

На правах рукописи



003059694

**Козлова
Наталья Петровна**

**Совершенствование методов диагностики,
профилактики и лечения при ассоциированном
анаплазмозе крупного рогатого
скота**

**16.00.03. – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

ОМСК – 2007

Работа выполнена в институте ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет», ФГУ Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора

Научные руководители:

доктор ветеринарных наук профессор
Красиков Александр Пантелеевич

доктор медицинских наук профессор
Рудаков Николай Викторович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук профессор
Сидоров Геннадий Николаевич

доктор ветеринарных наук профессор
Бажин Михаил Аристоклеви

Ведущее учреждение: ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН

Защита состоится «20» септ» 2007 г в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220 050 03 при ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет» в институте ветеринарной медицины ФГОУ ВПО ОмГАУ по адресу 644122, г Омск-122, ул Октябрьская, 92, тел 24-15-35, тел /факс 23-30-31

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке института ветеринарной медицины ФГОУ ВПО ОмГАУ

Автореферат разослан «24» септ» 2007 г

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат ветеринарных наук, доцент

 Н П Жабин

1. Общая характеристика работы

Актуальность темы Анаплазмоз крупного рогатого скота – трансмиссивная, природно-очаговая болезнь, протекающая с явлениями глубокой анемии аутоиммунной природы и истощения, вызываемая возбудителями из рода *Anaplasma*. Болезнь распространена во всех частях света и наносит животноводству значительный ущерб в результате резкого снижения продуктивности и гибели крупного рогатого скота (Н А Казаков, 2003)

На территории Южного Урала и Западной Сибири анаплазмоз крупного рогатого скота ранее официально не регистрировался. Вместе с тем, в последние годы в ряде хозяйств Омской области периодически отмечались вспышки болезни крупного рогатого скота с клиническими признаками анаплазмоза (В А Стрельчик и др., 2000)

У людей часто регистрируется гранулоцитарный эрлихиоз – это трансмиссивная, остро протекающая лихорадочная болезнь. Передающаяся при присасывании клещей и часто приводящая к летальному исходу (Н В Рудаков, 2001)

Весной 2001 г. в зоне Южного Урала (Челябинская область) был проведен сбор клещей – 39 особей, в двух из которых были обнаружены не идентифицированные до вида эрлихии (С Н Шпынов и др., 2002, 2004)

По данным отечественной и зарубежной литературы, возбудители анаплазмоза имеют близкое родство с эрлихиями, они относятся к одному и тому же семейству *Anaplasmataceae*. Не доказано генетическое родство и отличие между ними, не установлено таксономическое положение, которое должны занимать каждый из них. Анаплазмоз зачастую протекает в ассоциации с другими инфекционными болезнями (Н А Казаков, 2003)

В связи с выше изложенным весьма актуальным является выяснить распространение анаплазмоза крупного рогатого скота в Южно-Уральском и Западно-Сибирском регионах, роль клещей в передаче инфекции, провести усовершенствование диагностики, профилактики и лечения данной болезни.

Цель исследований изучить распространение анаплазмоза крупного рогатого скота и основных переносчиков инфекции в Южно-Уральском и Западно-Сибирском регионах, усовершенствовать диагностику и лечение при данной болезни.

Для реализации поставленной цели были определены следующие задачи

- выяснить распространение анаплазмоза крупного рогатого скота в различных нозоареалах Южно-Уральского и Западно-Сибирского регионов и его ассоциаций с другими инфекциями,
- изготовить анаплазмозные антиген и антисыворотку для люминисцентной микроскопии,
- приготовить анаплазмозный эритроцитарный диагностикум,
- изучить активность и специфичность полученных антигенов и диагностической сыворотки в РНИФ и РНГА,
- изыскать средства и разработать способы терапии и профилактики при анаплазмозе крупного рогатого скота, в т.ч. ассоциированном с другими инфекционными болезнями

Научная новизна работы В условиях Западно-Сибирского и Южно-Уральского регионов с помощью разработанных лабораторных методов диагностики установлено широкое распространение анаплазмоза в 90-100% обследованных хозяйств, при высокой инфицированности животных. Изучены формы проявления анаплазмоза в виде моноинфекции и в ассоциации с другими болезнями. Изготовлены антигены и антисыворотки для реакции непрямой иммунофлуоресценции. С помощью, которых можно выявлять возбудителей анаплазмоза в клещах переносчиках на различных стадиях их развития, а также антитела в сыворотке крови больных животных и анаплазмоносителей. Разработан культуральный метод диагностики анаплазмоза с использованием клеток Vero. Получен анаплазмозный эритроцитарный диагностикум для РНГА. Разработаны, испытаны в экспериментальных и производственных условиях и предложены ветеринарной практике эффективные схемы лечения больных анаплазмозом животных, в т.ч. ассоциированном и лабораторные методы контроля их эффективности.

Теоретическая и практическая значимость работы. Материалы диссертации вносят вклад в изучение переносчиков (клещей) возбудителя анаплазмоза на различных стадиях развития, в совершенствование лабораторной диагностики, профилактики и мер борьбы с данной инфекцией с учетом ассоциаций других микроорганизмов участвующих в инфекционном процессе. Разработаны методики получения анаплазмозного антигена и антисыворотки для РНИФ и эритроцитарного диагностикума для РНГА, которые позволят апробировать и внедрить данные экспресс-методы диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота в условиях промышленного животноводства Южно-Уральского и Западно-Сибирского регионов. На основании проведенных исследований разработаны методические рекомендации «Усовершенствование методов диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота» и «Схемы лечения и профилактики при анаплазмозе крупного рогатого скота». Применение усовершенствованных методов диагностики позволит проводить лабораторную диагностику данной болезни в различные периоды ее развития. Применение разработанных схем лечения при анаплазмозе крупного рогатого скота создаст условия для более эффективного проведения мероприятий по борьбе с данной болезнью.

Апробация работы. Материалы исследований доложены и обсуждены на научных конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ 2003–2005гг (Омск) «Роль ветеринарного образования в подготовке специалистов агропромышленного комплекса» (Омск, 2003), «Результаты научных исследований в ветеринарии и зоотехнии в агропромышленном комплексе» (Омск, 2004), «Проблемы ветеринарного образования и научных исследований в агропромышленном комплексе» (Омск, 2005), на Межрегиональных научно-практических конференциях «Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных» (Омск, 2004, СО РАСХН - ВНИИБТЖ), «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» (Омск, 2005, СО РАСХН - ВНИИБТЖ), на Международной конференции «Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных (Ульяновск, 2006),

на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях» (Краснодар, 2006)

Внедрение результатов исследований. Результаты исследований вошли в методические рекомендации «Схемы лечения и профилактики при анаплазмозе крупного рогатого скота», рассмотренные и одобренные на заседаниях ученого совета ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ от 25 05 2005 г, протокол №8 и Центра научного обеспечения АПК Омской области при Министерстве сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 26 05 2005 г, протокол №4 и «Усовершенствование методов диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота», рассмотренные и одобренные на заседаниях ученого совета ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ от 28 06 2006 г, протокол №7 и Центра научного обеспечения АПК Омской области при министерстве сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 12 09 2006 г, протокол №5. Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедрах эпизоотологии и инфекционных болезней животных и микробиологии, вирусологии и иммунологии Института ветеринарной медицины ФГОУ ВПО ОмГАУ и Института повышения квалификации руководителей и специалистов АПК ОмГАУ, на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ОмГМА, а также в курсе лекций Тюменского института переподготовки кадров агробизнеса

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1 Распространение анаплазмоза крупного рогатого скота в Южно – Уральском и Западно – Сибирском регионах и ассоциативные формы его проявления
- 2 Приготовление опытных серий анаплазмозных антигена и сыворотки для РНИФ и эритроцитарного диагностикума для РНГА
- 3 Изучение в производственных условиях диагностической ценности РНИФ и РНГА
- 4 Разработка и испытание в производственных условиях различных схем профилактики анаплазмонительства и лечения больных животных

Публикации По теме диссертации опубликовано 3 статьи

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений, списка литературы. Работа иллюстрирована 14 таблицами, 7 рисунками. Список литературы включает 169 источников, из них 70 зарубежных авторов

2. Собственные исследования

2 1. Материалы и методы

Тема диссертационной работы является самостоятельным разделом комплексной государственной программы «Профилактика (диагностика) и меры борьбы с ассоциативными инфекционными и инвазионными болезнями животных и птиц» и имеет № государственной регистрации 01 2 001100602

Работа проводилась в период с 2002 по 2006 годы в лаборатории микст инфекций кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней животных ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ. Часть исследований была выполнена в лаборатории зоонозных инфекций ФГУ Омского НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора

Объектом исследований являлся крупный рогатый скот различных возрастов, принадлежавший хозяйствам Омской, Челябинской области и Республики Башкортостан

Прижизненно от животных исследовали кровь и ее сыворотку, секрет молочной железы, цервикагогинальную и бронхоальвеолярную слизь. Кровь для серологических исследований брали из яремной, а для гематологических – из краевой ушной вены

При эпизоотологическом обследовании хозяйств на анаплазмоз крупного рогатого скота учитывали клинические признаки болезни

Изучение морфологических и тинкториальных свойств выделенных микроорганизмов осуществляли при окраске мазков – препаратов по Романовскому-Гимзе. Микроскопирование проводили при помощи светового микроскопа МБИ-15 с иммерсионным объективом при увеличении (15x100). Интенсивность паразитемии определяли количеством анаплазм в 100 полях зрения (п/з) микроскопа, в %

Видоспецифические сыворотки к полевому штамму анаплазм получали путем гипериммунизации кроликов по схеме D Schimmel в модификации А П Красикова и Н Н Новиковой (2002). Для постановки РНИФ использовали ослиный антикроличий глобулин, меченный ФИТЦ (флуоресцен изотиоционат натрия)

Для культуральных исследований применяли культуру клеток Vero. Для накопления антигенной биомассы, проводили до 8 пассажей анаплазм. Культуру клеток с анаплазмами после каждого пассажа просматривали при помощи световой и люминесцентной микроскопии

Больных и анаплазмозоносителей (*по результатам микроскопии*) дополнительно исследовали на ассоциативные формы течения анаплазмоза. Для этого применяли стандартные и дополнительные, разработанные в лаборатории микст инфекций кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней методы серологической диагностики – прямой и непрямой иммунофлуоресценции (РПИФ и РНИФ) для прижизненного выявления антигенов и антител (А П Красиков, В Э Малошевич, 2005). Фиксацию мазков проводили по методу Моды с соавт (1958), а постановку РНИФ по методике, предложенной Уэллером и Кунсом (1945). В качестве антигенов применяли антигены вакцинных штаммов и стандартные антигены, используемые для постановки РА и РСК, а в качестве антител – гомологичные антигенам кроличьи и бычьи антисыворотки, антивидовые для РНИФ и специфические сальмонеллезные, риккетсиозные, листериозные для РПИФ люминесцентные сыворотки меченные ФИТЦ

Мазки просматривали под люминесцентным микроскопом ЛЮМ Р-8 при увеличении в 900 раз. Степень флуоресценции антител оценивали по 4-х крестной системе (Вайтекер и др., 1958). При этом кроличьи сыворотки против возбудителей хламидиоза, диплококкоза, стрептококкоза и стафилококкоза были получены и изучены на специфичность и чувствительность в лаборатории микст инфекций кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней (Н В Лобанова, 2004)

Опыт по изучению активности анаплазмозного антигена с гемолимфой клещей, инфицированных возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота проводили совместно с аспирантом Бейсембаевым К К на клещах *D. reticulatus* и *D.*

silvarum

Конструирование анаплазмозного эритроцитарного диагностикума проводили по методике изготовления бруцеллезного R диагностикума для РНГА, модифицированной А П Красиковым (1982)

Реакции непрямой иммуофлуоресценции и непрямой гемагглютинации проводили в экспериментальных и производственных условиях с сыворотками крови крупного рогатого скота из неблагополучных по анаплазмозу хозяйств Южно – Уральского и Западно – Сибирского регионов, РНИФ с материалом от клещей, собранных в указанных регионах

Опыты по сравнительному изучению химиотерапевтической эффективности некоторых препаратов тетрациклинового и фторхинолонового ряда, а также лекарственной смеси спирта с риванолом и азидина с нилвермом проводили в хозяйствах Омской области ЗАО «Колос», СПК «Большевик», АОЗТ «Новороссийское» на спонтанно инфицированном крупном рогатом скоте Производственные испытания проводили на 300 головах крупного рогатого скота в двух хозяйствах Челябинской области и одном хозяйстве Республики Башкортостан, спонтанно инфицированных возбудителем анаплазмоза

Расчет экономической эффективности применения схем лечения при анаплазмозе крупного рогатого скота осуществляли в соответствии с методикой определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий, утвержденной Министерством сельского хозяйства и продовольствия РФ, Департаментом ветеринарии, Московской государственной академией ветеринарной медицины и биотехнологии им К И Скрябина (1997)

Статистическую обработку материалов проводили согласно общепринятым методикам (А М Мерков, Л Е Поляков, 1974)

Часть исследований была проведена совместно с сотрудниками ФГУ Омского НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора (И Е Самойленко, В В Якименко, Г П Юртова), а также с аспирантом ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ К К Бейсембаевым, которым выражаем глубокую благодарность

3. Результаты исследований

3.1. Распространение анаплазмоза крупного рогатого скота и его ассоциаций с другими инфекциями в зоне Южного Урала и Западной Сибири

Исследования по изучению эпизоотической ситуации по анаплазмозу крупного рогатого скота в зоне Южного Урала (Челябинская область и Белорецкий район Республики Башкортостан, находящийся в угрожаемой по анаплазмозу зоне) и Западной Сибири (Омская область) проводили с применением эпизоотологического, клинического, микроскопического и серологического методов

Работа по выяснению распространения, сезонности проявления, степени восприимчивости разных возрастных групп крупного рогатого скота и основных путей распространения анаплазмоза, а также вопроса о возможности ассоциативных форм течения анаплазмоза, проведена на 500 головах крупного рогатого скота из 20 хозяйств, спонтанно инфицированных возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота

Для этого, нами было выборочно исследовано 400 коров в возрасте 3-7 лет, 100

телят 4-6 мес возраста, принадлежащие 9 хозяйствам Челябинской области и одному хозяйству Республики Башкортостан, 10 хозяйствам Омской области При этом в Республике Башкортостан ООО «Верхнебельский» Белорецкого района – анаплазмоз обнаружен у 45% животных, в Челябинской области в СПК «Малиновское» Агаповского района, СПК «Выбор», ООО «Искра», ООО «Приморское» – 20%, в ЗАО «Первомайское» – 40%, в ЗАО «Зингейское», ЗАО «Наравчатское», СП «Буранное», ОП «Горный» – 30% Наибольшее количество анаплазмозоносителей в зоне Южного Урала приходится на Белорецкий район Республики Башкортостан (45%)

Омской области анаплазмоз выявлен в ЗАО «Курнасово» – 90%, в СПК «Красный Яр» и СПК «Кольтюгино» – 50%, в СПК «Такмык» – 20%, СПК «Большевик» Полтавского района – 70%, в АО «Колос» Павлоградского района – 30 % коров и 60% телят, в АОЗТ «Новороссийское» Нововаршавского района – у 60% коров и 30% телят, в СПК «Семеновка» – 40%, в СПК «Тевриз» – 20% животных. Наибольшее число случаев анаплазмозоносительства (90%) среди крупного рогатого скота 3-5 летнего возраста приходится на Большереченский район Омской области

При эпизоотологическом обследовании хозяйств Омской области и Южного Урала регистрировали острое и подострое течение анаплазмоза крупного рогатого скота, главным образом с апреля по октябрь, когда на животных паразитирует большое количество иксодовых клещей

При проведении комплексных исследований по выявлению больных анаплазмозом животных было отмечено, что инфекционный процесс у некоторых животных осложнялся ассоциацией других инфекций

Так в ООО «Верхнебельский» Белорецкого района Республики Башкортостан из 45% реагирующих на анаплазмоз коров 30% приходилось на ассоциативную форму его проявления с лептоспирозом, ИРТ-ПВ, хламидиозом В Челябинской области в СПК «Малиновское» моноинфекция зарегистрирована – у 20% животных, в ЗАО «Первомайское» – у 30% – в ассоциативной форме (хламидиоз, лептоспироз, сальмонеллез), в ЗАО «Зингейское» – у 20% (хламидиоз), в ООО «Искра» – у 40% (хламидиоз, лептоспироз, сальмонеллез, ИРТ-ПВ), в ЗАО «Наравчатское» – у 20% (хламидиоз, лептоспироз), в ООО «Приморское» – у 10% (лептоспироз), в СП «Буранное» – у 10% (лептоспироз), в СПК «Выбор» – у 10% (ИРТ-ПВ), в ОП «Горный» – у 20% (хламидиоз, лептоспироз)

В Омской области в ЗАО «Курнасово» из 90% реагирующих на анаплазмоз коров 30% приходилось на ассоциацию с лептоспирозом и сальмонеллезом В СПК «Красный Яр» моноинфекция зарегистрирована у 50% животных, в СПК «Такмык» – у 10% и 10% – в ассоциативной форме (хламидиоз, лептоспироз, сальмонеллез) В СПК «Большевик» из 70% коров и телят, инфицированных анаплазмами 10% приходилось на долю животных инфицированных в ассоциации с хламидиями, лептоспирами, листериями, сальмонеллами, вирусами ИРТ-ПВ и ПГ-3 В ЗАО «Колос» – у 20% взрослого скота анаплазмоз, регистрировали как моноинфекцию и у 10% в ассоциации с сальмонеллезом, у 50% телят в ассоциированной форме (с хламидиозом, лептоспирозом, диплококкозом, сальмонеллезом и ПГ-3) и у 10% телят, как моноинфекцию В СПК «Новороссийском» из числа исследованных животных у 30% взрослого скота инфекционный процесс проявлялся в виде моно – и у 30% в виде ассоциаций с хламидиозом, лептоспирозом, сальмонеллезом, листериозом, а у молодняка в той же ассоциации за исключением замены возбудителя сальмонеллеза на ИРТ-ПВ,

в СПК «Семеновка» – 40% в виде ассоциированной инфекции с хламидиями, лептоспирами, вирусом ИРТ-ПВ и листериями В СПК «Кольтюгино» – у 50% из числа обследованных животных инфекционный процесс протекал в ассоциации с хламидиями, сальмонеллами, вирусом ИРТ-ПВ, в СПК «Тевриз» – у 20% животных анаплазмоз зарегистрирован в виде моноинфекции

3.2. Морфологические и тинкториальные свойства возбудителя анаплазмоза и его локализация в клетках крови

Попадая в кровь анаплазмы проникают в эритроциты путем инвагинации клеточной мембраны и образования вакуоли. Затем они делятся, формируют тельца включения, содержащие до 8 «начальных телец» располагающихся рядом. Тельца включения наиболее многочисленны в острую фазу инвазии, но некоторые могут сохраняться годами (Д Уркхарт и др., 2000)

В ходе наших исследований при микроскопии мазков от крупного рогатого скота, окрашенных по Романовскому-Гимзе были обнаружены тельца включения в эритроцитах розовато-фиолетовые точкоподобные, локализирующиеся ближе к периферии эритроцита. Аналогичные тельца включения были обнаружены в мазках из крови экспериментально зараженных белых мышей

В качестве биологической модели для культивирования и изучения анаплазм использовали культуру клеток Vero. Анализ электронно-микроскопических исследований показал, что культура клеток Vero пораженная возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота нарушена, а цитоплазма содержит большое количество анаплазмозных «морул» различной величины и формы. Цитоплазматическая мембрана клетки Vero истончена и местами разорвана. Морулы содержащие анаплазмы располагаются как в цитоплазме клеток, так и за ее пределами

4. Усовершенствование методов диагностики и лечения анаплазмоза крупного рогатого скота

4.1. Изготовление опытных сывороток анаплазмозного антигена и сыворотки для РНИФ

Из известных в настоящее время и широко доступных для ветеринарных лабораторий серологических реакций остается реакция иммунофлюоресценции

Перед нами стояла задача получить анаплазмозный антиген и диагностическую анаплазмозную сыворотку и изучить их специфичность и активность в РНИФ

Для гипериммунизации использовали восьми суточную культуру полевого штамма *A. sp. Omsk*, полученную на культуре клеток Vero. Заражение культур клеток Vero проводили приготовленной суспензией из селезенки от больной анаплазмозом коровы. Для выделения анаплазм из клеток использовали способ попеременного замораживания (при $t\ 20^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин) и размораживания при комнатной температуре и центрифугирования клеточной взвеси при 3000 г – 15 мин. Для дальнейшей работы использовали супернатант, который дополнительно центрифугировали при 6000 г в течение часа. Полученный осадок трижды отмывали стерильным физиологическим раствором, центрифугируя в том же режиме, и доводили до кон-

центрации $1,7 \times 10^9$ микробных тел в 1 мл по ОСМ ГИСК им Л А Тарасевича Гипериммунизацию проводили на 3 кроликах породы шиншилла весом 2,5-3 кг

Титры антител учитывали на 7, 14, 22 и 30 сутки после введения анаплазмы в РНИФ, антиген для которой готовили из этого же штамма и использовали после инактивации на водяной бане при 70°C в течение 30 мин в концентрации 1 млрд м т

Полученная анаплазмозная кроличья сыворотка была изучена на специфичность и активность в РНИФ Установлено, что антисыворотка, строго специфична к антигену, против которого она получена Данная сыворотка, в разведении 1:5 давала перекрестную реакцию с микоплазмами, бруцеллами, хламидиями и вирусом ИРТ-ПВ, а в разведениях 1:10 – 1:320 была строго специфична к анаплазмам

При этом высокий уровень антител регистрировали на 22-30 сутки после начала гипериммунизации, который колебался в пределах от 160 до 320

4.2. Изучение роли основных переносчиков анаплазмоза крупного рогатого скота – клещей в передаче возбудителя инфекции с помощью РНИФ

В экспериментальных условиях нами установлено, что реакция непрямой иммунофлюоресценции, является эффективным диагностическим тестом для обнаружения возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота в материале из клещей, выявляя при этом до $55 \pm 15,0$ – $60 \pm 10,0\%$ зараженных особей Выделения возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота в гемолимфе половозрелых клещей (гемолимфотест), свидетельствует о персистенции возбудителя в органах и тканях клеща

В связи с этим на втором этапе работы для подтверждения экспериментальных данных, метод по обнаружению анаплазм в клещах, был испытан в производственных условиях

Целью исследований являлось изучение роли клещей в передаче возбудителя анаплазмоза в различных нозоареалах РФ В зоне Южного Урала распространены клещи рода Ixodes Иксодовые клещи (Ixodidae), как и насекомые, служат средой обитания для многих видов микроорганизмов, принадлежащих к разным таксономическим и экологическим группам (Ю С Балашов, 1995)

В ходе проведенных исследований была выяснена связь между численностью клещей и заболеванием анаплазмозом животных Так, на юге Челябинской области и юго-востоке республики Башкортостан (Белорецкий район), также как и в Омской области, анаплазмоз регистрируется с апреля по октябрь, когда иксодовые клещи проявляют максимальную активность

Наибольшее количество иксодовых клещей наблюдали в лесостепной (Челябинская область), подтаежной (Омская область) и горно-лесной (Белорецкий район Республики Башкортостан) зонах В ходе выполнения данной работы было собрано 200 клещей, в зоне Южного Урала и Западной Сибири Производственные испытания РНИФ проводили на материале от клещей собранном в выше указанных зонах на территории хозяйств, в которых периодически наблюдали заболевание анаплазмозом животных

При этом из 100 исследованных экземпляров клещей в Западно – Сибирском регионе уровень инфицированности составил $40 \pm 10,9$, а в Южно – Уральском – $35 \pm 10,7$ (табл 1)

Таблица 1 Исследование гемолимфы клешей в РНИФ

Название зоны исследования	Количество исследованных экз клешей	Уровень инфицированности, %
Западная Сибирь	100	40±10,9
Южный Урал	100	35±10,7

4.3. Изготовление анаплазмозного эритроцитарного диагностикума

В качестве клеточной основы для приготовления диагностикума были выбраны эритроциты барана, а для стабилизации 20% формалин. При формализации эритроцитов использовали свежую дефибринированную кровь барана – донора, которую разводили 1:1 буферным физ. раствором pH – 7,2 (0,137 М NaCl, 0,001 М двузамещенный фосфорнокислый калий на 1л дистиллированной воды). Фиксацию эритроцитов проводили по методу Фили в модификации А.П. Красикова (1982), которая заключалась в более щадящем способе воздействия формалина на эритроциты и одновременно обеспечивающая хорошую их фиксацию. При данном способе фиксации эритроциты, по данным автора, сохраняют свои сорбционные свойства в течение пяти лет (срок наблюдения).

Для нагрузки формализированных 2,5-3% эритроцитов делали различные разведения инактивированного при t 70°C в течение 30 мин антигена (1:1–1:8) на буферном физ. растворе pH – 6,4, которыми сенсibilизировали эритроциты в соотношении 2:1 (2 объема антигена 1 объем эритроцитов), сенсibilизацию проводили на водяной бане при t 70°C в течение 30 мин, при перемешивании взвеси через каждые 5 минут. За 10 минут до конца сенсibilизации для закрепления антигена на эритроцитах добавляли 1% формалина.

Для определения активности полученного эритроцитарного диагностикума проводили постановку РНГА. Реакцию ставили макрометодом в объеме 0,5мл в полистироловых пластинках положительную анаплазмозную сыворотку разводили 1:10–1:160. В качестве разбавителя применяли фосфатный буфер pH – 6,4.

Наиболее показательным был эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный анаплазмозным антигеном в разведении 1:4, который выявлял антитела в сыворотке кролика в титре 1:80 на ++, аналогичная полученная нами сыворотка в РНИФ реагировала в титре 1:320.

4.4. Изучение в сравнительном аспекте диагностической ценности РНИФ, РНГА и световой микроскопии

Для изучения сравнительной оценки РНИФ, РНГА и световой микроскопии были отобраны пробы крови из 10 хозяйств неблагополучных по анаплазмозу, принадлежащих Челябинской области, Республике Башкортостан и Омской области. При этом от одних и тех же животных проводили исследования крови в световой микроскопии и сыворотки крови в РНГА и РНИФ. Во всех случаях положительные результаты световой микроскопии подтверждались в РНИФ и РНГА. Однако в РНИФ дополнительно к световой микроскопии в пяти хозяйствах выявлено 5 – 10%

реагирующих животных, а в РНГА 10%. При сравнении РНГА и РНИФ между собой более чувствительным методом оказалась РНИФ, с помощью которой в одном хозяйстве дополнительно к РНГА выявлено 5% реагирующих на анаплазмоз животных.

При сравнительной оценке РНИФ (90,5%), РНГА(90%) и световой микроскопии (86%) преимущество имеют первые две реакции (табл 2). Кроме того, они являются более технологичными по отношению к световой микроскопии и могут применяться одновременно с проведением массовых серологических исследований крупного рогатого скота на бруцеллез, лейкоз и другие инфекционные болезни.

Таблица 2 Сравнительная оценка чувствительности методов диагностики анаплазмоза

№ п/п	Хозяйства	Кол-во ж-х	Реагировало, в%		
			свет микр	РНИФ	РНГА
1	ЗАО «Наравчатское»	30	100	100	100
2	ЗАО «Первомайское»	30	100	100	100
3	СПК «Большевик»	20	100	100	100
4	ООО «Верхнебельский»	20	80	90	90
5	АО «Колос»	40	100	100	100
6	АОЗТ «Новороссийское»	30	60	65	60
7	ЗАО «Курнасово»	30	80	90	90
8	ЗАО «Зингейское»	40	100	100	100
9	СПК «Семеновка»	30	50	60	60
10	СПК «Кольтюгино»	30	90	100	100
	Итого	300	86	90,5	90

4.5. Испытание в производственных условиях различных схем профилактики и лечения при анаплазмозе крупного рогатого скота

В Омской области опыты по сравнительному изучению терапевтической эффективности комплексных препаратов тетрациклина – ПВП, тетраэритросульфата – ПЭГ, левозэритроциклина – ПЭГ, тилоциклина – ПЭГ, левотетрасульфата – ПЭГ, лекарственных смесей спирта с риванолом, азидина с нилвермом и силовета проводили в 3 базовых хозяйствах на 116 головах крупного рогатого скота ЗАО «Колос», СПК «Большевик» и АОЗТ «Новороссийское» на спонтанно инфицированном крупном рогатом скоте.

После проведения опытов по результатам клинических, гематологических исследований было установлено, что бактериостатическое действие на анаплазмы оказывают тетрациклин – ПВП, тетраэритросульфат – ПЭГ, силовет, тилоциклин – ПЭГ, левозэритроциклин – ПЭГ, а схемы лечения с применением спирта с риванолом, азидина с нилвермом и левотетрасульфата – ПЭГ оказывают бактерицидное действие. При этом две последние являются более экономичными и технологичными.

Наиболее эффективные схемы лечения при анаплазмозе животных азидин с нилвермом, препарат левотетрасульфат – ПЭГ были применены для лечения в производственных условиях на 300 головах крупного рогатого скота больного анаплазмо-

зом из двух хозяйств Челябинской области и одного Республики Башкортостан в возрасте от 1,5 до 3,5 лет, лечение проводили с осуществлением контроля эффективности действия препаратов не только по отсутствию анаплазм, но и других ассоциантов участвующих в инфекционном процессе. Для производственного испытания были подобраны хозяйства ООО «Верхнебельский», ЗАО «Наравчатское», СПК «Выбор», в которых регистрировали анаплазмоз в ассоциации с возбудителями других инфекционных болезней (хламидиоз, лептоспироз, ИРТ-ПВ) в различных сочетаниях, при этом в последнем анаплазмоз протекал в виде моноинфекции.

После применения азидина с нилвермом анаплазмы в крови и сыворотке не регистрировались, при лечении животных левотетрасульфидом – ПЭГ анаплазмы в крови отсутствовали, также не были выявлены возбудители хламидиоза, лептоспироза, ИРТ-ПВ в секрете молочной железы и цервикагоинальной слизи. В то время как у нелеченных животных наблюдали клинические признаки анаплазмоза, в крови были обнаружены анаплазмы (10-15%), РНГА и РНИФ с сывороткой крови дали положительный результат, РНИФ с секретом молочной железы и цервикагоинальной слизью выявила наличие возбудителей хламидиоза, лептоспироза, ИРТ-ПВ.

Экономический ущерб от анаплазмоза крупного рогатого скота в ЗАО «Колос» составил – 70725 руб., в ЗАО «Наравчатское» – 56625 руб. (за 2004–2005 гг. соответственно). Применяя 5 и 6 схемы лечения в хозяйствах при анаплазмозе крупного рогатого скота, сумма предотвращенного экономического ущерба составила – 591378,3 руб. и 444099 руб., экономический эффект от проведенных лечебно-профилактических мероприятий равен 571854,9 руб. и 421074 руб., а экономический эффект на один рубль затрат составил – 29,29 руб. и 18,3 руб. (в ценах 2004 – 2005 гг. соответственно).

Таблица 3 Схемы и результаты лечения анаплазмоза крупного рогатого скота в производственных условиях

№ схемы	Количество животных	Схемы лечения коров и нетелей 1,5-3,5 лет	Интенсивность паразитемии анаплазмами в 100 п з, в % до/после	Результаты исследований (-отр, + полож) на анаплазмоз до/после			Результаты исследований в РНИФ (-отр, + полож) до/после		
				свет микр	РНИФ	РНГА	Хламидиоз	лептоспироз	ИРТ-ПВ
ООО «Верхнебельский»									
6	90	Левотетрасульфин-ПЭГ 1мл/10кг внутримышечно двукратно с интервалом 4 дня	6±2/ 0±0	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	10	Контрольная группа нелеченных ж-х	6±2/ 12,4±0,9	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
СПК «Выбор»									
5	90	Азидин+нилверм 15 мл/гол подкожно трехкратно с интервалом 10 дней	6,8±1,5/ 0±0	+/-	+/-	+/-	-	-	-
	10	Контрольная группа нелеченных ж-х	6,8±1,5/ 12,4±0,9	+/+	+/+	+/+	-	-	-
ЗАО «Наравчатское»									
6	90	Левотетрасульфин-ПЭГ 1мл/10кг внутримышечно двукратно с интервалом 4 дня	10,2±1,5/ 0±0	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	10	Контрольная группа нелеченных ж-х	6±2/ 12,4±0,9	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

ВЫВОДЫ

- 1 Распространенность анаплазмоза в хозяйствах Омской области составляет 90%, Южного Урала – 100% от числа обследованных, при инфицированности животных от 20 до 90% и от 20 до 45% соответственно. При этом анаплазмоз протекает в виде моноинфекции (10 – 60% и 10 – 20%), и в ассоциации (10 – 50% и 10 – 30%), соответственно. Число ассоциантов у взрослого скота достигает четырех, у молодняка – до пяти, в различных сочетаниях с хламидиями, лептоспирами, вирусом ИРТ, вирусом ПГ-3, листериями, сальмонеллами.
- 2 Культуральный метод выделения анаплазм с использованием клеток Vero способствует накоплению биомассы с последующим изготовлением антигенов для РНИФ и РНГА.
- 3 Получены анаплазмозные сыворотка и антиген, которые активны и специфичны в РНИФ, с помощью анаплазмозного антигена дополнительно к световой микроскопии выявлено анаплазмонительство у 5 – 10% животных.
- 4 Экспериментально показана роль клещей в передаче анаплазмоза на различных стадиях развития (имаго, личинка, нимфа). При этом заболевание анаплазмозом напрямую связано с периодом активности клещей-переносчиков в исследуемых регионах (с апреля по октябрь). РНИФ с анаплазмозной сывороткой является эффективным диагностическим тестом для обнаружения возбудителя в материале из клещей (гемолимфотест). В Западно – Сибирском регионе уровень инфицированности исследованных клещей составил $40 \pm 10,9$, а в Южно – Уральском – $35 \pm 10,7$.
- 5 Сконструированный эритроцитарный диагностикум для РНГА в производственных условиях дополнительно к световой микроскопии выявляет 10% реагирующих на анаплазмоз животных.
- 6 Сравнительная оценка РНИФ, РНГА и световой микроскопии дает преимущество первым двум тестам, из которых наиболее чувствительной является РНИФ – 90,5%, несколько ниже – 90% РНГА, световая микроскопия – 86%. РНИФ и РНГА являются более технологичными по отношению к световой микроскопии и могут применяться одновременно с проведением массовых серологических исследований крупного рогатого скота на бруцеллез, лейкоз и другие инфекционные болезни.
- 7 Экономичными и технологичными являются схемы лечения животных с использованием левотетрасульфина – ПЭГ и азидина с нилвермом. Применение, которых в производственных условиях в трех хозяйствах Южного Урала дало хороший терапевтический эффект первого препарата как при моноинфекции, так и при ассоциированном анаплазмозе, а лекарственной смеси азидина с нилвермом только при анаплазмозе. При этом экономический эффект от внедрения схем лечения в базовых хозяйствах Омской области и Южного Урала на один рубль затрат составил – 29,29 руб и 18,3 руб соответственно (в ценах 2004 – 2005гг).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического применения разработаны методические рекомендации «Схемы лечения и профилактики при анаплазмозе крупного рогатого скота», рассмотренные и одобренные на заседании ученого совета ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ от 25 05 2005 г, протокол №8 и на заседании Центра научного обеспечения АПК Омской области при Министерстве сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 26 05 2005 г, протокол №4 и «Усовершенствование методов диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота», рассмотренные и одобренные на заседании ученого совета ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ от 28 06 2006 г, протокол № 7 и на заседании Центра научного обеспечения АПК Омской области при министерстве сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 12 09 2006 г, протокол №5

Материалы диссертации могут быть использованы

- в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно – практических занятий по микробиологии, эпизоотологии,
- в научно-исследовательских институтах и учреждениях ветеринарной медицины при решении вопросов диагностики, профилактики и лечения анаплазмоза крупного рогатого скота

Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 1 Анаплазмоз крупного рогатого скота и ассоциативные формы его проявления / А П Красиков, К К Бейсембаев, Ю М Гичев, Н П Бронникова // Проблемы ветеринарного образования и научных исследований в агропромышленном комплексе материалы уч - мет и научн - производ конференции, посвященной 10-летию ОмГАУ Сб научн тр – Омск Изд-во ИВМ ОмГАУ, 2004 – С 177-182
- 2 Изыскание средств терапии и профилактики при анаплазмозе крупного рогатого скота / К К Бейсембаев, А П Красиков, Н П Бронникова, С В Савицкий // Актуальные проблемы ветеринарной медицины материалы IV межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного ветеринарного врача РФ Ильи Владимировича Окунцова Сб науч тр СО РАСХН ВНИИБТЖ – Омск, 2005 – С 42-46
- 3 Усовершенствование методов диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота/А П Красиков, Н В Рудаков, Н П Бронникова, К К Бейсембаев// Ветеринарная патология – 2007 – №1(20) – С 122-124

На правах рукописи

Козлова
Наталья Петровна

**Совершенствование методов диагностики, профилактики и
лечения при ассоциированном анаплазмозе крупного
рогатого скота.**

16 00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

ОМСК – 2007

Сдано в набор 20 02 07 Подписано в печать 19 02 07
Формат 60×84/16 Гарнитура Times New Roman
Усл печ л 1,25 Печать – оперативная Тираж 100 экз
Лицензия ЛТ №020074

Отпечатано с оригинал – макета В типографии ООО «Вариант-Сибирь»
644122, г Омск, ул Яковлева, 5 Тел /факс 25-03-54