

Оригинальная статья / Original article  
УДК 619:57.065:578.828  
DOI: 10.18470/1992-1098-2023-4-114-124

## Оценка пораженности крупного рогатого скота вирусом лейкоза в Республике Дагестан с помощью ПЦР-диагностики

Дмитрий А. Бабошко<sup>1</sup>, Кирилл А. Елфимов<sup>1</sup>, Мадина Г. Даудова<sup>2</sup>, Халид Г. Койчугев<sup>2</sup>,  
Хадиджат Ф.-К. Гапизова<sup>2</sup>, Наталья М. Гашникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>2</sup>Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

### Контактное лицо

Дмитрий А. Бабошко, аспирант НГУ, сотрудник отдела Ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; 630559 Россия, Новосибирская область, Новосибирск, р/п Кольцово.

Тел. +79831283892

Email [baboshko\\_da@vector.nsc.ru](mailto:baboshko_da@vector.nsc.ru)

ORCID <https://orcid.org/0009-0003-9052-6427>

### Формат цитирования

Бабошко Д.А., Елфимов К.А., Даудова М.Г., Койчугев Х.Г., Гапизова Х.Ф.-К., Гашникова Н.М. Оценка пораженности крупного рогатого скота вирусом лейкоза в Республике Дагестан с помощью ПЦР-диагностики // Юг России: экология, развитие. 2023. Т.18, N 4. С. 114-124.  
DOI: 10.18470/1992-1098-2023-4-114-124

Получена 22 октября 2023 г.

Прошла рецензирование 24 ноября 2023 г.

Принята 25 ноября 2023 г.

### Резюме

**Цель.** Оценка пораженности крупного рогатого скота вирусом лейкоза с помощью ПЦР-диагностики в стадах Республики Дагестан и исследование молекулярно-генетических характеристик циркулирующих вирусов.

**Материалы и методы.** Исследовано 150 образцов крови КРС. ПЦР-диагностику образцов на наличие вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) проводили тест-системой РеалБест-Вет ДНК ВЛКРС и с лабораторным набором праймеров. Часть образцов была просеквенирована методом Сэнгера, выполнен их филогенетический анализ.

**Результаты.** Из 150 образцов положительными на наличие ВЛКРС оказались 24. В Унцукульском районе ни в одном из 16 образцов не выявлена ДНК ВЛКРС. В Карабудахкентском районе из 40 – в 2-х (5 %), в Буйнакском – в 1 из 30 (3,3 %) и в Бабаюртовском – в 21 из 60 был обнаружен ВЛКРС (35 %). Для 13 ВЛКРС получены и расшифрованы фрагменты гена *env* размером 1000 п.н. Согласно филогенетическому анализу 7 образцов ВЛКРС относятся к 7, а 6 – к 4 генотипу ВЛКРС. ВЛКРС 4 генотипа, выделенные в Бабаюртовском районе, кластеризуются с вирусами из Казахстана, вирусы 4 генотипа других хозяйств – с российскими ВЛКРС. Исследованные образцы 4 генотипа не образовывали общих кластеров. Для ВЛКРС 7 генотипа, выделенного в хозяйствах Бабаюртовского района, напротив, наблюдалось объединение последовательностей в один кластер генетически близких вирусов.

**Заключение.** Выявлены существенные отличия в пораженности скота в хозяйствах Дагестана. Не обнаружено закономерностей регистрации случаев ВЛКРС с определенной породой КРС или с возрастом животного. Показано, что в Республике циркулируют вирусы 7 и 4 генотипов. Для ВЛКРС 4 генотипа предполагается наличие разных путей его заноса в хозяйства, при этом связанные цепочки распространения вирусов не найдены. Для ВЛКРС 7 генотипа зарегистрирована передача вируса, что указывает на необходимость усиления мер профилактики лейкоза в хозяйстве.

### Ключевые слова

ВЛКРС, генотип G4, генотип G7, филогенетический анализ, ПЦР-диагностика.

# Assessment of the incidence of leukemia virus (BLV) in cattle in the Republic of Dagestan using PCR diagnostics

Dmitry A. Baboshko<sup>1</sup>, Kirill A. Elfimov<sup>1</sup>, Madina G. Daudova<sup>2</sup>, Khalid G. Koychuev<sup>2</sup>,  
Khadizhat F.-K. Gapizova<sup>2</sup> and Natalya M. Gashnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk region, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>Dagestan State University, Makhachkala, Russia

## Principal contact

Dmitry A. Baboshko, Postgraduate Student,  
Novosibirsk State University & employee,  
Department of Retroviruses, Vector State Research  
Center of Virology and Biotechnology; Koltsovo,  
Novosibirsk, Novosibirsk region, Russia 630559.  
Tel. +79831283892  
Email [baboshko\\_da@vector.nsc.ru](mailto:baboshko_da@vector.nsc.ru)  
ORCID <https://orcid.org/0009-0003-9052-6427>

## How to cite this article

Baboshko D.A., Elfimov K.A., Daudova M.G.,  
Koychuev Kh.G., Gapizova Kh.F.-K., Gashnikova  
N.M. Assessment of the incidence of leukemia virus  
(BLV) in cattle in the Republic of Dagestan using  
PCR diagnostics. *South of Russia: ecology,  
development*. 2023, vol. 18, no. 4, pp. 114-124. (In  
Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2023-4-114-124

Received 22 October 2023

Revised 24 November 2023

Accepted 25 November 2023

## Abstract

**Aim.** Assessment of the incidence of leukemia virus in cattle using PCR diagnostics in herds of the Republic of Dagestan and study of the molecular genetic characteristics of circulating viruses.

**Materials and Methods.** 150 cattle blood samples were examined. PCR diagnostics of samples for the presence of bovine leukosis virus (BLV) were carried out using the RealBest-Vet DNA BLV test system and a laboratory set of primers. Some of the samples were sequenced using the Sanger method and their phylogenetic analysis was performed.

**Results.** Out of 150 samples, 24 samples were positive for the presence of BLV. In the Untsukul'skiy district, no BLV DNA was detected in any of the 16 samples. In the Karabudakhkent'skiy district out of 40 – in 2 (5 %), in Buynak'skiy district – in 1 out of 30 (3.3 %) and in Babayurtov'skiy district – in 21 out of 60 samples BLV was detected (35 %). For 13 BLV-positive samples, fragments of the env gene measuring 1000 bp were obtained and deciphered. According to phylogenetic analysis, 7 samples of BLV belong to the 7th, and 6 – to the 4th genotype of BLV. The BLV genotype 4 isolated in the Babayurtov'skiy district clusters with viruses from Kazakhstan, while viruses of genotype 4 from other farms cluster with Russian BLV. The studied samples of genotype 4 did not form common clusters. For the BLV genotype 7 isolated in farms of the Babayurtov'skiy district, on the contrary, a combination of sequences into one cluster of genetically similar viruses was observed.

**Conclusion.** Significant differences in the incidence of leukemia virus in livestock on farms in Dagestan were revealed. No patterns were found in the registration of cattle cases with a specific breed of cattle or with the age of the animal. It has been shown that viruses of both genotypes 7 and 4 circulate in the Republic. For BLV 4, it is assumed that there are different ways of its introduction into farms but no associated chains of virus spread have been found. For BLV genotype 7, transmission of BLV has been registered, which indicates the need to strengthen leukemia prevention measures on farms.

## Key Words

BLV, genotype G4, genotype G7, phylogenetic analysis, PCR diagnostics.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус лейкоза крупного рогатого скота – онкогенный вирус, являющийся причиной лимфопролиферативного заболевания крупного рогатого скота по всему миру (ВЛКРС). ВЛКРС относится к роду *Deltaretrovirus* семейства *Retroviridae*, включающего таких известных представителей, как Т-лимфотропные вирусы обезьяны и человека. Вирус в естественных условиях поражает только крупный рогатый скот.

Инфекция, вызванная ВЛКРС, наносит серьёзный ущерб животноводству из-за ранней выбраковки высокопроизводительных животных, снижению надоев и понижению качества мясной и молочной продукции [1; 2]. Особенно большую опасность инфекция представляет для племенных хозяйств, так как в связи с введением противозидемических мероприятий и для прекращения инфекции приходится выбраковывать животных с высоким генетическим потенциалом.

Инфицированные ВЛКРС животные могут являться бессимптомными вирусоносителями, в 30–70 % инфицирования у крупного рогатого скота развивается стойкий лимфоцитоз, а у 0,1–10 % из них при развитии заболевания регистрируются опухоли [3]. Из-за встройки провируса ВЛКРС в геном хозяина, животное остаётся вирусоносителем и является резервуаром и разносчиком данной инфекции.

В большинстве западноевропейских стран, а также в Австралии и Новой Зеландии были реализованы программы по ликвидации ВЛКРС, что привело к значительному снижению пораженности скота [4–6]. В азиатских странах, таких как Китай, Вьетнам и Корея, распространение ВЛКРС остается на высоком уровне [7–9].

ВЛКРС имеет широкое распространение как в Республике Дагестан, так и во всех субъектах Российской Федерации, занимая первое место в причинах смерти крупного рогатого скота [3; 10]. По данным Департамента ветеринарии Министерства сельского хозяйства региона, имеющие высокие показатели инфицирования: в Новосибирской области – 222 неблагополучных пункта, Челябинской – 127 пунктов, Калужской – 109, Краснодарском крае – 100. В Тюменской, Пензенской областях в последние годы удалось добиться значительного снижения заболеваемости ВЛКРС в 53 ранее неблагополучных пунктах [10].

В Республике Дагестан (РД) по данным на 01.01.2022 г. было официально объявлено о 158 пунктах на всей территории республики, в том числе на сельхозпредприятиях – 36 (из них 5 племхозы), в крестьянских (фермерских) – 18 и личных подсобных хозяйствах – 104. Наибольшее количество неблагополучных по лейкозу пунктов зафиксировано в Кизлярском (18), Тарумовском (17), Бабаюртовском (16), Гунибском (15), Тляртинском (10) районах и г. Махачкале (9). В Бежтинском участке, Буйнакском, Дербентском, Казбековском, Каякентском, Кизилюртовском, Хасавюртовском районах и городах Хасавюрте и Южно-Сухокумске регистрировалось по 1 очагу, в Рутульском, Унцукульском районах – по 2; в Гергебильском, Лакском, Новолакском, Цумадинском – по 3; в Сергокалинском – 4; в Чародинском – 5, в Ахвахском, Дахадаевском, Карабудахкентском – по 6; в Ботлихском, Кумторкалинском и Шамильском районах – по 7 очагов [11].

Инфекция ВЛКРС представляет опасность не только для крупного рогатого скота. Данный вирус может быть онкогеном в ряде онкологических заболеваний женщин. Большим достижением в области лейкологии явилось выявление этиологического фактора при Т-клеточном лейкозе человека – ретровируса типа С, имеющего большое сродство с ВЛКРС [12]. Выявление фрагментов генома ВЛКРС у женщин с онкологией в разных источниках также достаточно сильно варьирует: в Бразилии у 72 вовлеченных в исследование женщин с выраженным раком молочной железы ДНК ВЛКРС выявлялась в 13,9 % случаев [13], тогда как по данным из Австралии у 96 женщин в 61,5 % случаев была выявлена ДНК этого вируса, в США, по сообщениям, фрагменты ДНК ВЛКРС были обнаружены в 59 % образцов эпителия молочной железы у американских женщин преимущественно европеоидной расы, больных раком молочной железы, и только в 29 % у нормальных людей из контрольной группы [14].

При сравнительном анализе серологических и молекулярно-генетических методов диагностики бычьего лейкоза установлено преимущество иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции относительно применяемой в ветеринарной практике реакции иммунодиффузии [15; 16]. ПЦР-диагностика является наиболее точным методом для диагностики хронически зараженных животных, так как выявляет встройку провируса лейкоза коров в геном клетки-хозяина. Кроме того, ПЦР-диагностика является достоверным методом тестирования молодняка на наличие провируса ВЛКРС в клетках крови телят [17].

Целью настоящего исследования являлась оценка пораженности крупного рогатого скота вирусом лейкоза с помощью ПЦР-диагностики в стадах Республики Дагестан и исследование молекулярно-генетических характеристик циркулирующих вирусов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На территориях 4 районов РД – Бабаюртовского, Буйнакского, Унцукульского, Карабудахкентского проведен сбор образцов крови крупного рогатого скота. Образцы собирали от коров широкой возрастной группы от 1 года и до 10 лет. Средний возраст животных, представленных в данном исследовании, составил 4,5 года. В РД преобладает красная степная и калмыкская породы коров, но также встречаются и представители породы сементал и чёрно-белой голштинизированной. Животные для исследования были отобраны на основе желания их владельцев предоставить образцы скота для анализа на наличие ДНК ВЛКРС. Образцы крови коров были собраны сотрудниками управления ветеринарии регионов в строгом соответствии с документом СанПиН 3.3686-21. Забор образцов крови от крупного рогатого скота осуществляли из хвостовой вены с использованием одноразовых стерильных систем в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА).

Настоящее исследование включало 150 проб крови, взятых июне 2023 года у молочного и мясного скота в хозяйствах Бабаюртовского, Буйнакского, Унцукульского, Карабудахкентского районов. В Бабаюртовском районе было собрано 30 образцов, в Буйнакском – 60, в Унцукульском – 20, в Карабудахкентском – 40.

Для выделения суммарной ДНК из периферической крови крупного рогатого скота использовали фенол-хлороформный метод. Для диагностики наличия ДНК ВЛКРС в пробах применяли ПЦР в реальном времени с использованием набора РеалБест-Вет ДНК вируса лейкоза КРС V-5441 производства ВекторБест, а также ПЦР с лабораторным набором праймеров, выбранных на участок генома 1000 п.н., кодирующий ген env. Для анализа размера и качества продуктов ПЦР использовали метод электрофореза ДНК в агарозном геле (1 %).

Секвенирование проводили с использованием генспецифичных праймеров и коммерческого набора BigDye Terminator v3.1. Образцы наносили в лунки 96-луночного планшета, который затем загружали в автоматический 8-капиллярный секвенатор 3130xl (AppliedBiosystems, США). Полученные последовательности редактировали в программе Sequencher 4.1 и сравнивали с референс-последовательностями различных генотипов ВЛКРС из международной базы данных (Genbank). Филогенетический анализ выполняли с помощью MEGA-X, используя метод объединения ближайших соседей на основе двухпараметрической модели Кимуры. Статистическую значимость топологии филогенетического дерева оценивали с помощью анализа бутстрепов (n=1000).

## ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика хозяйств, вовлеченных в исследование КРС на ВЛКРС

Для анализа распространённости ВЛКРС в РД выбраны районы, территориально находящиеся в разных природных зонах, отличающиеся по рельефу местности, климатическим и гидрологическим характеристикам (рис. 1).

Точки отбора проб:

1. Унцукульский район – с. Унцукуль, с. Бетли
2. Карабудахкентский район – с. Карабудахкент (две точки в разных концах села)
3. Буйнакский район – с. Халимбакаул, с. Чиркей, с. Эрпели
4. Бабаюртовский район – Бабаюрт (СПК Агрокавказ), с. Мужукай, с. Герменчик

Согласно статистическим данным Комитета по ветеринарии РД, основное количество зараженного лейкозом КРС выявляется в племенных и крупных хозяйствах низменной части Республики, в том числе, в хозяйствах Бабаюртовского района.

**Бабаюртовский район** расположен в низменной части республики. Географически он находится в пределах Терско-Сулакской низменности, через которую протекают 2 транзитные реки (Сулак и Терек), с которыми связана разветвленная сеть каналов и коллекторов. Это благоприятствует распространению на территории района интразонального типа растительности. Благодаря увлажнению почв грунтовыми водами и поливу, здесь широко распространена луговая и лугово-болотная растительность, что крайне благоприятно для развития животноводства. Наличие собственной богатой кормовой базы, транспортная доступность, относительно мягкие климатические условия, равнинный рельеф – это идеальное сочетание благоприятных факторов для развития высокопродуктивного животноводства молочного и мясного направления. На территории района много крупных КФХ с большим

поголовьем КРС. От уровня содержания животных, возможностей обеспечения противозооотических мероприятий зависит возможность распространения ВЛКРС в хозяйствах. Поэтому в процессе анализа следует изучить пораженность КРС лейкозом в комплексе с анализом факторов, способных оказывать влияние на усугубление ситуации.

Исследуемые нами фермерские хозяйства Бабаюртовского района оснащены всеми необходимым условиями для содержания, выгула и изоляции КРС. Помещения предназначены для содержания дойных коров на 200 голов. В этом же помещении животных содержат в зимний период. Внутри смонтированы кормушки, индивидуальные поилки, кормовые проезды. Рядом со зданием находится выгульный двор. Общее санитарно-гигиеническое состояние помещений хорошее. Все параметры микроклимата поддерживаются в норме.

В Бабаюртовском районе насчитывается 22672 голов КРС (в т.ч. коров 12931). В исследуемых населенных пунктах с. Бабаюрт, с. Мужукай и с. Герменчик зарегистрировано 1420 (в т.ч. коров 830), 791 (в т.ч. коров 412) и 1176 (в т.ч. коров 690) голов КРС соответственно. В исследуемом нами крупном фермерском хозяйстве с. Бабаюрт (СПК Агрокавказ) содержится около 300 голов КРС породы сементал в возрасте от 2 до 3 лет. Хочется отметить высокий уровень соблюдения санитарно-гигиенических требований, оснащённость современным производственно-технологическим оборудованием и хорошими условиями содержания КРС. Для осеменения коров и телок спермой используется ректоцервикальная техника.

В фермерских хозяйствах с. Мужукай и с. Герменчик способы оплодотворения естественные: в основном своими бычками.

**Карабудахкентский и Буйнакский районы** расположены в предгорной зоне Республики Дагестан. Основная территория районов лежит в высотном диапазоне от 200 до 1000 метров. Природно-климатические условия нижних предгорий (200–500 м) отличаются сухостью и распространением полупустынной и сухостепной растительности. Верхние предгорья (600–1000 м) характеризуются большим увлажнением и преобладанием степной и субальпийской растительности, что говорит о наличие хорошей кормовой базы.

В Карабудахкентском районе поголовье КРС составляет 20728 голов (в т.ч. коров 5883), из которых в исследуемом населенном пункте насчитывается 1288 голов (в т.ч. коров 188). В хозяйствах, где нами был проведен отбор проб, общая численность поголовья составляет 160 и 48 (Фермерское хозяйство 1 и Фермерское хозяйство 2 соответственно), с преобладанием красно-степных, черно-пестрых, калмыцких пород возрастом от 3 месяцев до 6 лет. В Фермерском хозяйстве 1 оплодотворение происходит бычками калмыцкой породы. В Фермерском хозяйстве 2 на протяжении 2–3 лет осеменителем является бык породы швиц (весом около 1 тонны). Данная порода пригодна к стойловому и стойлово-пастбищному содержанию, отличается высокими показателями продуктивности и приспособляемостью к любым климатическим условиям. Хозяйства обеспечены помещениями для содержания, дойки, изоляции КРС, необходимой кормовой базой и квалифицированным

работниками ветеринарной службы района. Завозится КРС в основном из Ставропольского края и Калмыкии. В Буйнакском районе насчитывается КРС в количестве 40274 (в т.ч. коров 11096). В исследуемых нами населённых пунктах Халимбекаул, Чиркей и Эрпели зарегистрировано 361 (в т.ч. коров 135), 4125 (в т.ч. коров 1685) и 2866 (в т.ч. коров 1319) соответственно, возрастом от 5 месяцев до 12 лет. Преобладает КРС калмыцкой породы, но также встречается красно-

степная, кавказская бурая, черно-пестрая и др. В исследуемых нами хозяйствах с. Эрпели содержалось от 2 до 10 голов крупного рогатого скота в возрасте от 1 до 5 лет; в хозяйстве с. Халимбекаул поголовье составило 45 голов; в хозяйстве с. Чиркей – около 300 голов. Способы оплодотворения в исследуемых хозяйствах естественные: своими бычками. Завозится КРС в основном из Калмыкии.



**Рисунок 1.** Карта мест отбора образцов проб крови крупного рогатого скота на территориях Республики Дагестан для проведения скрининга на вирус лейкоза

**Figure 1.** Map of locations of collection blood samples from cattle in the Republic of Dagestan for screening for bovine leukosis virus

**Унцукульский район** расположен в горной части РД. Рельеф характеризуется достаточно сильной пересечённостью и высокой вариабельностью ландшафтов – от нагорно-ксерофитных до альпийских. В верхней более увлажненной части хребтов произрастает альпийская и субальпийская растительность, и на этих территориях в основном располагаются крупные фермерские хозяйства. В засушливых котловинах района содержатся небольшие поголовья КРС для личного пользования.

Всего в Унцукульском районе насчитывается 19082 голов крупного рогатого скота, из которых 9646 коровы. В частных хозяйствах с. Унцукуль, общая численность поголовья составляет 2995 голов крупного рогатого скота (в т.ч. коров 1400). В исследуемых нами хозяйствах содержалось от 5 до 20 голов КРС местной породы в возрасте от 1 до 5 лет. Особенности местной породы является низкорослость и низкий уровень надоев. Способы оплодотворения в исследуемых хозяйствах естественные: в основном своими бычками местной породы. Наличие благоприятных природно-климатических условий горной части республики создает хорошие условия для развития животноводства, в том числе и разведение КРС, в основном, для получения мяса, и лишь небольшая часть используется для получения молока и молокопродукции. Финансовую обеспеченность хозяйств находится на среднем уровне. Низкая

продуктивность молочного скота обусловлена рядом факторов, к которым относятся малая численность скота высокопродуктивных пород, недостаточная кормовая база, слабая зоотехническая и селекционно-племенная работа, дефицит квалифицированных кадров, низкий удельный вес ферм с современными технологиями и оборудованием.

#### **Сбор образцов крови КРС и молекулярно-генетический анализ выделенных образцов ВЛКРС**

Настоящее исследование включало сбор 150 образцов крови, взятых у молочного и мясного скота в хозяйствах Бабаюртовского района (30 образцов), Буйнакского района (60), Унцукульского (16) и Карабудахкентского районах (40).

С помощью тестирования ПЦР-набором в реальном времени образцы ДНК коров были проанализированы на наличие ДНК вируса лейкоза КРС.

Из 150 проб 24 образца оказались положительными по ПЦР анализу на ВЛКРС. Выявляемость ВЛКРС сильно варьировала в зависимости от района.

В Унцукульском районе исследовано 16 образцов крови от коров красно-степной породы возрастом от 3-х до 7-ми лет (7 образцов), кавказской-бурой (2) 1.5 и 7 лет, черно-пестрой (1) 5-ти лет, калмыкской (6) 2-х лет – ни у одной из 16 коров не была обнаружена ДНК ВЛКРС (табл. 1).

**Таблица 1.** Данные ПЦР-исследования скота на наличие ДНК ВЛКРС в пробах крови  
**Table 1.** Data from PCR testing of livestock for the presence of BLV DNA in blood samples

<b>Район Карабудахкентский, дата сбора 14.06.2023 г.</b> Karabudakhkentskiy district, collection date 14.06.2023					
Пол Sex	Возраст (диапазон) Age (range)	Порода Breed	Кол-во образцов Sample quantity	ПЦР, кол-во PCR testing quantity	Генотип, кол-во Genotype, quantity
<b>Тёлка</b> Heifer	3 месяца – 6 лет 3 months – 6 years	Красно-степная Red-steppe	26	0	-
	9 месяцев – 5 лет 3 months – 6 years	Калмыкская Kalmik	7	1	4 (RU* 1 образец) 4 (RU* 1 sample)
	9 месяцев – 6 лет 9 months – 6 years	Черно-пестрая Black-pied	7	0	-
<b>Бык</b> Bull	4 – 5 лет 4 – 5 years	Красно-степная Red-steppe	2	1	4 (RU* 1 образец) 4 (RU* 1 sample)
<b>Районы Буйнакский и Унцукульский, дата сбора 15.06.2023 г.</b> Buynakskiy & Untsukul'skiy districts, collection date 15.06.2023					
Пол Sex	Возраст (диапазон) Age (range)	Порода Breed	Кол-во образцов Sample quantity	ПЦР, кол-во PCR testing quantity	Генотип, кол-во Genotype, quantity
<b>Тёлка</b> Heifer	3 – 11 лет 3 – 11 years	Красно-степная Red-steppe	18	1	4 (RU* 1 образец) 4 (RU* 1 sample)
	1,5 – 4 года 1.5 – 4 years	Кавказская бурая Caucasian brown	2	0	-
	4 месяца – 5 лет 4 months – 5 years	Черно-пестрая Black-pied	3	0	-
	2 года 2 years	Калмыкская Kalmik	13	0	-
	5 месяцев 5 months	Сементал Semental	2	0	-

<b>Бык</b> Bull	4 месяца	Черно-пёстрая	1	0	-
	4 months	Black-pied			
	2 года	Калмыкская	7	0	-
	2 years	Kalmik			

**Район Бабаюртовский, дата сбора 16.06.2023 г.**

Babayurtovskiy district, collection date 16.06.2023

Пол Sex	Возраст (диапазон) Age (range)	Порода Breed	Кол-во образцов Sample quantity	ПЦР, кол-во PCR testing quantity	Генотип, кол-во Genotype, quantity
	3 – 7 лет	Красно-степная	32	14	4 (KZ** 3 образца), 7 (6 образцов)
	3 – 7 years	Red-steppe			4 (KZ** 3 samples), 7 (6 samples)
<b>Тёлка</b> Heifer	3 года	Калмыкская	2	0	-
	3 years	Kalmik			
	3 года	Сементал	20	5	-
	3 years	Semental			
	4 – 10 лет	Черно-пёстрая	4	2	7 (RU* 1 образец)
	4 – 10 years	Black-pied			7 (RU* 1 sample)

*Примечание: RU\* – ВЛКРС, выделенный в образце, имеет филогенетическую связь с вирусами, циркулирующими на территориях России; KZ\*\* – ВЛКРС, выделенный в образце, имеет филогенетическую связь с вирусами, циркулирующими на территориях Казахстана*

*Note: RU\* – BLV isolated in the sample having a phylogenetic relationship with viruses circulating in the territories of Russia; KZ\*\* – BLV isolated in the sample having a phylogenetic relationship with viruses circulating in the territories of Kazakhstan*

В Карабудахкентском районе из 40 изученных образцов в 2-х случаях (5%), телка 1,5 лет калмыкской породы и бык красно-степной породы 4-х лет был выявлен ВЛКРС (табл. 1).

В Буйнакском районе 1 образец из 30 (3,3%), полученный от коровы 10 лет красно-степной породы, был положительным на ВЛКРС (табл. 1).

В Бабаюртовском районе в 21 образце из 60 исследованных образцов крови коров был обнаружен ВЛКРС (35%). ВЛКРС был выявлен у 9-ти коров 7-ми лет, одной телки 4-х лет и 4-х коров 3-х лет красно-степной породы, 2-х коров 7-ми и 10-ти лет черно-пестрой породы, 5-ти коров 3-х лет породы сементал (табл. 1).

Для 18 из 24 положительных по скрининговому анализу образцов с помощью лабораторного набора праймеров были синтезированы фрагменты гена env ВЛКРС. Для 13 из них были получены и расшифрованы протяженные фрагменты участка гена env ВЛКРС размером 1000 п.н., пригодные для корректного генотипирования и построения филогенетического дерева (рис. 2).

По результатам филогенетического анализа 7 образцов ВЛКРС были отнесены к 7 генотипу и 6 образцов – к 4 генотипу ВЛКРС.

В Карабудахкентском и Буйнакском районах в 3-х ПЦР-положительных пробах (100 % из зарегистрированных случаев) был выявлен ВЛКРС генотипа 4. Согласно выполненному филогенетическому анализу, образцы ВЛКРС, выделенные от коров из Карабудахкентского и Буйнакского районов, генетически близки к вирусам из Новосибирской области России.

В связи с тем, что в России недостаточно исследована молекулярная эпидемиология ВЛКРС, в международных базах данных нуклеотидных последовательностей содержится крайне ограниченное количество расшифрованных последователь-

ностей ВЛКРС, выделенных на разных территориях России. Отсутствие репрезентативной выборки по территориальной циркуляции ВЛКРС в России не позволяет выполнить корректный филогенетический анализ для оценки возможных филогенетических связей распространяющихся вирусов лейкоза коров в регионах страны. Исключение составляет Новосибирская область, где в последние три года проводятся исследования генетической гетерогенности циркулирующих ВЛКРС, расшифрованные последовательности выделенных вирусов депонируются в GenBank [18].

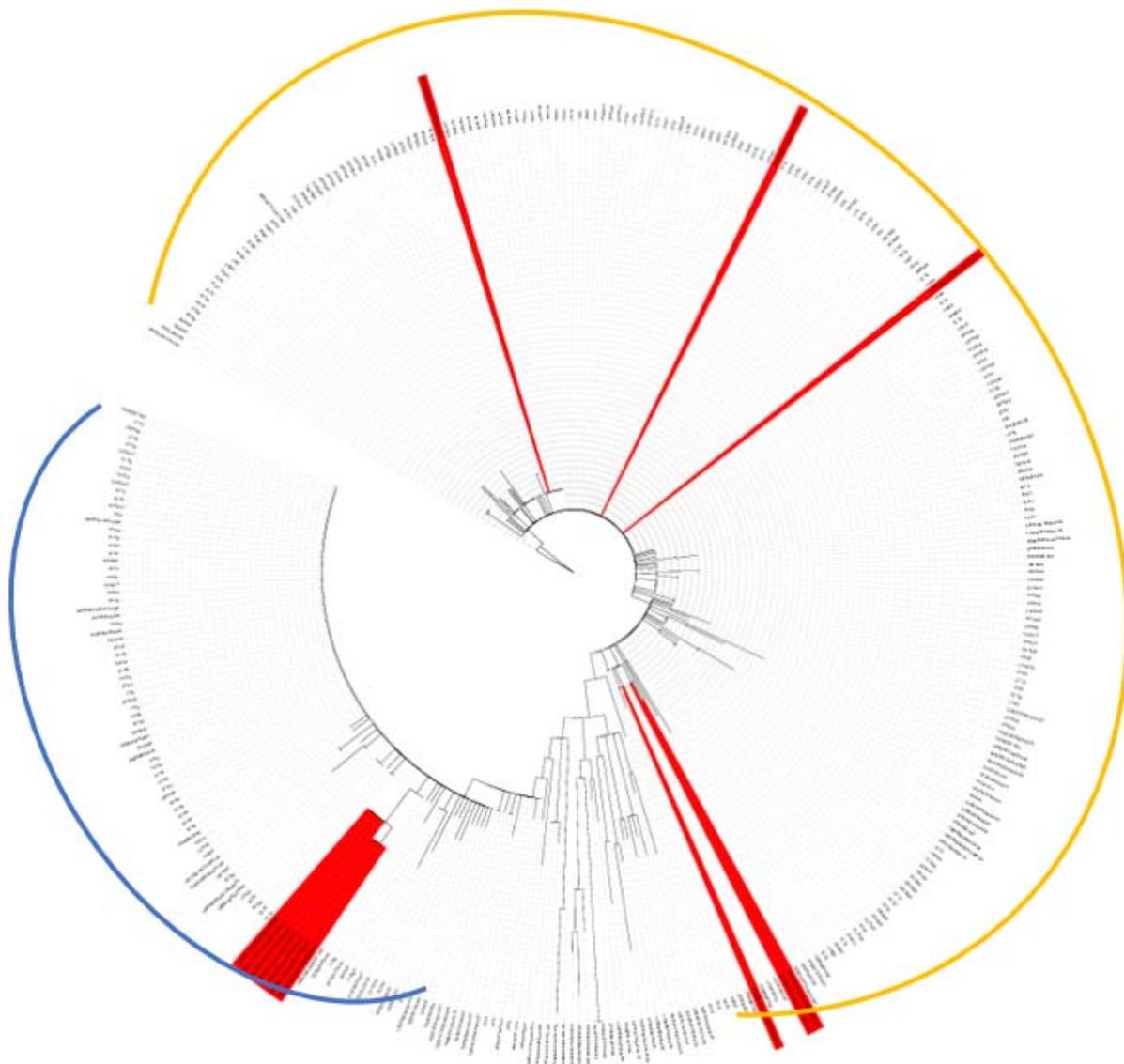
Поэтому факт выявления филогенетической близости ВЛКРС 4 генотипа, выделенных в данных хозяйствах, с вирусами из Новосибирской области, указывает лишь на то, что вирус в хозяйства РД, вероятно, завезен из российских хозяйств.

Из 21 ВЛКРС-положительного образца коров из хозяйств Бабаюртовского района были получены протяженные ПЦР-фрагменты ВЛКРС для 10 случаев. Секвенирование и филогенетический анализ ВЛКРС, выделенных в Бабаюртовском районе, зарегистрировал в хозяйствах как вирусы 4 генотипа (3 образца), так и генотипа 7 (7 образцов).

Интересно отметить, что, согласно филогенетическому анализу, все три образца ВЛКРС 4 генотипа, выделенные в Бабаюртовском районе, кластеризуются с высоким уровнем поддержки с вирусами 4 генотипа ВЛКРС из Казахстана. Возможно, выявление в хозяйствах данного района ВЛКРС 4 генотипа связано с закупкой скота в Казахстане.

При этом никакие из изученных образцов 4 генотипа не образовывали общих кластеров, что может говорить о редкой передаче данного генотипа вируса внутри хозяйств.

Для образцов ВЛКРС 7 генотипа, выделенных в хозяйствах Бабаюртовского района, напротив, наблюдалось объединение в один кластер генетически близких вирусов, что указывает на распространение ВЛКРС внутри хозяйства.



**Рисунок 2.** Филогенетический анализ, выполненный для последовательности гена env исследованных штаммов ВЛКРС. Синей дугой выделен кластер ВЛКРС генотипа 7, желтой дугой – кластер генотипа 4 ВЛКРС. Красным цветом отмечены образцы ВЛКРС, выделенные в Республике Дагестан. Чёрным шрифтом без выделения цветом обозначены референсные последовательности ВЛКРС из базы данных GeneBank и ранее выделенные нами образцы ВЛКРС в Новосибирской области

**Figure 2.** Phylogenetic analysis performed for the env gene sequence of the BLV strains studied. The blue arc indicates the cluster of BVL genotype 7 and the yellow arc indicates the cluster of BVL genotype 4. The BVL samples isolated in the Republic of Dagestan are marked in red. In black font without colour highlighting are reference sequences of BVL from the GeneBank database and samples of BVL that we previously isolated in the Novosibirsk region.

## ВЫВОДЫ

С целью исследования распространения ВЛКРС на территории Республики Дагестан и изучения генетического разнообразия циркулирующих вариантов вируса был проведён сбор 150 проб крови у молочного и мясного скота в хозяйствах Бабаюртовского, Буйнакского, Унцукульского и Карабудахкентского районов Республики Дагестан. Выполненная ПЦР-диагностика на наличие ДНК ВЛКРС зарегистрировала различную пораженность скота в хозяйствах. В Унцукульский районе в 16 исследованных пробах не было найдено ВЛКРС, в Буйнакском районе ВЛКРС зарегистрирован в 3,3 % случаев, в Карабудахкентском в 5 %.

В Бабаюртовском районе в 35% исследованных образцов крови коров был обнаружен ВЛКРС. Данные ПЦР-диагностики в 3-х хозяйствах показали значительно более высокие цифры пораженности скота в отличие от результатов проводимого скрининга животных на ВЛКРС с использованием ИФА-диагностики или РИД.

Среди рассмотренных случаев инфекции КРС не было обнаружено закономерностей регистрации случаев ВЛКРС с определенной породой КРС или с возрастом животного.

Впервые выполненное генотипирование ВЛКРС, выделенных в Дагестане, позволило заключить, что в Республике циркулируют вирусы 7 и 4 генотипов. При этом для ВЛКРС 4 генотипа зарегистрированы разные пути заноса в Дагестан (вероятно, с территории России

и Казахстана). Необходимо заметить, что из-за крайне ограниченного количества доступных расшифрованных последовательностей ВЛКРС как из России, так и из стран СНГ, невозможно сделать более точные выводы о путях заноса ВЛКРС в Дагестан.

При исследовании образцов ВЛКРС 4 генотипа не было найдено кластеров генетически близких вирусов даже среди ВЛКРС, выделенных от коров одного хозяйства.

Напротив, все ВЛКРС 7 генотипа были найдены только в Бабаюртовском районе и все 7 описанных ВЛКРС объединились в одну группу генетически близких вирусов, что указывает на развитие очага ВЛКРС в хозяйстве. Неправильная стерилизация медицинских инструментов при проведении ветеринарных процедур, татуирования и проколов ушей крупного рогатого скота, совместный выпас здоровых и больных животных может стать причиной распространения ВЛКРС среди животных и развития внутреннего резервуара данного заболевания, о чём говорит кластер в 7 генотипе.

Возможно, факт выявления распространения внутри хозяйства вирусов 7 генотипа ВЛКРС также объясняется более высоким патогенным потенциалом этого генотипа ВЛКРС по сравнению с вирусами генотипа 4, для которых не было зарегистрировано генетически близких ВЛКРС как между близкими хозяйствами, так и внутри одного хозяйства.

В связи с тем, что общее количество зарегистрированных случаев ВЛКРС в хозяйствах Республики оказалось достаточно низким, некорректно на основании исследованных образцов вирусов делать статистически значимые выводы. Планируется продолжить анализ поражённости КРС в Дагестане также в связи с тем, что данные ПЦР-диагностики существенно разнятся с данными РИД, выполняемыми в хозяйствах.

Тем не менее, нельзя не отметить то, что большая поражённость скота ВЛКРС наблюдается в крупных развивающихся хозяйствах, имеющих лучшие условия содержания животных, где проводится работа по формированию племенного фонда. Этот факт указывает на необходимость усиления в хозяйствах всего комплекса мероприятий, направленных на предотвращение распространения инфекции ВЛКРС (стерилизация ветеринарного инструментария, своевременная отбраковка ВЛКРС положительных животных, раздельное содержание подозрительных на ВЛКРС и здоровых животных, абсолютное отсутствие пересечений персонала и инструментария при уходе за здоровыми и инфицированными животными, проведение регулярных дезинфекционных мероприятий).

И, наоборот, в мелких фермерских хозяйствах, экономически и организационно более слабых, но расположенных в географически изолированных территориях, не практикующих пополнение стада за счет сторонних хозяйств, ВЛКРС не регистрируется/регистрируется отдельные случаи заражения.

Полученные нами данные соответствуют данным исследователей из разных территорий мира – для многих стран с высокой поражённостью скота ВЛКРС наблюдается аналогичная закономерность – большая/существенно большая поражённость КРС в крупных хозяйствах по сравнению с индивидуальными подворьями/мелкими фермерскими хозяйствами.

Первые выполненный молекулярно-генетический анализ ВЛКРС, выделенных в Республике Дагестан, позволил получить новые уникальные последовательности вирусов лейкоза коров, описать различия в циркулирующих генотипах ВЛКРС, путях заноса и распространения ВЛКРС в хозяйствах Республики, что имеет большую практическую значимость.

Настоящая работа демонстрирует научную новизну, так как вносит вклад в изучение молекулярной эпидемиологии ВЛКРС в России. Накопление знаний по генетическому разнообразию ВЛКРС создает базу для разработки эффективных вакцинных, иммунобиологических препаратов против заболевания ВЛКРС.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена в рамках выполнения Государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора.

#### ACKNOWLEDGMENT

The work was carried out within the framework of the State Assignment of the Vector State Scientific Centre of Virology and Biotechnology of Rospotrebnadzor.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. NAHMS-USDA Bovine Leukosis Virus on U.S. // Dairy Operations. 2007.
2. Enzootic bovine leucosis // World Organisation for Animal Health. URL: <https://www.woah.org/en/disease/enzootic-bovine-leukosis/> (дата обращения: 16.11.2023)
3. Gulyukin M.I., et al. Control and trends in the epizootic situation of bovine leukemia in 2000–2016 // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017. V. 71. N 11. P. 530–537. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-11-70>
4. Nuotio L., et al. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland // Preventive Veterinary Medicine. 2003. V. 59. N 1–2. P. 43–49. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00057-6)
5. Thompson K.G., Johnstone A.C., Hilbink F. Enzootic bovine leukosis in New Zealand - a case report and update // New Zealand Veterinary Journal. 1993. V. 41. N 4. P. 190–194. <https://doi.org/10.1080/00480169.1993.35767>
6. Bartlett P.C., et al. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus // Pathogens. V. 9. Iss. 12. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121058>
7. Yang Y., et al. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score // Journal of Dairy Science. 2016. V. 99. N 5. P. 3688–3697. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10580>
8. Murakami K., et al. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle // Vet Microbiol. 2011. V. 148. N 1. P. 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.001>
9. Lee E., et al. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates // Virol J. 2015. V. 12. N 1. <https://doi.org/10.1186/S12985-015-0286-4>
10. Kuzmin V., et al. Spread Dynamics of Leucosis in Cattle in Livestock Farms of the Russian Federation for 2000–2018 // KnE Life Sciences. 2019. P. 666–673. <https://doi.org/10.18502/cls.v4i14.5655>
11. Budulov N.R., et al. Bovine leukemia virus occurrence in Dagestan // Veterinary Science Today. 2023. V. 12. N 2. P. 111–118. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2023-12-2-111-118>
12. Gao A., Kouznetsova V.L., Tsigelny I.F. Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis //

Microb. Pathog. 2020. V. 149. P. 104417.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104417>

13. Schwingel D., et al. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil // *Scientific Reports*. 2019. V. 9. N 1. P. 1–7.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7>

14. Buehring G.C., et al. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development // *PLoS One*. 2017. V. 12. N 6.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179367>

15. Зиннатов Ф.Ф., Гибадулина И.Р., Хазипов Н.З., Тюрюкова Р.П., Камалов Б.В. Детекция и типизация вируса лейкоза крупного рогатого скота // *Вятский медицинский вестник*. 2007. N 4. С. 48–50.

16. Крюков В.И., Шалимова О.А., Друшляк Н.Г., Пикунова А.В. ДНК-диагностика в селекции крупного рогатого скота // *Вестник ОрелГАУ: Научное обеспечение животноводства*. 2012. N 1. С. 62–68.

17. Чижова Л.Н., Белов Д.Е. Использование полимеразной цепной реакции в диагностике лейкоза КРС // *Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства*. 2004. Т. 2. N 2–2. С. 65–69.

18. Бабошко Д.А., Гашникова Н.М., Тотменин А.В., Нefeldова А.А., Осипова И.П., Екушов В.Е., Рожков О.А., Кузьмин А.И., Флеер М.В. Генетическое разнообразие ВЛКРС, распространенных на территории Коченеvского района Новосибирской области // *Ветеринария и кормление*. N 7. С. 51–53.

<https://doi.org/10.30917/journal.pone.1814-9588>

## REFERENCES

1. NAHMS-USDA Bovine Leukosis Virus on U.S. Dairy Operations. 2007.
2. Enzootic bovine leucosis. World Organization for Animal Health. Available at: <https://www.woah.org/en/disease/enzootic-bovine-leukosis/> (accessed 16.11.2023)
3. Gulyukin M.I., et al. Control and trends in the epizootic situation of bovine leukemia in 2000–2016. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 2017, vol. 71, no. 11, pp. 530–537. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-11.70>.
4. Nuotio L., et al. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Preventive Veterinary Medicine*, 2003, vol. 59, no. 1–2, pp. 43–49. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00057-6)
5. Thompson K.G., Johnstone A.C., Hilbink F. Enzootic bovine leukosis in New Zealand - a case report and update. *New Zealand Veterinary Journal*, 1993, vol. 41, no. 4, pp. 190–194. <https://doi.org/10.1080/00480169.1993.35767>
6. Bartlett P.C., et al. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus. *Pathogens*, vol. 9, iss. 12. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121058>

## КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Наталья М. Гашникова и Мадина Г. Даудова составили концепцию исследования. Мадина Г. Даудова, Халид Г. Койчувев, Хадизжат Ф.-К. Гапизова и Дмитрий А. Бабошко собрали эпидемиологические данные и оказали помощь в сборе образцов. Дмитрий А. Бабошко и Кирилл А. Елфимов выполнили пробоподготовку образцов, провели генотипирование ВЛКРС, проанализировали эпидемиологические данные, выполнили филогенетический анализ. Наталья М. Гашникова руководила проектом. Наталья М. Гашникова и Дмитрий А. Бабошко подготовили рукопись. Все авторы в равной степени

7. Yang Y., et al. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *Journal of Dairy Science*, 2016, vol. 99, no. 5, pp. 3688–3697. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10580>

8. Murakami K., et al. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Veterinary Microbiology*, 2011, vol. 148, no. 1, pp. 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.001>

9. Lee E., et al. Sequencing and phylogenetic analysis of the gp51 gene from Korean bovine leukemia virus isolates. *Virology journal*, 2015, vol. 12, no. 1.

<https://doi.org/10.1186/S12985-015-0286-4>

10. Kuzmin V., et al. Spread Dynamics of Leucosis in Cattle in Livestock Farms of the Russian Federation for 2000–2018. *KnE Life Sciences*, 2019, pp. 666–673.

<https://doi.org/10.18502/kl.v4i14.5655>

11. Budulov N.R., et al. Bovine leukemia virus occurrence in Dagestan. *Veterinary Science Today*, 2023, vol. 12, no. 2, pp. 111–118. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2023-12-2-111-118>

12. Gao A., Kouznetsova V.L., Tsigelny I.F. Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 2020, vol. 149, p. 104417.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104417>

13. Schwingel D., et al. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 1–7.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7>

14. Buehring G.C., et al. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179367>

15. Zinnatov F.F., Gibadulina I.R., Khazipov N.Z., Tyurikova R.P., Kamalov B.V. Detection and typification of the cattle leukemia virus. *Vyatskii meditsinskii vestnik [Vyatka Medical Bulletin]*. 2007, no. 4, pp. 48–50. (In Russian)

16. Kryukov V.I., Shalimova O.A., Drushlyak N.G., Pikunova A.V. DNA diagnostics in cattle breeding. *Vestnik OreISAU: Nauchnoe obespechenie zhivotnovodstva [Bulletin of OreISAU: Scientific support of livestock breeding]*. 2012, no. 1, pp. 62–68. (In Russian)

17. Chizhova L.N., Belov D.E. The use of polymerase chain reaction in the diagnosis of bovine leukemia. In: *Sbornik nauchnykh trudov Stavropol'skogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zhivotnovodstva i kormoproizvodstva [Collection of scientific works of the Stavropol Research Institute of Livestock and Feed Production]*. 2004, vol. 2, no. 2–2, pp. 65–69. (In Russian)

18. Baboshko D.A., Gashnikova N.M., Totmenin A.V., Nefeldova A.A., Osipova I.P., Ekushov V.E., Rozhkov O.A., Kuzmin A.I., Flyer M.V. Genetic diversity of BLV distributed on the territory of the Kochenevsky district of the Novosibirsk region. *Veterinary and feeding*, no.7, pp. 51–53. (In Russian) <https://doi.org/10.30917/journal.pone.1814-9588>

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Natalya M. Gashnikova and Madina G. Daudova conceptualized the study. Madina G. Daudova, Khalid G. Koychuev, Khadizhat F.-K. Gapizova and Dmitry A. Baboshko collected epidemiological data and assisted with sample collection. Dmitry A. Baboshko and Kirill A. Elfimov performed sample preparation, carried out BLV genotyping, analyzed epidemiological data and performed phylogenetic analysis. Natalya M. Gashnikova led the project. Natalya M. Gashnikova and Dmitry A. Baboshko prepared the manuscript. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата и других неэтических проблем.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION**

The authors declare no conflict of interest.

**ORCID**

Дмитрий А. Бабошко / Dmitry A. Baboshko <https://orcid.org/0009-0003-9052-6427>

Кирилл А. Елфимов / Kirill A. Elfimov <https://orcid.org/0009-0002-6635-2642>

Мадина Г. Даудова / Madina G. Daudova <https://orcid.org/0000-0003-0456-3698>

Халид Г. Койчув / Khalid G. Koychuev <https://orcid.org/0009-0004-4723-125X>

Хадижат Ф.-К. Гапизова / Khadizhat F.-K. Gapizova <https://orcid.org/0000-0003-1588-039X>

Наталья М. Гашникова / Natalya M. Gashnikova <https://orcid.org/0000-0002-0891-0880>