

Чегиров С.Б.

МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ БРУЦЕЛЛ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ФЕРМЕРСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ АК-ТАЛИНСКОГО РАЙОНА НАРЫНСКОЙ ОБЛАСТИ

S.B. Chegirov

MOLECULAR OF GENETIC TYPING OF BRUCELLA CIRCULATING IN FARMS AK-TALA DISTRICT NARYN REGION

УДК 57.083.18

Массовая вакцинация ярок вакциной Rev-1 в течение последних 4 лет позволила более чем в двое сократить зараженность овец и крупного рогатого скота бруцеллезом.

*Молекулярно-генетическими исследованиями подтверждена доминирующая роль *B.melitensis* среди других видов бруцелл. Определено их генетическое родство и различия.*

*Mass vaccination bright Rev-1 vaccine in the past 4 years has allowed more than two to reduce the infestation of sheep and cattle brucellosis. Molecular genetic studies pdtverzhdena *B.melitensis* dominant role among the other *Brucella* species. Determined by their genetic relatedness and differences.*

Борьба с бруцеллезом сельскохозяйственных животных является одной из самых актуальных проблем мировой ветеринарной науки. Эта болезнь наносит огромный экономический ущерб хозяйствам по разведению крупного рогатого скота, овец и свиней. У больных животных снижается продуктивность, не исключены аборт и мертворождение приплода. Больные животные и полученные от них продукты являются основным источников заражения людей.

По данным Объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу (шестой доклад, 1986), бруцеллез сельскохозяйственных животных распространен практически во всех странах мира.

В Кыргызской Республике бруцеллез регистрируется практически среди всех видов сельскохозяйственных и домашних животных. Наиболее важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение имеет бруцеллез крупного и мелкого рогатого скота. Высокий уровень заболеваемости населения наблюдается в Иссык-Кульской, Нарынской, Таласской, Чуйской областях. Особую тревогу вызывает тот факт, что 25% из числа заболевших составляют дети и подростки до 18 лет. В этой связи поиски новых средств и методов борьбы с бруцеллезом остается актуальной задачей для ветеринарной науки.

Несовершенство традиционных методов диагностики бруцеллеза обуславливает актуальность проблемы по изучению и освоению молекулярно-генетических экспресс - методов, как полимеразная

цепная реакция (ПЦР) и анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов.

Не менее актуальной задачей является идентификация и классификация бактерий бруцелл, вызывающих инфекционное заболевание.

Знание циркулирующих типов возбудителей бруцеллеза крайне важно для организации эпизоотического и эпидемиологического надзора, проведения противоэпидемических мероприятий, краткосрочного и долгосрочного прогнозирования.

Материалы и методы исследований

При изучении биологии возбудителя использован клинический материал, патматериал, сыроворотки крови. Исследование материала проводилось с помощью молекулярно-генетических и иммуносерологических методов. Иммуносерологическое тест проведение: реакция агглютинации в пробирках (Райта), РБТ, РСК, проводились по методикам, описанным в методических указаниях по профилактике и лабораторной диагностике бруцеллеза.

Для идентификации бруцелл до вида взяты образцы крови КРС, МРС, яков, свиней и собак из неблагополучных хозяйств разных регионов Кыргызской Республики с неизвестной историей вакцинации или инфекции. Образцы исследованы серологическим методом (РБТ) для выявления специфических антител. До постановки ПЦР анализа от положительно реагирующих животных взяты образцы крови с добавлением ЭДТА. Цельную кровь брали в пробирки объемом 5-10 мл с предварительно добавленным антикоагулянтом (3% раствор ЭДТА из расчета 10:1). ДНК бруцелл выделяли из клеток крови с использованием набора для экстракции ДНК из венозной крови DNeasy Blood Kit ("Qiagen", Германия).

При статистической обработке результатов использованы методы математической статистики, принятые в биологии и медицине (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962).

Результаты исследований

Согласно принятой в республике стратегии борьбы с бруцеллезом с 2008 г. применяется массовая вакцинация ярочного поголовья вакциной Rev-1 конъюнктивно.

Таблица 1

Инфицированность с.х. животных бруцеллезом по материалам взятым в Ак-Талинском районе 2012г.

№	Вид животных	Исследовано проб	Из них положительных проб по				В них обнаружены по ПЦР			
			РБТ		ИФА		B.melitensis		B.abortus	
			количество	процент	количество	процент	количество	процент	количество	процент
1	МРС	4580	340	7,4%	298	6,5%	285	95,6%	13	4,4%
2	КРС	1027	5	0,49%	4	0,39%	2	50%	2	50%
3	Лошади	982	5	0,51%	5	0,51%	1	20%	4	80%
4	Итого	6589	350	5,3%	307	4,6%	288	93,4%	19	6,6%

По результатам серологических исследований методом РБТ и ИФА положительно реагирующих животных в результате применения вакцины Рев1 сократилось среди овец и коз до 6.5%, среди КРС до 0,4%. В целом по Ак-Талинскому району в течение 3х лет инфицированность животных сократилась с 9 до 4.7 %.

Из 307 изолятов в 288 случаях обнаружены B.melitensis, в 19 - B.abortus. По видам животных соответственно МРС - 285 и 19; КРС 2 и 2, Лошади 1 и 4. Следовательно, преобладающим видом бруцелл является B.melitensis, а среди КРС и овец наблюдается миграция B.abortus.

Таблица 2.

Серологические исследования овец на бруцеллез в разрезе сел Ак-Талинского района. (2012год)

№	Наименования поселков	Исследовано проб	Из них положительных проб по		В них обнаружены по ПЦР	
			РБТ	ИФА	B.melitensis	B.abortus
1	Көш-Дөбө	250	4	4	4	0
2	Жерге-Тал	250	44	33	31	2
3	Кызыл-Белес	250	19	17	16	1
4	Байгончок	241	17	13	13	0
5	Чолок-Кайын	256	7	7	6	1
6	Коңорчок	250	25	21	19	1
7	Кара-Бургөн	250	10	8	8	0
8	Ак-Чий	350	23	22	21	1
9	Жаңы-Тилек	250	11	11	11	1
10	Терек	250	32	31	30	1
11	Баегов	250	7	7	7	0
12	Кайынды-Булак	250	31	29	27	2
13	Үгүт	230	21	18	18	1
14	Ак-Тал	251	18	17	17	2
15	Ак-Кыя	252	21	17	16	1
16	Көк-Жар	250	11	11	11	1
17	Жаңы-Талап	250	10	6	6	0
18	Кара-Ой	250	29	26	24	1
19	Всего	4580	340	298	285	13

Данные таблицы подтверждают доминирующую роль бруцеллы мелитензис а также миграцию B.abortus среди овец в 0,3% случаев. Всего положительных проб из числа исследованных (4580) оказалось 298, или 6,5%, что ниже исходной зараженности овец (11,4%) почти вдвое. Это результат применения вакцины Рев1 на маточном поголовье овец.

Таблица 3.

Серологические исследования коров на бруцеллез в разрезе сел Ак-Талинского района. (2012год)

№ п	Наименования поселков	Исследовано проб	Из них положительных проб по		В них обнаружены по ПЦР	
			РБТ	ИФА	B.melitensis	B.abortus
1	Жерге-Тал	55	2	2	1	1
2	Ак-Кыя	56	1	1	0	1
3	Кара-Ой	56	1	1	1	0
4	Другие села	860	0	0	0	0
5	Всего	1027	5	4	2	2

Таким образом, в результате реализации стратегии борьбы с бруцеллезом путем применения вакцины Рев-1 зараженность коров снижена до 0,4% против 1,6% в 2008г. По результатам ПЦР анализа обнаружена миграция возбудителя бруцелл мелитенсис среди коров.

Таблица 4.

Серологические исследования лошадей на бруцеллез (Ак-Талинский район 2012 год)

№	Наименование поселков	Исследовано проб	Из них положительных проб по		В них обнаружены	
			РБГ	ИФА	<i>B.melitensis</i>	<i>B. abortus</i>
10	Терек	55	5	5	1	4
18	Другие сел	977	0	0	0	0
19	Всего	982	5	5	1	4

Уровень зараженности лошадей бруцеллезом самый минимальный и сохранился прежним за истекшие 4 года. Обнаружена миграция возбудителя бруцеллы мелитенсис среди лошадей.

Обсуждение

Борьба с бруцеллезом является важной проблемой здравоохранения в развивающихся странах. Бруцеллез является основной причиной, тормозящей развитие животноводства, совершенствования племенных качеств и продуктивных скота. Для борьбы с бруцеллезом в эндемичных регионах знание эпидемиологических и эпизоотологических информация имеет большое значение. Научкой установлено, что разные виды бруцелл имеют своих хозяев. Так, *B.melitensis*, в основном, поражает овец. Основной хозяин *B.abortus* является крупный рогатый скот. Эпизоотологическая информация может помочь контролировать наличие или отсутствие инфекции у овец, крупного рогатого скота, а также среди населения. Основные приемы борьбы с бруцеллезом это высокоспецифическая диагностика и вакцинация мелкого рогатого скота выбраковка инфицированного поголовья.

Борьба с бруцеллезом начинается с обнаружения болезни у животных путем массового серологического обследования. Далее проводится надлежащая безопасная вакцинация восприимчивых животных. С учетом экологических различий между видами бруцелл, регистрируемых на территории конкретной зоны, подбирается наиболее соответствующая и безопасная вакцина, а также время вакцинации. Также следует учесть, что некоторые вакцинные штаммы Рев-1 могут заражать человека, вызывать остановку развития плода у овец и крупного рогатого скота. Поэтому подбор наиболее соответствующей вакцины, близкой по биологическим свойствам циркулирующим типам бруцелл имеет большое значение.

Согласно пилотной программы юорьбы с бруцеллезом в течение 2008-2012гг. проводилась массовая вакцинация ярок вакциной Рев-. Это позволило сократить инфицированность крупного рогатого скота с 1,6 до 0,4%, овец с 9 до 4,7%.

Нами впервые в ветеринарной науке Кыргызстана проведено молекулярно-генетическое типирование

2х изолятов бруцелл (*B.abortus*, *B.melitensis* и степень их генетического родства и разнообразия. Установлено что циркуляция изолятов бруцелл с определенными ПЦР-ПДРФ генотипами была связана с территориальной близостью областей Кыргызстана. Исследование указывает на миграцию возбудителей бруцеллеза на нетиповых хозяев. Сравнительное изучение изолятов, циркулирующих в приграничных с Кыргызстаном территориях, проводили согласно методики ПЦР-ПДРФ

Литература

1. Гребенникова Т.В., Грабовецкий В.В. и др. Дифференциальная диагностика микобактерий методом ПЦР // Ветеринария, 1999. - №3. - С.17-20.
2. Поляков И.В., Соколова Н.С. Практическое пособие по медицинской статистике. - Л.: Медицина. 1975. - С.55-58.
3. Скляр О.Д. и др. Молекулярное типирование м.о. // Сб. тезисов 4-й Всероссийской научно-практической конф. - М., 2002. - 240с.
4. Скляр О.Д. и др. Молекулярные механизмы генотипирования патогенов//Сб. науч. тр. ВГНКИ.- М., 2003. - 64с.
5. Шумилов К.В. и др. Новейшие методы диагностики бруцеллеза // Ветеринария, 1996. - С.12.
6. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyon I (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*, 90 (1-4): 209-27.
7. Rodriguez A, Abad R, Orduna A (1992). Species and biovars of the genus *Brucella*. Etiology of human brucellosis in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 10(1): 43-8.
8. Boschiroli ML, Foulongne V, O'Callaghan D (2001). *Brucellosis: a worldwide zoonosis*. *Curr Opin Microbiol*, 4(1): 58-64.
9. Zinsstag J, Roth F, Orkhon D, Chimed-Ochir G, Nansalma M et al. (2005). A model of animal-human brucellosis transmission in Mongolia. *Prev Vet Med*, 69(1-2): 77-95.
10. Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, Fossati CA (2004). Human infection with M- strain of *Brucella canis*. *Emerg Infect Dis*, 10(1): 146-48.
11. Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K et al.
12. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine
13. mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis.
14. *Vet Res*, 36(3): 313-26.

15. Taleski V, Zerva L, Kantardjiev T, Cvetnic Z, Erski-Biljic M, Nikolovski B et al. (2002). An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. *Vet Microbiol*, 90(1-4): 147-55.
16. Garin-Bastuji B, Blasco JM, Grayon M, Verger JM (1998). *Brucella melitensis*
17. infection in sheep: present and future. *Vet Res*, 29(3-4): 255-74.
18. Ocholi RA, Kwaga JK, Ajogi I, Bale JO (2005). Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Nigeria. *Rev Sci Tech*, 24 (3): 973-9.

Рецензент: к.биол.н. Акматова Э.К.
