H. Inhibition of in vitro immunocyte function by sera from cattle with bovine leukemia. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1988, 18: 349-359.
43. Arainga M., Takeda E., Aida Y. Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis. *BMC Genomics*, 2012, 13: 121 (doi: 10.1186/1471-2164-13-121).
44. Aida Y., Murakami H., Takahashi M., Takeshima S.N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front. Microbiol.*, 2013, 4: 328 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00328).
45. Kosovskii G.Yu., Glazko V.I., Andreichenko I.A., Koval'chuk S.N., Glazko T.T. The infection hazard of carriers of proviral bovine leukemia virus and its evaluation with regard to leukocytosis. *Agricultural Biology*, 2016, 51(4): 475-482 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.4.475eng) (in Engl.).