

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ТЕЙЛЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

БУРСАКОВ Сергей Алексеевич, ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии
и репродуктивных биотехнологий»

КОВАЛЬЧУК Светлана Николаевна, ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии
и репродуктивных биотехнологий»

Трансмиссивные заболевания крупного рогатого скота, вызываемые возбудителями *Theileria* и *Babesia*, высокоопасны и приводят к значительным экономическим потерям в животноводстве. В данной работе был использован молекулярно-генетический метод идентификации этих возбудителей в крови животных одного из хозяйств Московской области. Возбудителя бабезиоза выявлено не было, в то время как количество зараженных *Theileria spp.* животных колебалось в значительных пределах – от 19 до 43 %, в зависимости от сезонности. Идентичность от 97 до 100 % показана для нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 18S рРНК обнаруженных изолятов с пятью разными видами *Theileria spp.* Полученные данные об уровне зараженности крупного рогатого скота *Theileria spp.* позволяют привлечь внимание к проблеме, связанной со значительными экономическими потерями в животноводстве России.

Введение. Тейлериоз (*Theileriosis*) и бабезиоз (*Babesiosis* – трансмиссивные, опасные кровепаразитарные болезни рогатого скота, вызываемые простейшими из рода *Theileria* и *Babesia*. Тейлериоз широко распространен на юге России, в государствах Средней Азии, в Казахстане, на Кавказе и Дальнем Востоке [1], а бабезиоз в России находят в пределах ареалов переносчиков нескольких видов пастбищных клещей, в основном на северо-западе и юге европейской части и в лесостепных районах юга Сибири [3]. Значительный экономический ущерб при тейлериозе и бабезиозе складывается из потерь в результате высокой смертности или вынужденного убоя животных, а также снижения их продуктивности. Переносчиками возбудителей у крупного рогатого скота (КРС) являются клещи почти всех родов семейства Ixodidae, включая *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* и др. На животных клещи нападают во всех активных фазах развития. Сезонность и динамика обоих заболеваний определяются видовым составом и биологическими особенностями переносчиков, а также погодными условиями. Максимальное количество больных животных регистрируют в июне-июле. Не исключена возможность заболевания скота тейлериозом не только в пастбищный, но и в стойловый период.

Возбудителем тейлериоза у КРС являются *Theileria parva*, *T. annulata*, *T. buffeli*, *T. orientalis*, *T. mutans*, *T. velifera*, *T. sergenti*, а бабезиоза – *Babesia divergens*, *B. bovis*, и *B. bigemina*. Естественным резервуаром и источником возбудителей инвазии являются больные животные и бабезио- и тейлерионосители. Считается, что после заражения животные могут оставаться пожизненными носителями тейлериоза [5], в то время как бабезиоз способен циркулировать в организме длительное время.

Существует широкий спектр серологических и молекулярно-генетических диагностических тестов для большинства экономически значимых видов *Theileria* и *Babesia*. Важнейшими критериями при выборе методов диагностики инфекционных заболеваний для их использования в эпизоотологии и эпидемиологии являются чувствительность и специфичность. Тесты на основе нуклеиновых кислот являются высокочувствительными, не зависящими от иммунокомпетентности животных, способными дифференцировать морфологически сходных паразитов. В последние

десятилетия происходит экспоненциальное наращивание арсенала молекулярно-генетических методов диагностики в связи с их преимуществами перед микроскопическими и серологическими методами по чувствительности и специфичности. Этому способствовало секвенирование геномов *T. orientalis* Shintoku, *T. equi* WA, *T. annulata* Ankara и *T. parva* Muguga, а также *B. microti*, *B. divergens*, *B. ovata*, *B. bigemina*, *B. bovis* (данные геномов доступны в банке данных пироплазм, который является частью Eukaryotic Pathogen Bioinformatic Resource (EuPathDB)).

Согласно полученным данным, в геномах *T. annulata*, *T. equi*, *T. parva* и *T. orientalis* присутствуют два гена 18S рибосомных РНК [7, 11]. При этом эти гены являются высококонсервативными, вероятно, вследствие согласованной эволюции [6], подразумевая, что генотипическое разнообразие, наблюдаемое в гене 18S рРНК у *Theileria*, обусловлено традиционной дивергентной эволюцией, связанной с точечными мутациями, инсерциями и делециями [18]. Было показано, что праймеры для обратной линейной блот-гибридизации (Reverse Line Blot Hybridization, RLB) для *Theileria* и *Babesia*, фланкирующие область гиперпеременной V4 гена 18S рРНК, и на сегодняшний день актуальны для всех членов этих родов [9].

Новые молекулярные диагностические тесты, особенно основанные на ПЦР, являются мощными инструментами для получения эпизоотологических и эпидемиологических данных, позволяя обнаруживать большинство инфицированных особей. Во всех случаях обнаружение молекулярными методами дает прямое подтверждение наличия геномного материала паразитов, присутствующего у животного в момент отбора проб.

Целью настоящего исследования было изучение распространения тейлериоза и бабезиоза КРС на территории Московской области на основе секвенирования высоковариабельного участка гена 18S рРНК.

Методика исследований. Образцы крови животных отбирали из яремной вены черно-белых голштинизированных коров ($n = 113$) двухкратно: весной ($n = 67$) и летом ($n = 46$), в одном из хозяйств Московской области.

ДНК выделяли из 100 мкл образцов цельной крови, отобранных в пробирки с ЭДТА Na₂, используя набор M-Sorb Kit (Синтол, Россия) согласно инструк-





ции производителя. Концентрацию ДНК оценивали на спектрофотометре BioPhotometer Plus (Эппендорф, Германия) и хранили при -20°C до использования в качестве матрицы для ПЦР.

Аmplификация фрагмента $\sim 400\text{--}420$ пн гена 18S рРНК, охватывающего V4 область видов *Babesia* и *Theileria*, проводили с помощью праймеров: FThBa-5'-GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATA-3' и RThBa 5'-СТААГААТТТАССТСТГАСАГТ-3' [9], синтезированных компанией Синтол (Россия). Реакции ПЦР проводились в объеме 20 мкл реакционной смеси, включающей 0,2 мМ каждого dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 0,2 мкМ каждого праймера, 1 \times Phusion HF буфера и 0,02 U/мкл высокоточной ДНК полимеразы Phusion Hot Start II (Thermo Fisher Scientific), 3 мкл очищенной ДНК в качестве матрицы. Реакции осуществлялись на амплификаторе Nux Technik (США). Условия реакции: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин с последующими 40 циклами ПЦР, каждый из которых состоял из стадии денатурации ($45'$ при 95°C), стадии отжига праймеров ($45'$ при 50°C) и стадии элонгации (1 мин при 72°C). Финальная элонгация проводилась при 72°C в течение 10 мин.

Продукты амплификации положительных образцов анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Участки геля с ДНК ожидаемой длины вырезали и очищали с помощью Cleanup Mini Gel DNA Recovery Kit (Evrogen) согласно инструкции производителя. ДНК клонировали с использованием набора CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Scientific) в клетках *E. coli* DH5 α согласно рекомендациям производителя. После очистки плазмид с использованием набора Plasmid Miniprep (Evrogen, Россия) проводили двухнаправленное секвенирование методом Сэнгера (Evrogen, Россия), сиквенсы депонированы в GenBank (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>). Полученные сиквенсы анализировали с использованием BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Филогенетический анализ проводили помощью программы MEGA 10.0 X (www.megasoftware.net) [14] методами ближайших соседей и максимального правдоподобия. Статистическая надежность узлов молекулярного дерева оценивалась с использованием бутстреп-анализа.

Результаты исследований. Поскольку ПЦР является лучшим средством в диагностировании тейлериоза и бабезиоза во время состояния носительства при отсутствии клинических симптомов [13], выявление животных, инфицированных *Theileria* spp. и *Babesia* spp., проводили этим методом.

Клонирование и секвенирование гена 18S рРНК часто используют для изучения разнообразия *Theileria* spp. и *Babesia* spp. в разных частях мира [4, 8, 16]. Однако такие данные практически отсутствуют для России. Клонирование и секвенирование гена 18S рРНК позволяет непосредственно определять разнообразие видов этих паразитов в популяции скота, даже при наличии возможных коинфекций, для чего подходит обычная ПЦР [17]. Консервативная функция и структура гена 18S рРНК с наличием филогенетически информативных переменных областей позволяют использовать его для определения филогенетических взаимосвязей между видами [12].

Таким образом, результаты для *Theileria* spp. и *Babesia* spp. были получены путем ПЦР-амплификации фрагмента гена 18S рРНК, охватывающего область V4 паразитов *Babesia* и *Theileria*. Все полу-

ченные последовательности были отредактированы и собраны до конечной длины $\sim 400\text{--}420$ пн. Последовательности генов 18S рРНК с максимальным процентом идентичности *Theileria* spp. были получены из GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Поскольку невозможно дифференцировать *Theileria* spp. и *Babesia* spp. по длине амплифицированных фрагментов, положительные продукты ПЦР были клонированы и секвенированы с использованием прямого и обратного праймеров. Идентичность и возможные различия последовательностей генов 18S рРНК *Theileria* и *Babesia* обнаруженных изолятов выявляли путем их сравнения с сиквенсами из базы данных GenBank с использованием алгоритма blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Анализ последовательностей фрагмента гена 18S рРНК показал, что все они принадлежат *Theileria* spp. (см. таблицу). Сходство гена 18S рРНК с идентичностью в 97–100 % было отмечено с последовательностями высокопатогенного для КРС вида *T. annulata* и с видами *T. orientalis*, *T. sergenti*, *T. sinensis* и *T. buffeli*, имеющими слабую патогенность (регистрационные номера см. рисунок) и вызывающими легкие заболевания, протекающие обычно бессимптомно, и лишь изредка приводящими к более тяжелым заболеваниям.

Уровень инфицирования КРС *Theileria* spp.

Зараженность	$n_1 = 67$		$n_2 = 46$		$\Sigma n_1, n_2 = 113$	
	Число коров	%	Число коров	%	Число коров	%
Коровы, не зараженные <i>Theileria</i> spp. и <i>Babesia</i> spp.	54	81	26	57	80	71
Коровы, зараженные <i>Theileria</i> spp.	13	19	20	43	33	29
Коровы, зараженные <i>Babesia</i> spp.	0	0	0	0	0	0

Примечание: n_1 – количество образцов крови, собранных весной; n_2 – количество образцов крови, собранных летом

Мы также сравнили экспериментально полученные последовательности с последовательностями различных штаммов *Babesia* из базы данных, в том числе трех видов, вызывающих бабезиоз (клещевую лихорадку) у КРС – *B. bovis*, *B. bigemina* и *B. divergens*. Однако найденная идентичность была довольно низкой по сравнению с видами *Theileria* (*B. bovis* 83 %, *B. major* 83 %, *B. bigemina* 85 %, *B. divergens* 85 %; *Theileria* spp. > 97 %).

Возможно, отсутствие ДНК *Babesia* spp. в анализируемых образцах связано с сезонностью, либо с неспособностью обнаружить *Babesia* spp. ввиду уровня паразитии ниже порога обнаружения методом ПЦР [18].

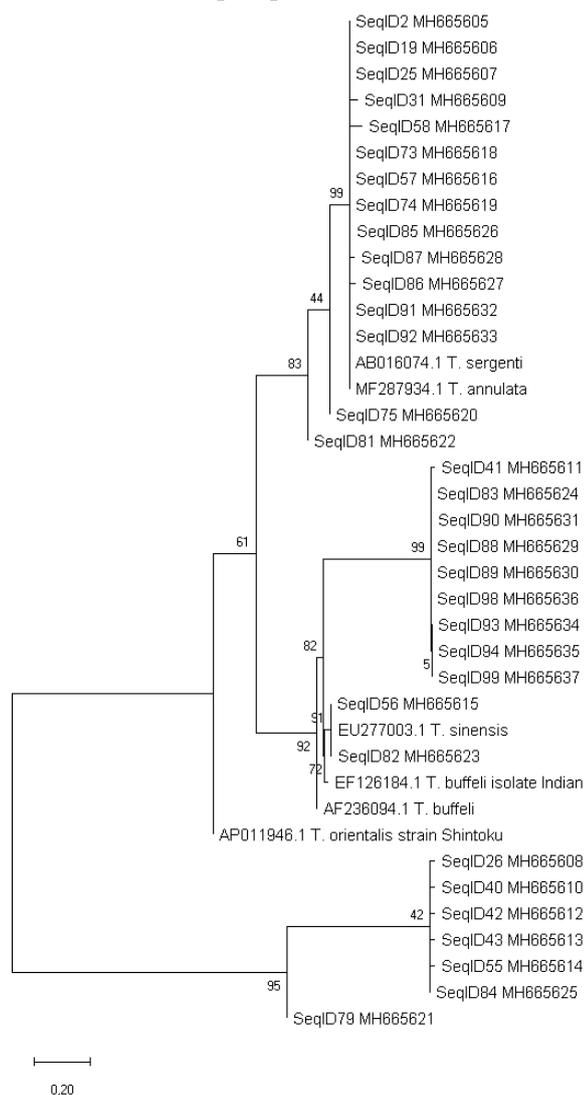
Ранее было показано, что бабезиоз КРС, вызываемый *B. bigemina*, регистрируется с июня до начала сентября sporadически и характеризуется ярко выраженной сезонностью в условиях Кировской области [2]. Несмотря на то, что КРС может играть роль резервуара [15], в наших образцах, собранных в марте и августе, не было обнаружено ни одного случая присутствия ДНК *Babesia* sp.

Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основе сиквенсов гена 18S рРНК, выявило связь обнаруженных нами изолятов с пятью известными видами *Theileria* (см. рисунок).

Влияние клещей и клещевых заболеваний на здоровье и продуктивность КРС продолжает расти во многих частях мира и России. Одновременно увеличивается процент идентифицированных коинфекций, иногда достигающий шести или более [9]. Высокая



частота возможных коинфекций свидетельствует, что клинические проявления могут быть сложными и их выявление может представлять затруднения. Проведенное исследование представляет важные данные по оценке распространенности тейлериоза у КРС на основе идентификации наличия ДНК *Theileria* в одной биоклиматической зоне центральной России – Московской области. Полученные данные свидетельствуют о серьезной эпизоотологической ситуации и необходимости профилактики и борьбы с тейлериозом крупного рогатого скота. Дополнительные исследования в области важных гемопротозойных заболеваний позволят сделать верную экономическую оценку возможных экономических потерь в российском животноводстве.



Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей гена 18S рРНК *Theileria* spp., обнаруженных у коров в настоящем исследовании и пяти известных видов *Theileria* из баз данных методом максимального правдоподобия, основанным на модели Тамура-Ней [19]. Около каждого узла указана его надежность в процентах, в значении числа 1000 псевдореплик

Заключение. В этом исследовании мы обнаружили значительное присутствие гемопротозойной паразитарной инфекции у КРС в одном из хозяйств Московской области. Анализ сиквенсов клонов не показал признаков инфекции *Babesia*, и все последовательности соответствовали только *Theileria* spp. Разными видами *Theileria* оказалось заражено 33 коровы из всего стада, в то время как 80 коров не имели изучаемых инфекций. Уровень зараженности значи-

тельно разнился в зависимости от сезона и составлял 19 % в начале весны и 43 % летом, во время наибольшей активности клещей, что подтверждает сезонную зависимость инфекции, вызываемой *Theileria* spp. у КРС.

Высокий уровень распространения тейлериоза должен привлечь внимание к научным программам, направленным на разработку методов ранней диагностики, эпизоотологический мониторинг и эффективную профилактику тейлериоза КРС. Данные о распространении патогенных и непатогенных для КРС видов *Theileria* spp. позволят разработать эффективные стратегии контроля тейлериоза КРС в России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колабский Н.А. Тейлериозы животных. – 2 изд. – Л.: Колос, 1978. – 198 с.
2. Скорнякова О.О. Эпизоотологический мониторинг и динамика сезонной восприимчивости крупного рогатого скота к бабезиозу и анаплазмозу // Российский паразитологический журнал. – 2014. – № 4. – С. 34–39.
3. Шевицов А.А. Ветеринарная паразитология. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1970. – 463 с.
4. Criado-Fornelio A., Buling A., Asenzo G., Benitez D., Florin-Christensen M., Gonzalez-Oliva A., Henriques G., Silva M., Alongi A., Agnone A., Torina A., Madruga, C.R. // Veterinary Parasitology, 2009, Vol. 162, P. 200–206.
5. de Waal D.T. Equine piroplasmiasis: a review // Br. Vet. J., 1992, 148, P. 6–14.
6. Eickbush T.H., Eickbush D.G. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes // Genetics, 2007, Vol. 175, P. 477–485.
7. Gardner M.J., Bishop R., Shah T., de Villiers E.P., Carlton J.M., Hall N. Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes // Science, 2005, Vol. 309, P. 134–137.
8. Gebrekidan H., Hailu A., Kassahun A., Rohousová I., Maia C., Talmi-Frank D., Warburg A., Baneth G. *Theileria* infection in domestic ruminants in northern Ethiopia // Veterinary Parasitology, 2014, Vol. 200, P. 31–38.
9. Gubbels J.M., de Vos A.P., van der Weide M., Viseras J., Schouls L.M., de Vries E. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization // Journal of Clinical Microbiology, 1999, Vol. 37, P. 1782–1789.
10. Hailemariam Z., Krücken J., Baumann M., Ahmed J.S., Clausen P.H., Nijhof A.M.. Molecular detection of tick-borne pathogens in cattle from Southwestern Ethiopia // PLoS One. 2017, 12(11): e0188248.
11. Hayashida K., Hara Y., Abe T., Yamasaki C., Toyoda A., Kosuge T., Y., Sato Y., Kawashima S., Katayama T., Wakaguri H., Inoue N., Homma H., Tada-Umezak M., Yagi Y., Fujii Y., Takuya Habara, Minoru Kanehisa, Watanabe H., Ito K., Gojobori T., Sugawara H., Imanishi T., Weir W., Gardner M., Pain A., Shielis B., Hattori M., Nene V., Sugimoto C. Comparative genome analysis of three eukaryotic parasites with differing abilities to transform leukocytes reveals key mediators of *Theileria*-induced leukocyte transformation // mBio. 2012, Vol. 3, No. 5, P. 204–212.
12. Hillis D.M., Dixon M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference // The Quarterly Review of Biology, 1991, Vol. 66, P. 411–453.
13. Kocan K.M., de la Fuente J., Blouin E.F., Coetzee J.F., Ewing S.A. The natural history of *Anaplasma marginale* // Veterinary Parasitology, 2010, Vol. 167, P. 95–107.
14. Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Molecular Biology and Evolution, 2018, Vol. 35, P. 1547–1549.
15. Lagrée A.C., Rouxel C., Kevin M., Dugat T., Girault G., Durand B., Pfeffer M., Silaghi C., Nieder M., Boulouis H.J., Haddad N. Co-circulation of different *A. phagocytophilum* variants within cattle herds and possible reservoir role for cattle // Parasitology and Vectors, 2018, Vol. 11, P. 163.



16. Liu Q., Zhou Y.Q., He G.S., Oosthuizen M.C., Zhou D.N., Zhao J.L. Molecular phylogenetic studies on *Theileria* spp. isolates (China) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences // Tropical Animal Health and Production, 2010, Vol. 42, P. 109–114.

17. Mans B.J., Pienaar R., Potgieter F.T., Latif A.A. *Theileria parva*, T. sp. (buffalo) and T. sp. (bougasvlei) 18S variants // Veterinary Parasitology, 2011, Vol. 182, P. 382–383.

18. Mans B.J., Pienaar R., Latif A.A. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology // International Journal Parasitology: Parasites and Wildlife, 2015, Vol. 4, No. 1, P. 104–18.

19. Suarez C.E., Laughery J.M., Schneider D.A., Sondgeroth K.S., McElwain T.F. Acute and persistent infection by a transfected Mo7 strain of *Babesia bovis* // Molecular and Biochemical Parasitology, 2012, Vol. 185, P. 52–57.

20. Tamura K. and Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution, 1993, Vol. 10, P. 512–526.

Бурсаков Сергей Алексеевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий». Россия.

Ковальчук Светлана Николаевна, канд. биол. наук, директор, ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий». Россия.

127422, г. Москва, ул. Костякова, 12, стр. 4.

Тел.: (495) 610-21-31.

Ключевые слова: клещевые инфекции; *Theileria* spp.; крупный рогатый скот; *Babesia* spp.; *Bos taurus*.

DISTRIBUTION OF BOVINE THEILERIOSIS IN THE MOSCOW REGION

Bursakov Sergey Alekseevich, Candidate of Biological Sciences, Senior researcher, Federal State Budget Scientific Institution Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.

Kovalchuk Svetlana Nikolaevna, Candidate of Biological Sciences, Federal State Budget Scientific Institution Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.

Keywords: tick-borne disease; *Theileria* spp.; cattle; *Babesia* spp.; *Bos Taurus*.

The transmissible diseases of cattle caused by the pathogens Theileria and Babesia are highly hazardous to animals and lead

to significant economic losses in cattle breeding. In this work, a molecular-genetic method was used to identify these pathogens in the blood of animals of one of the farms in the Moscow Region. The causative agent of babesiosis was not revealed, while the level of distribution of Theileria spp. fluctuated in significant range from 19 to 43%, depending on seasonality. Identity from 97 to 100% to five different species of Theileria spp. was shown for the nucleotide sequences of the fragment of 18S rRNA gene of the obtained Theileria spp. isolates. The obtained data on the level of infestation of cattle by Theileria spp. allow drawing attention to a problem that can play a significant role in the economic losses in the livestock in Russia.

DOI

УДК 504.54:63;631.4;470.44;631.434

ВЛИЯНИЕ ЛЕСНОЙ ПОЛОСЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ АГРОЛАНДШАФТА

БЕРИН Александр Юрьевич, ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока»

МЕДВЕДЕВ Иван Филиппович, ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока»

ГУБАРЕВ Денис Иванович, ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока»

ДЕРЕВЯГИН Сергей Сергеевич, ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока»

ГРАФОВ Виктор Петрович, Аркадакская сельскохозяйственная опытная станция

Рассмотрены физико-биологические особенности формирования агроландшафта на примере чернозема обыкновенного, чернозема южного, каштановой почвы. Показано, что по мере приближения к лесной полосе происходит улучшение структуры почвы и ее водопрочности. Количество агрономически ценных агрегатов по результатам сухого и мокрого рассева на почве сельскохозяйственного использования снижается в сравнении с целиной. Лесная полоса по сравнению с открытым участком поля позволяет снизить плотность сложения почвы в среднем по всем агроландшафтам на 0,2 г/см³, при этом пористость почвы возрастает на 4,8 %. С увеличением плотности сложения пористость почвы снижается. Для агроландшафта на черноземе обыкновенном наиболее благоприятная пористость почвы отмечается на целинном участке 53,24 %, она постепенно снижается до 42,23 % на почве в открытом поле; на черноземе южном – с 49,73 до 29,75 %. Наибольшие различия отмечены на каштановой почве – с 50,46 до 26,87 %. Меньше подвергаются снижению пористости почвы, находящиеся в зоне влияния лесной полосы, в среднем на 7,2 %. Уровень нитрификационной способности почв тесно коррелирует с уровнем содержания гумуса в них (r = 0,64).

Введение. Агроландшафт – целостная, внутренне неоднородная природно-сельскохозяйственная геосистема, включающая в себя как обрабатываемые земли, так и уголья иного функционального профиля [6]. Нарушение одного из объектов агроландшафта приводит к дисбалансу всей системы. Поддерживать нормальное функционирование агроландшафта позволяет применение различных мероприятий, направленных на устранение причин возникновения такого дисба-

ланса. Наиболее распространенным мелиоративным мероприятием является размещение лесных полос. Защитные лесные насаждения участвуют в распределении снега на полях, улучшают микроклимат, а также влияют на агрофизические свойства и процессы, протекающие в почве [7].

Цель данной работы – выявить физико-биологические особенности формирования агроландшафта на примере чернозема южного, чернозема обыкновенно-