

На правах рукописи



**БЕЙСЕМБАЕВ
КАНАТЖАН КАИРГЕЛЬДИНОВИЧ**

**ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АНАПЛАЗМОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
МЕТОДОВ ЕГО ДИАГНОСТИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ
И ЛЕЧЕНИЯ**

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

ОМСК – 2005

Работа выполнена в институте ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет», ФГУ Омском 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
Бажин Михаил Аристоклевиич

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

Защита состоится 28 октября 2005 г. в 14³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.050.03 при ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет» в институте ветеринарной медицины ОмГАУ по адресу: 644122, г. Омск-122, ул. Октябрьская, 92, тел. 24-15-35; факс (3812) 23-04-67.

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

Автореферат разослан 28 сентября 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доцент



Н.П. Жабин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Анаплазмоз регистрируется во многих странах мира, в частности странах Балтии, Средней Азии, Латинской Америки, а также во многих регионах России. На территории Западной Сибири анаплазмоз крупного рогатого скота ранее официально не регистрировался. По данным сотрудников ИВМ ОмГАУ (В.А. Стрельчик и др., 2000), за последние 15 лет в ряде хозяйств Омской, Новосибирской и Тюменской областях отмечались периодические вспышки заболевания крупного рогатого скота с клиническими признаками анаплазмоза, в мазках крови от больных животных обнаруживали поражение эритроцитов анаплазмами.

Длительное время считалось, что эрлихии вызывают болезни только у животных и не представляют опасности для человека. В настоящее время доказано развитие у человека заболеваний, вызываемых возбудителями: эрлихиоза Сеннецу (*Neorickettsia sennetsu*), моноцитарного эрлихиоза (*Ehrlichia chaffeensis*) и гранулоцитарного эрлихиоза (*Anaplasma phagocytophila*).

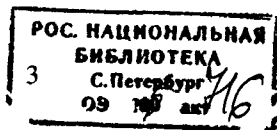
В последнее время благодаря широкому внедрению методов генетического анализа пересмотрена филогенетическая позиция представителей рода *Ehrlichia*. Вследствие этого *E. phagocytophila* этиологический агент гранулоцитарного эрлихиоза человека (ГЭЧ) была реклассифицирована и помещена в соседний род *Anaplasma* семейства *Anaplasmataceae* (J.S. Dumler et al., 2001), в связи с генетическим родством с возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота *Anaplasma marginale*.

По данным отечественной и зарубежной литературы, возбудители анаплазмозов животных имеют близкое генетическое родство с возбудителями анаплазмозов и эрлихиозов человека и относятся к одному и тому же семейству *Anaplasmatacea*. Возбудители анаплазмозов у людей и животных генетически не идентифицированы в России, не доказано генетическое родство и отличие между ними, однако считается что один из них - *A. phagocytophila* является возбудителем гранулоцитарного анаплазмоза как у животных, так и у человека.

Исходя из этого, можно предположить, что одними и теми же или очень близкими анаплазмами болеют люди и животные. А значит, больные люди и животные могут представлять эпидемическую и эпизоотическую опасность.

В связи с этим весьма актуальным является: выяснить эпизоотическую ситуацию по анаплазмозу (гранулоцитарному эрлихиозу) крупного рогатого скота в Омской области, определить таксономическое положение возбудителя, эпизоотологическую и эпидемиологическую опасность данной болезни и роль членистоногих переносчиков инфекции, для разработки профилактики и эффективных мер борьбы с ней.

Цель и задачи исследований: выявить эпизоотологические особенности анаплазмоза крупного рогатого скота, свойства возбудителя, основных переносчиков. усовершенствовать диагностику, а также определить эффек-



тивность некоторых химиотерапевтических средств для борьбы с данной инфекцией в условиях хозяйств Омской области.

Для реализации поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Выяснить эпизоотическую ситуацию по анаплазмозу крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области и установить возможность его проявления в ассоциативной форме.
2. Изучить основные биологические свойства возбудителя.
3. Определить роль клещей в передаче возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота.
4. Установить клинико-морфологические изменения у животных спонтанно и экспериментально инфицированных *A.sp.Omsk*.
5. Получить антиген и анаплазмозную диагностическую сыворотку, определить в РНИФ их специфичность, активность и возможность применения для диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота.
6. Разработать схемы профилактики и лечения при анаплазмозе крупного рогатого скота и дать им экономическое обоснование.

Научная новизна работы. Впервые: установлено широкое распространение анаплазмоза крупного рогатого скота и ассоциативные формы его проявления в хозяйствах Омской области. На территории Западной Сибири от больных животных выделен первый в России штамм анаплазм *A.sp.Omsk*, который по нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16s р-РНК отличается от *A. centrale* и *A. marginale*. Изготовлены и лиофилизированы опытные образцы антигена из шт. *A.sp Omsk* и гомологичная кроличья анаплазмозная сыворотка для РНИФ. Разработан культуральный метод диагностики анаплазмоза с использованием клеток Vero. Для изучения возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота применён метод использования клещевой экспериментальной модели, который позволяет установить сроки персистирования анаплазм в клещах и выявлять трансовариальный и трансфазовый пути передачи возбудителя. Разработаны, экспериментально и экономически обоснованы эффективные схемы лечения и профилактики анаплазмоза крупного рогатого скота.

Теоретическая и практическая значимость работы. Материалы диссертации дополняют концепцию о паразито-хозяйственных отношениях, внося вклад в развитие науки паразитологии об ассоциативных инфекционных процессах. Метод экспериментального моделирования естественного цикла метаморфоза иксодовых клещей позволяет изучать взаимоотношения возбудителей и переносчиков, наблюдать инфекционный процесс и локализацию возбудителя в органах и тканях, изучать гетерогенные популяции возбудителей на уровне вертикальной передачи. Разработанные способы получения анаплазмозных антигенов и сывороток для РНИФ позволят внедрить данный экспресс-метод диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота в условиях промышленного животноводства Омской области и в других регионах РФ. Применение в общем комплексе: диагностики, рациональных схем профилактики и лечения позволит контролировать

эпизоотическую ситуацию и проводить эффективные мероприятия по борьбе с анаплазмозом крупного рогатого скота.

Апробация работы. Материалы исследований доложены и обсуждены на: ежегодных научных конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ (Омск, 2003–2005); III и IV межрегиональных научно-практических конференциях: «Современные проблемы ветеринарной медицины» и «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» (Омск, 2004–2005, СО РАСХН ВНИИБТЖ).

Внедрение результатов исследований. Результаты исследований вошли в методические рекомендации «Экспериментальное моделирование естественного цикла метаморфоза иксодовых клещей» и «Схемы лечения и профилактики при анаплазмозе крупного рогатого скота», которые рассмотрены и одобрены на заседании ученого совета ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ от 25.05.2005, протокол № 8 и на заседании Центра научного обеспечения АПК при Министерстве сельского хозяйства и продовольствия Омской области от 26.05.2005, протокол № 4. Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедр эпизоотологии и инфекционных болезней и микробиологии, вирусологии и иммунологии Института ветеринарной медицины ФГОУ ВПО ОмГАУ, Института повышения квалификации руководителей и специалистов АПК ОмГАУ, а также в курсе лекций Тюменского института переподготовки кадров агробизнеса. Депонирован штамм анаплазм «Омск/2004» во Всероссийском музее риккетсиозных культур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН под инвентарным №138 от 19.09.2005.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эпизоотологические особенности анаплазмоза крупного рогатого скота в хозяйствах Омской области.
2. Основные биологические свойства возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота.
3. Экспериментальное изучение роли иксодовых клещей в передаче возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота.
4. Клинико-морфологические изменения у животных спонтанно и экспериментально инфицированных *A.sp. Omsk*.
5. Способы получения антигена и сыворотки и изучение их специфичности и активности в РНИФ для диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота.
6. Схемы профилактики и лечения при анаплазмозе крупного рогатого скота.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 132 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений, списка литературы, приложения. Работа иллюстрирована 9 таблицами, 25 рисунками. Список литературы включает 177 источников, из них 71 зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Тема диссертационной работы самостоятельным разделом входит в комплексную государственную программу «Профилактика, диагностика и меры борьбы с ассоциативными инфекционными и инвазионными болезнями животных и птиц» (номер государственной регистрации 01.2.001100602).

Работа проводилась в период с 2002 по 2005 годы в лаборатории микстинфекций кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, лаборатории электронной микроскопии кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ, лаборатории зоонозных инфекций ФГУ Омского НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, а также в хозяйствах Омской области.

Объектом исследований являлся клинически здоровый и с выраженными клиническими признаками анаплазмоза крупный рогатый скот различных возрастов.

Использовали эпизоотологические, клинические, патологоанатомические и лабораторные методы диагностики инфекционных болезней.

Прижизненно от животных исследовали пробы крови, молока, молозива, цервик-вагинальной слизи, бронхиальной жидкости, полученную методом бронхоальвеолярного лаважа, мазки крови. Кровь для серологических исследований брали из яремной, а для гематологических – из краевой ушной вен. Посмертно от животных исследовали пробы патологического материала от вынужденно убитых и павших животных: печень, почки, селезенка, легкие, сердечная мышца, лимфоузлы. Всего исследовано 170 голов крупного рогатого скота в возрасте 1,5-3,5 лет и 55 телят 4-6 мес. возраста из разных хозяйств Омской области.

В опытах использовали белых мышей (6 и 30-45 дн. возраста), кроликов (5-6 мес. возраста), а также лабораторные линии клещей *D. reticulatus* (во втором поколении) и *D. silvarum* (в четвёртом поколении).

В качестве материала для заражения иксодовых клещей применяли 10%-ную суспензию из селезёнки больной анаплазмозом коровы в острой форме. Голодных половозрелых клещей (самец и самка) заражали интрацеломально с помощью микроинъектора путём прокалывания мембраны у основания четвёртой коксы клеща, в дозе 0,2 – 0,3 мкл. Всего заражено 140 голодных половозрелых особей по 70 экземпляров на каждый вид клещей.

Для изучения восприимчивости клещей *D. reticulatus* и *D. silvarum* к возбудителю анаплазмоза крупного рогатого скота (*A. sp. Omsk*), их исследовали через 14 дней, а для определения сохраняемости в теле беспозвоночных, при итрацеломальном заражении – через 60 дней. Исследования проводили путём тотального приготовления мазков-отпечатков от 60 особей. Для этого членистоногих гомогенизировали в пластиковых пробирках для микропроб и использовали 1% суспензию клещей в 0,2 мл. 0,01 М ФСБР,

pH 7,2–7,4. До исследования суспензии её хранили в течение суток при +4°C, при более длительных сроках, при -20°C.

Изучение морфологических и тинкториальных свойств выделенных микроорганизмов осуществляли при окраске мазков-препаратов по Романовскому-Гимза. Интенсивность паразитемии оценивали определением количества анаплазм в 100 полях зрения микроскопа.

Заражение культур клеток Vero проводили приготовленной суспензией из селезёнки больной анаплазмозом коровы. Культуру клеток Vero выращивали в стеклянных флаконах в концентрации 150 тыс. на 1 мл. В качестве питательной среды использовали Игла MEM с двойным набором аминокислот, с добавлением 10% эмбриональной сыворотки и антибиотиков (пенициллин в дозе 1млн. ЕД и стрептомицин в дозе 500тыс. ЕД на 1 мл.). На следующие сутки после образования монослоя проводили замену среды роста на среду поддержки (Игла MEM с добавлением 1% эмбриональной сыворотки). В подготовленные флаконы вносили 0,5 мл суспензии из селезёнки. Затем флаконы с заражёнными клетками Vero центрифугировали при 800 об/мин при температуре 22°C в течение 1 часа, после центрифугирования среду поддержки меняли на новую. Флаконы помещали при анаэробных условиях и 36°C на 8 суток. После завершения инкубации все флаконы промораживали при -20°C в течение 30 мин, а затем оттаивали при +18°C. После оттаивания, клеточную взвесь центрифугировали при 3000g в течение 15 мин и для дальнейшей работы отбирали супернатант. Для накопления антигенной биомассы, анаплазмы восьмикратно пассировали. Культуру клеток с анаплазмами после каждого пассажа просматривали при помощи световой и люминесцентной микроскопии.

Патогенные свойства выделенных культур изучали при постановке биологической пробы на белых мышах, которым внутрибрюшинно вводили по 1 мл на голову культуры *A. sp. Omsk* выращенной на культуре клеток Vero. Наблюдение проводили в течение 30 суток. По мере гибели лабораторных животных готовили мазки-отпечатки, которые окрашивали по Романовскому-Гимза. По окончании опыта (30 дн.) всех животных также подвергали исследованию.

Для изучения субмикроскопического строения анаплазмозных клеток, взвеси исследуемых культур фиксировали в смеси глутарового и параформальдегидного растворов. После промывки фосфатным буфером и дополнительной фиксации в 1% растворе четырёх окиси осмия обезживляли в спиртах восходящей концентрации и ацетоне. Приготовленный материал заключали в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме УМТП-4. После контрастирования срезы исследовали под электронным микроскопом ЭМ-125.

Применяли стандартные и дополнительные, разработанные в лаборатории микст инфекций кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней мето-

ды серологической диагностики - прямой и непрямой иммунофлуоресценции (РПИФ и РНИФ) для прижизненного выявления антигенов и антител (А.П. Красиков, Н.В. Лобанова, 2004).

Видоспецифические сыворотки к полевому штамму анаплазм получали путём гипериммунизации кроликов по схеме D. Schimmel в модификации Красикова А.П. и Новиковой Н.Н. (2002). Для постановки РНИФ использовали ослиный антикроличий глобулин, меченный ФИТЦ, изготовленный НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Двухраундовую ПЦР проводили с применением родоспецифических праймеров с последующим секвенированием положительных образцов ДНК.

Расчёт экономической эффективности ветеринарных мероприятий при анаплазмозе крупного рогатого скота проводили по «Методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий», утверждённой МСХ и продовольствия РФ, Департаментом Ветеринарии, Московской государственной академией ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина (1997).

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

Часть исследований была проведена совместно с сотрудниками Новосибирского института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН им. М. Лаврентьева (Рар В.А., Морозова О.В.), ФГУ Омского НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора (И.Е. Самойленко, В.В. Якименко, Г.П. Юртова), а также с сотрудниками ИВМ ФГОУ ВПО ОмГАУ: лабораторий электронной микроскопии (Т.А. Беспалова), резистентности молодняка (В.И. Зайнчковский, В.С. Сороковой), кафедр ветеринарной хирургии (В.И. Самчук), внутренних незаразных болезней, фармакологии и токсикологии (С.В. Савицкий), аспирантами (Н.П. Бронникова) и ОмГМА (Л.В. Кумпан), которым выражаем глубокую благодарность.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эпизоотологические особенности анаплазмоза крупного рогатого скота в Омской области

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 150 головах крупного рогатого скота, спонтанно инфицированных возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота.

Для этого, выборочно исследовано 120 коров 3–7 лет, 30 телят 4–6 мес. возраста, принадлежащих хозяйствам Омской области (по 10 голов из каждого хозяйства). При этом в СПК “Русспол” – анаплазмы не обнаружены. В

СПК “Такмык” анаплазмы обнаружены – у 20%, в СПК “Красный Яр» - у 50%, в ЗАО “Курнасово” – у 90%, в СПК “Большевик” - 70% (коров и телят), в ЗАО “Колос” – у 30% коров и у 60% телят. В АОЗТ “Новороссийское” – у 60% коров и 30% телят. В СПК “Дружба” – у 30%, в СПК “Семёновка” – у 40%. В СПК “Кольтюгино” – у 50%, в СПК “Териз” – у 20%, в ОПХ “Боевое” – у 60% животных из числа исследованных.

При эпизоотологическом обследовании хозяйств Омской области регистрировалось острое и подострое течение анаплазмоза крупного рогатого скота, главным образом в июне – сентябре, когда на животных паразитирует большое количество иксодовых клещей.

При проведении комплексных исследований установлено, что в ЗАО “Курнасово” из 90% реагирующих на анаплазмоз коров 30% приходилось на ассоциативную форму его проявления с лептоспирозом и сальмонеллезом. В СПК “Красный Яр” моноинфекция зарегистрирована у 50% животных, в СПК “Такмык” - у 10% и у 10% - в ассоциативной форме с хламидиозом, лептоспирозом, сальмонеллезом. 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 и ПГ-3. В ЗАО “Колос” у 20% взрослого скота анаплазмоз, регистрировали как моноинфекцию, а у 10% в ассоциации с сальмонеллёзом, у 50% телят в ассоциативной форме с хламидиозом, лептоспирозом, диплококкозом, сальмонеллёзом и ПГ -3 и у 10% телят, как моноинфекцию. В СПК “Новороссийский” из числа исследованных животных у 30% взрослого скота инфекционный процесс проявлялся в виде моно – и ассоциативной инфекции с хламидиозом, лептоспирозом, сальмонеллёзом, листериозом, а у молодняка в той же ассоциации за исключением замены возбудителей сальмонеллеза на ИРТ. В ОПХ “Боевое” из числа исследованных животных у 30% коров инфекционный процесс проявлялся в виде моно - и ассоциативной инфекции с сальмонеллезом, ИРТ.

При этом у взрослого скота число сочленов ассоциации достигало до трёх, а у молодняка – до пяти. Всё это указывает на то, что анаплазмоз крупного рогатого скота может протекать как моноинфекция и принимать ассоциативную форму течения, вызывая клиническое проявление болезни в более тяжёлой форме.

Основные биологические свойства возбудителя анаплазмоза, выделенного из биологического материала от крупного рогатого скота

Изучение тинкториальных и морфологических свойств анаплазм. В окрашенных по Романовскому – Гимза мазках из периферической крови от больного крупного рогатого скота анаплазмы обнаруживали в виде одного, двух, реже трёх в одном эритроците розовато-фиолетовых точкоподобных включений округлой, овальной формы. Расположение в эритроците - преимущественно периферическое, иногда эксцентричное.

Изучение культуральных и субмикроскопических свойств анаплазм.

В качестве биологической модели для культивирования и изучения анаплазм, нами была использована культура клеток Vero. Заражение и культивирование анаплазм проводили согласно описанной методике. На вторые – третьи сутки после выращивания отмечали дегенеративные изменения клеток. Показано, что с каждым пассажем происходит накопление количества анаплазм в культуре клеток Vero с 30 м.т. в 100 п./з. в первые сутки, до 90 м.т. на 7 сутки, с незначительным уменьшением на 8 сутки.

Анализ результатов электронно-микроскопических исследований показал, что структура клеток Vero нарушена, а цитоплазма содержит большое количество анаплазмозных «морул» различной величины и формы. Цитоплазматическая мембрана клеток истончена и местами разорвана. A.sp.Omsk поражает не только цитоплазму клеток, но и проникает в ядро клетки, разрушая ядерную оболочку.

Установлено, что анаплазмы окружены плотной непроницаемой морулой (двухслойная цитоплазматическая мембрана), внутри которой находятся «инициальные тельца», каждое из которых окружено тонкой наружной и внутренней мембранами. Такие скопления паразитов назвали колониями (В.М. Петешев, 1969) или микроколониями (Л.П. Дьяконов, А.А. Авакян, 1970). Мелкие микроколонии состояли из одной - двух особей, а более крупные из нескольких. При наличии двух паразитов колонии имели вытянутую форму, трёх – треугольную, четырёх – четырёхугольную, свыше четырёх – округлую.

Анаплазмы размножаются простым делением и почкованием, формируя колонии из 2 – 8 особей (М.Ш. Акбаев, 1998). Анализ результатов электронно-микроскопических исследований показал, что анаплазмы формируют поперечные трубчатые структуры и перетяжки, что указывает на деление анаплазмозных клеток.

Ультраструктура анаплазмозных клеток представлена протопластическими пучками в периплазматическом пространстве, скоплениями рибосом (тёмные свободные пространства), тонкими нитями ДНК (светлое свободное пространство), трубчатыми и везикулярными образованиями.

Генетические особенности возбудителя анаплазмоза. При проведении двухкрандовой ПЦР в присутствии родоспецифичных праймеров среди образцов ДНК из селезнёнок клинически больных анаплазмозом коров (СПК «Такмык» Большереченский район) и телят (ЗАО «Колос» Павлоградского района) анаплазмы были обнаружены во всех образцах, которые по нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16s рРНК отличались от ДНК *Anaplasma marginale* и *Anaplasma centrale*.

Экспериментальное изучение роли клешей в передаче возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота

Через 14 суток после заражения, число инфицированных особей возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота (A. sp. Omsk), составило -

53,3±9,1% у клещей *D. reticulatus* и 43,3±9,0% у клещей *D. silvarum*. Через 60 суток, она составила – 63,3±8,8% у клещей *D. reticulatus* и 56,6±9,0% у клещей *D. silvarum*.

Для дальнейшей работы, нами было отобрано три экспериментально заражённые линии клещей (две - *D. reticulatus* и одну - *D. silvarum*), самки которых дали хорошую яйцекладку, с наилучшим выходом личинок.

Образцы личинок и нимф от этих экспериментальных линий исследовали как в голодном состоянии, так и после напитывания. При этом в голодном состоянии количество исследованных экземпляров у клещей *D. reticulatus* составляло 100 личинок и 50 нимф, после напитывания – не менее 50 личинок и 50 нимф. У клещей *D. silvarum* количество исследованных экземпляров в голодном состоянии составляло 100 личинок и 50 нимф, после напитывания – 50 личинок и 50 нимф (табл. 1).

Таблица 1. Эффективность трансвариальной и трансфазовой передачи анаплазм (*A. sp. Omsk*) в экспериментальных линиях клещей

Экспериментальная линия клещей	Кол-во жизнеспособных личинок в кладке	Личинки				Нимфы			
		до кровососания		после		до кровососания		после	
		кол-во иссл. экз.	уров. ТОП в %	кол-во иссл. экз.	уров. ТОП в %	кол-во иссл. экз.	уров. ТОП в %	кол-во иссл. экз.	уров. ТОП в %
<i>D. reticulatus</i>	1897	100	24,0 ±4,3	70	37,1 ±5,8	50	30,0 ±6,5	50	58,0 ±7,0
<i>D. reticulatus</i>	1458	100	18,0 ±3,8	50	36,0 ±6,8	50	42,0 ±7,0	50	50,0 ±7,1
<i>D. silvarum</i>	367	100	20,0 ±4,0	50	62,0 ±6,9	50	36,0 ±6,8	50	40,0 ±7,0

Примечание: ТОП–трансвариальная передача, ТФП–трансфазовая передача.

У клещей *D. reticulatus* выход личинок составил от 1458 до 1897 экземпляров, а у клещей *D. silvarum* – 367. При этом инфицированность анаплазмами после кровососания личинками клещей *D. reticulatus*, была – 36,6±6,3%, а уровень инфицированности до кровососания сосунков составлял 21,0±4,1%. Уровень инфицированности анаплазмами в нимфальной стадии развития клещей *D. reticulatus*, после кровососания сосунков голодными формами, был – 54,0±7,1%, а до кровососания – 36,0±6,8. Инфицированность анаплазмами в личиночной стадии развития клещей *D. silvarum*, в напитавшемся состоянии была – 62,0±6,9%, а в голодных формах развития личинок – 20,0±0,4%. Уровень инфицированности анаплазмами нимф клещей *D. silvarum* после кровососания сосунков составил – 40,0±7,0%, а в голодном состоянии – 36,0±6,8%.

В мазках-отпечатках из селезёнок мышей-сосунков, на которых кормились личинки и нимфы клещей *D. reticulatus* и *D. silvarum*, из 15 исследо-

ванных - 14 положительных проб, в которых были обнаружены анаплазмозные включения, причём как в эритроцитах, так и в лейкоцитах.

Клинико-морфологические изменения у животных спонтанно и экспериментально инфицированных *A.sp.Omsk*

У больных коров и телят, наблюдали следующие клинические признаки: угнетение, повышение температуры тела до $40,5^{\circ}\text{C}$, расстройство сердечной деятельности, анемичность (иногда со слабо выраженной желтушностью) слизистых оболочек, исхудание животных. При тяжёлом течении болезни наступало общая слабость, отказ от корма, атония желудочно-кишечного тракта, усиленная жажда, учащённое дыхание — до 65 движений в минуту, отёки век, подгрудка, слизистое истечение из ноздрей.

При морфологическом исследовании установлено наличие анаплазм в эритроцитах у 60% телят и у 90% коров, глубокое нарушение костномозгового кровообращения, которое проявляется анизо-пойкилоцитозом, включениями типа ретикулярной сетчатости и анемией. Также отмечены реологические нарушения крови, проявляющиеся образованием "монетных" столбиков в результате потери заряда эритроцитами. Дистрофические и литические процессы в лимфоцитах и нейтрофилах, характеризовались ворсинчатостью ядер и набуханием внутриклеточных структур. В каждом мазке от больных животных регистрировали клетки (лимфоциты и моноциты) с признаками недостаточной зрелости. Изменения лейкоцитарного профиля проявлялись нейтрофилией и эозинофилией у больных телят и коров.

В опыт по заражению возбудителем анаплазмоза были взяты два кролика весом 2-2,5 кг. Обоих кроликов спленэктомировали и через двое суток после операции заразили культурой *A.sp.Omsk* выращенной на культуре клеток Vero. Заражение проводили внутривенно по 1 мл на голову.

На основании результатов исследования проб крови установлено, что интенсивность паразитарной реакции уже на 2 сутки после заражения кроликов возрастает до 12 — 18% инфицированных клеток с последующим увеличением до 30 — 40%, на 12 — 27 сутки. При этом инфекционный процесс протекает остро, с проявлением клинических признаков: вялость, угнетение, отсутствие аппетита, повышение температуры тела на $0,4^{\circ}\text{C}$ ($39,9^{\circ}\text{C}$), внутришние наложения, исхудание и гибелью животных на 14 сутки.

При проведении опытов по заражению белых мышей культурой *A.sp.Omsk* были использованы 3 группы клинически здоровых особей в возрасте 1,5 месяцев, весом 12-14 гр. (по 5 голов в каждой группе). Заражение проводили внутрибрюшинно по 1 мл на голову.

Результаты опытов показали, что через 10 суток после заражения в эритроцитах белых мышей были обнаружены единичные анаплазмы. Ещё через 20 суток произошла гибель одной особи, в крови которой находились анаплазмы. Повторное заражение мышей, одной группы кровью, а другой суспензией из селезёнки от первично инфицированных культурой *A. sp. Omsk*

особей, показало, что в первой группе через 10 суток у лабораторных животных наблюдались клинические признаки: взъерошенность, угнетение, воспаление конъюнктивы, анемия, а паразитемия составляла 8 – 10% инфицированных клеток. Во второй группе, через пять суток после проявления клинических признаков болезни произошла гибель четырёх особей. При этом в мазках крови и отпечатках из паренхиматозных органов у них были обнаружены анаплазмы, но паразитемия не превышала 10% инфицированных клеток.

Получение кроличьих гипериммунных анаплазмозных сывороток

Для гипериммунизации использовали 8 суточную культуру полевого штамма *A. sp. Omsk*, полученную на культуре клеток Vero. Для выделения анаплазм из клеток использовали способ попеременного замораживания (при -20°C – 30 мин) и размораживания при комнатной температуре. После оттаивания клеточную взвесь центрифугировали при 3000g в течение 15 мин. Для дальнейшей работы использовали супернатант, который центрифугировали при 6000g в течение часа. Полученный осадок трижды отмывали стерильным физиологическим раствором, центрифугируя в том же режиме, и доводили до концентрации $1,7 \times 10^9$ микробных тел в 1 мл по ОСМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Гипериммунизацию проводили, используя трёх кроликов, породы шиншилла весом 2,5-3 кг.

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

Полученная гипериммунная кроличья сыворотка в разведении 1:5 давала перекрестную реакцию с микоплазмами, бруцеллами, хламидиями и вирусами ИРТ, а в последующих разведениях была строго специфична к анаплазмам и обладала достаточно высокой активностью в РНИФ. При этом наиболее высокий уровень антител регистрировали на 22 – 30 сутки после начала гипериммунизации, который колебался в пределах от 160 до 320. Анаплазмозный антиген также обладал высокой специфичностью.

Экспериментальное изучение возможности применения РНИФ для диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота

Для выявления антител в сыворотки крови больного и подозреваемого в заражении возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота, использовали антиген, полученный на культуре клеток Vero.

Для обнаружения антигена у экспериментально инфицированных *A.sp.Omsk* клешевых линий *D. reticulatus* и *D. silvarum* (имаго – первого поколения, личинки и нимфы – второго поколения), использовали полученную нами кроличью сыворотку. При этом от каждой экспериментальной линии исследовали по 10 экземпляров имагинальных форм и по 20 экземпляров преимагинальных форм клещей. Образцы имаго, личинок и

нимф от этих экспериментальных линий исследовались в голодном состоянии. У имагинальных форм исследовали гемолимфу. Преимагинальные формы исследовали путём тотального приготовления мазков отпечатков. При наличии антигена отмечали интенсивное специфическое свечение.

Исследования экспериментально зараженных клещей *D. reticulatus* и *D. silvarum*, на обнаружение возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота с помощью реакции непрямой иммунофлюоресценции с сывороткой в разведении 1:10, показали, что у $40,0 \pm 15,2\%$ взрослых особей (имаго) клещей *D. reticulatus* первого поколения (F-1) (из числа исследованных) выявляли антиген возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота. В личинках и нимфах второго поколения (F-2) этих же клещей в $42,5 \pm 15,6\%$ и $40,0 \pm 15,2\%$ случаях соответственно. В клещах *D. silvarum* (имаго), антиген возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота, был обнаружен в $40,0 \pm 15,2\%$ случаях (табл. 2).

При исследовании сыворотки крови у 20 голов крупного рогатого скота, в 100% случаев установлено совпадение положительных результатов световой и люминесцентной микроскопии, что указывает на высокую чувствительность РНИФ. При этом придельное значение титра антител, при котором отмечалось яркое интенсивное свечение в исследованных пробах сыворотки крови инфицированных животных, было 1:30, что свидетельствует о достаточной для антигена не бактериальной природы такого уровня активности в РНИФ.

Таблица 2. Определение антигенов возбудителя анаплазмоза в клещевом материале с помощью РНИФ

Экспериментальные линии клещей	Имаго F-1		Личинки F-2		Нимфы F-2	
	голодные формы					
	кол-во иссл. экз.	уровень ин- фици-рован- ности, в %	кол-во иссл. экз.	уровень ин- фици- рован- ности, в %	кол- во иссл. экз.	уровень ин- фици- рован- ности, в %
D.reticulatus	10	30,0±14,5	20	40,0±10,9	20	45,0±11,1
D.reticulatus	10	50,0±15,8	20	45,0±11,1	20	35,0±10,7
D.silvarum	10	40,0±15,2	-	-	-	-

Примечание: F-1. – клещи первого поколения; F-2. – клещи второго поколения: «-» – не исследовали.

Схемы профилактики и лечения при анаплазмозе крупного рогатого скота и их экономическое обоснование

Опыты по сравнительному изучению терапевтической эффективности комплексных препаратов проводили в 3 базовых хозяйствах: ЗАО «Колос», СПК «Большевик» и СПК «Новороссийский» на спонтанно инфицированном крупном рогатом скоте (табл. 3).

В 1-й группе I опыта до применения тетрациклина-ПВП в мазках крови обнаруживали 8% анаплазм в 100 п./з. микроскопа, после лечения - 0,6%. У животных 2-й группы с паразитемией 5,2%, через 4 – 5 суток после лечения тетраэритросульфидом-ПЭГ, паразитемия снизилась до 0,4%. В 3-й группе животных, леченных силоветом, паразитемия снизилась с 6,8% до 1% инфицированных клеток. У животных 4-й группы до применения спирта с риванолом в мазках крови обнаруживали 4,6% инфицированных клеток, через 10 – 20 дней после лечения анаплазмы в мазках крови не были обнаружены. Перед лечением азидином с нилвермом (схема 5), у подопытных животных паразитемия составляла - 6%, через 10 – 20 дней после введения препарата в мазках крови опытных животных анаплазмы не были обнаружены.

Таблица 3. Схемы опытов по изучению лечебно-профилактических свойств некоторых препаратов при анаплазмозе крупного рогатого скота

№ групп и схемы	Кол-во гол.	Схемы лечения нетелей и коров 1,5-3,5 лет (опыт 1) и телят 6 мес. возраста (опыт 2).
Опыт I. ЗАО «Колос»		
1	5	Тетрациклин-ПВП 0,1мл/кг внутримышечно 1 раз в день с интервалом в 24ч. в течение 3 дней
2	5	Тетраэритросульфид-ПЭГ 1мл/10кг внутримышечно с интервалом в 24ч. 1 раз в день в течение 3 дней.
3	5	Силовет 0,1мл/кг подкожно 1 раз в день с интервалом в 24ч. в течение 3 дней.
4	5	Спирт+риванол 180мл/гол внутривенно однократно.
5	5	Азидин+нилверм 15мл/гол подкожно, трёхкратно с интервалом 10 дней.
6	10	Контрольная группа не леченых животных
Опыт II. СПК «Большевик»		
7	5	Левотетрасульфид – ПЭГ 1мл/10кг внутримышечно, двукратно с интервалом 4 дня.
8	5	Тилоциклин - ПЭГ 2мл/10кг внутримышечно, пятикратно, ежедневно по 1 разу.
9	10	Контрольная группа не леченых животных
Опыт III. СПК «Новороссийский»		
10	5	Левозитроциклин – ПЭГ 1мл/10кг внутримышечно, трёхкратно с интервалом 5 дней.
11	5	Тилоциклин – ПЭГ 2мл/10кг внутримышечно, пятикратно, ежедневно по 1 разу.
12	10	Контрольная группа не леченых животных

В 7-й группе II опыта с терапевтической целью испытывали левотетра-сульфин - ПЭГ на 6 месячных телятах, а в 8-й группе тилоциклин - ПЭГ на глубокостельных коровах. У животных 7-й группы до проведения лечения, в мазках крови обнаруживали 13% инфицированных клеток, через 20 дней после лечения в крови больных животных анаплазмы отсутствовали. У животных 8-й группы с паразитемией 10,2% инфицированных клеток, после лечения, паразитемия снизилась до 0,8% инфицированных клеток.

В III опыте с лечебной целью испытывали комплексные препараты: лево-эритроциклин – ПЭГ на глубокостельных коровах (схема 10) и тилоциклин – ПЭГ на 6 месячных телятах (схема 11). В 10-й группе до лечения в мазках крови обнаруживали 11,2% инфицированных клеток, а после лечения - 0,6%. В 11-й группе животных, количество анаплазм в эритроцитах после санации снизилось с 9,8% до 0,8% инфицированных клеток.

Отсутствие клинических признаков, анаплазм или снижение паразитемии до единичных анаплазм в крови больных животных после лечения, указывает на эффективность данных схем лечения. Тогда как в контрольных группах во всех опытах через 20 дней, число анаплазм в эритроцитах увеличилось до $12,4 \pm 0,9$ – $14 \pm 0,9\%$, у животных поднялась температура тела до $40 - 41^{\circ}\text{C}$, отмечалась выраженная анемия, угнетение, отказ от корма. Больные животные были подвергнуты лечению.

Применение 5 и 7 схем лечения в ЗАО «Колос», позволило предотвратить экономический ущерб за 2004 г. на сумму 591378,3 руб., получить экономический эффект на сумму 571854,9 руб. и экономический эффект на один рубль затрат - 29, 29 руб.

ВЫВОДЫ

1. Установлено широкое распространение анаплазмоза и анаплазмозоносительства в 92% исследованных хозяйств всех природно-климатических зон Омской области. При инфицированности коров и телят от 20 до 90%. Выражена сезонность проявления болезни с апреля по октябрь с максимумом инфицированности животных в летний период, что обусловлено паразитированием на них большого количества иксодовых клещей.
2. Выявлено, что при обострении инфекции у анаплазмозоносителей, болезнь у крупного рогатого скота протекает в виде моноинфекции в 10 – 60% случаев и в 10 – 50% случаев принимает ассоциативную форму течения. Ассоциативная форма вызывает клиническое проявление болезни в более тяжелой форме. При этом у взрослого скота число сочленов ассоциации достигало до трёх, а у молодняка – до пяти, в различных сочетаниях с хламидиозом, лептоспирозом, а у молодняка ещё и с диплококкозом, ИРТ, ПГ-3, листериозом и особенно часто с сальмонеллёзом.

3. От больных анаплазмозом животных выделен возбудитель, который по биологическим свойствам принадлежит к роду анаплазм. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16s р-РНК, выявил нуклеотидную замену в ДНК, которая отличает *A.sp.Omsk* от *A. centrale* и *A. marginale*, циркулирующих в зарубежных странах.
4. В экспериментальных условиях доказана восприимчивость клещей *D. reticulatus* и *D. silvarum* к *Anaplasma sp. Omsk* при интрацеломальном заражении и сохраняемость возбудителя в них до двух месяцев. При этом установлена возможность не только трансвариальной, но и трансфазовой передачи в пределах одной генерации (сроки наблюдения). Наличие же анаплазм в селезёнке крупного рогатого скота указывает на трансмиссивный путь передачи возбудителя данными клещами, а повышение числа инфицированных нимф из потомства инфицированных самок – на медиаторный путь передачи.
5. Возбудитель *Anaplasma sp. Omsk*, не только вызывает клиническое проявление болезни и гибель белых мышей, но и сохраняется в их организме в течение последующих двух пассажей. При этом в крови подопытных животных анаплазмы не увеличивают свою паразитемию выше 8 – 10%. Вместе с тем усиливается их патогенность, что обуславливает заболевание мышей.
6. Установлено, что у спленэктомированных кроликов инфекционный процесс протекает остро (с проявлением выраженных клинических признаков анаплазмоза), а интенсивность паразитарной реакции, возрастает до 30 - 40% заражённых клеток уже на 12 – 27 сутки после заражения.
7. Полученная диагностическая анаплазмозная сыворотка обладает специфичностью к гомологичному антигену штамма *Anaplasma sp. Omsk* в разведении 1/10 и выше. Применение её и анаплазмозного антигена в РНИФ позволит проводить индикацию возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота в биоматериале, определять его антигенные свойства и идентифицировать возбудитель для определения его роли в патологии и патогенезе болезни, а также выявлять антитела в сыворотке крови больных и анаплазмоносителей.
8. Применение 1, 2, 3, 8, 10, 11 схем лечения на спонтанно инфицированном крупном рогатом скоте оказывает бактериостатическое действие на анаплазмы. В то время как 4, 5, 7 схемы лечения оказывают бактерицидное действие, на что указывает отсутствие в крови опытных животных возбудителя анаплазмоза. Вместе с тем, по экономическим и технологическим параметрам преимущество имеют 5 и 7 схемы с применением азилина с нилвермом и левотетрасульфина-ПЭГ. Применение данных схем лечения в базовом хозяйстве позволило получить экономический эффект на сумму 571854,9 руб.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического применения разработаны методические рекомендации: «Схемы профилактики и лечения при анаплазмозе крупного рогатого скота», «Экспериментальное моделирование естественного цикла метаморфоза иксодовых клещей» утверждены на заседании секции животноводства Центра научного обеспечения АПК при Министерстве сельского хозяйства и продовольствия Омской области, протокол №4 от 26.05.2005 г.

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 и изучения биологического взаимоотношения возбудителей трансмиссивных инфекций с их переносчиками.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Красиков А.П. Морфология крови при анаплазмозе крупного рогатого скота и ассоциативные формы его проявления / А.П. Красиков, В.И. Зайнчковский, В.С. Сороковой, К.К. Бейсембаев // Роль ветеринарного образования в подготовке специалистов агропромышленного комплекса: сб. науч. тр. – Омск: ИВМ ОмГАУ, 2003. – С. 153-157.
2. Красиков А.П. 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: сб. науч. тр. – Омск: ИВМ ОмГАУ, 2004. – С. 177-182.
3. Бейсембаев К.К. Экспериментальный анаплазмоз белых мышей / К.К. Бейсембаев, Н.В. Рудаков // Эпизоотология, патология и ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных: сб. науч. тр. СО РАСХН ВНИИБТЖ. – Омск, 2004. – С. 6-9.
4. Бейсембаев К.К. 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: сб. науч. тр. СО РАСХН ВНИИБТЖ. – Омск, 2005. – С. 42-46.
5. Бейсембаев К.К. Спленэктомия – как возможный способ увеличения паразитемии возбудителя анаплазмоза в крови кроликов / К.К. Бейсембаев, А.П. Красиков, В.И. Самчук // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сб. науч. тр. СО РАСХН ВНИИБТЖ. – Омск. 2005. – С. 46-50.

**БЕЙСЕМБАЕВ
КАНАТЖАН КАИРГЕЛЬДИНОВИЧ**

**ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АНАПЛАЗМОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
МЕТОДОВ ЕГО ДИАГНОСТИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой
степени кандидата ветеринарных наук

Подписано в печать 19.09.2005
Формат 60 x 84 1/16. Гарнитура Times New Roman
Печ. л. 1,2. Печать оперативная. Тираж 100 экз.

Институт ветеринарной медицины ОмГАУ

Отпечатано с оригинал-макета
в типографии ООО "Вариант-Омск"
644099 г. Омск, ул. Коммунистическая, 45. Тел: 25-14-34, 33-71-41

№ 17892

РНБ Русский фонд

2006-4

17616