

Распространение анаплазмоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации Distribution of bovine anaplasmosis in Russian Federation

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-2-8
УДК 619.616.993.192.6

Резюме: Анаплазмоз крупного рогатого скота - трансмиссивное инфекционное заболевание, вызываемое риккетсиями *Anaplasma marginale* (отряд Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae), приносящее значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота. Решающую роль в предотвращении распространения анаплазмоза крупного рогатого скота играет своевременная диагностика. Наиболее оперативную и точную диагностическую информацию позволяет получить выявление ДНК возбудителей анаплазмоза в крови КРС с помощью полимеразной цепной реакции. Целью данной работы было изучение распространения анаплазмоза крупного рогатого скота в районах Московской, Калужской, Кировской областей и Красноярского края с помощью ПЦР-диагностики. Выявлено, что количество зараженных *A. Marginale* животных находится в пределах от 8.3 до 70.1 %, в зависимости от региона. Полученные в данной работе и литературные данные об уровне распространения анаплазмоза крупного рогатого скота позволяют привлечь внимание к проблеме, способной играть значительную роль в экономических по-



Архипова А.Л.

г. Москва

Ключевые слова: крупный рогатый скот; анаплазмоз; *Anaplasma marginale*; ПЦР в реальном времени.

Key words: cattle; anaplasmosis; *Anaplasma marginale*; real-time PCR

Авторы / Authors

Архипова А.Л., младший научный сотрудник отдела молекулярных биотехнологий, kamfora3@gmail.com
Тагмазян А. А., младший научный сотрудник отдела молекулярных биотехнологий
Куреев Н.А., младший научный сотрудник отдела молекулярных биотехнологий
Бригида А.В., заведующий отделом экспериментальной трансплантологии, ведущий научный сотрудник
Ковальчук С.Н., кандидат биологических наук, врио директора, s.n.kovalchuk@mail.ru
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий", 127422, Москва, ул. Костякова, дом 12, стр. 4, e-mail: info-ceerb@mail.ru
Arkhipova A. L., Tagmazyan A.A., Kureev N.A., Brigida A.V., Kovalchuk S.N.

терях в животноводстве России.

Summary: Bovine anaplasmosis is a transmissible tick-borne infectious disease of cattle caused by *Anaplasma marginale* (Rickettsiales, Anaplasmataceae). It causes significant economic damage to livestock farms due to loss of dairy and meat productivity and high morbidity and mortality in cattle herds. Earlier diagnosis plays a crucial role in preventing the distribution of bovine anaplasmosis. Detection of causative agent DNA in cattle blood samples using the polymerase chain reaction is the most rapid and accurate diagnostic method. The purpose of this work was to study the distribution of cattle anaplasmosis in Moscow, Kaluga, Kirov regions and Krasnoyarsk Krai using PCR diagnostics. It was revealed that the number of animals infected with *A. marginale* ranged from 8.3 to 58.0%, depending on the region. Obtained in this work and literature data on the level of distribution of bovine anaplasmosis can draw attention to the problem that can play a significant role in the economic losses in animal husbandry in Russia.

Введение

Анаплазмоз крупного рогатого скота (КРС) – трансмиссивное инфекционное заболевание, возбудителем которого являются риккетсии *A. marginale* (отряд Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae). *A. marginale* – облигатные внутриэритроцитарные паразиты – были открыты в 1910 г. Арнольдом Тэйлором и описаны как небольшие кокковидные включения размером 0,2–1,2 мкм в эритроцитах [22]. Анаплазмоз характеризуется лихорадкой непостоянного типа, анемией, истощением, снижением производства молока, потерей плода, летаргией и смертью [9]. Тяжесть заболевания зависит от возраста инфицированного животного [19]. Источниками *A. marginale* являются больные животные и анаплазмоносители, переносчиками – кровососущие насекомые (11 видов иксодовых и один вид аргасовых клещей (*Alveonatus lahorensis*), механическая передача возбудителя от зараженных животных к здоровым возможна через нестерильные инструменты при проведении зоотехнических мероприятий (взятие крови, вакцинация, обрезка рогов и т.д.) [8, 9]. Заражению *A. marginale* подвержено большое количество видов диких жвачных животных, в том числе буйволы, бизоны, белохвостые олени, мулы, антилопы и др. [18].

Анаплазмоз широко распространен во всем мире и приносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота – летальность при анаплазмозе КРС находится в пределах от 10 – 30% до 100 %, в зависимости от географического региона и уровня распространения клещей [23]. По имеющимся оценкам, ежегодные экономические потери от анаплазмоза крупного рогатого скота только в США и Танзании составляют около 300 и 47,3 миллиона долларов, соответственно [20, 22, 23]. Специальных исследований по точному определению экономического ущерба от рассматриваемых болезней в нашей стране, к сожалению, проведено мало. По имеющимся предварительным оценкам, ежегодный экономический ущерб от снижения молочной продуктивности коров только в Калининградской области составляет свыше 2 млн. рублей [15].

Своевременная диагностика играет решающую роль в предотвращении распространения анаплазмоза крупного рогатого скота. Из существующих методов диагностики анаплазмоза КРС (микроскопического, серологических и молекулярно-генетических), до сих пор одним из наиболее часто используемых является микроскопический метод [4]. Недостатком данного метода является то, что своеобразная форма в виде точек и возможное наличие в эритроцитах здоровых животных различных включений (тельца Жоллии др.) могут приводить к постановке ложных диагнозов, а также данным методом сложно диагностировать анаплазмоз на ранних стадиях заболевания при низком уровне паразитемии [5].

Серологический метод диагностики как обязательный, наряду с микроскопическим, вошел в первую Инструкцию по анаплазмозу рогатого скота [14]. В нашей стране профессором Степановой Н.И., разработана реакция связывания комплемента (РСК) и реакция длительного связывания ком-

племента (РДСК); за рубежом так же используются РСК (РДСК), РА или микроагглютинации, реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция иммунофлюоресценции (РИФ) прямыми или непрямыми методами [1]. Но и у данных методов присутствуют свои минусы – обладают недостаточно высокой чувствительностью и не позволяют дифференцировать *A. marginale* от непатогенных для крупного рогатого скота видов анаплазм [21].

Наиболее оперативную и точную диагностическую информацию позволяет получить выявление ДНК возбудителей анаплазмоза в крови КРС с помощью полимеразной цепной реакции. Преимуществом ПЦР-диагностики от других методов является высокая чувствительность и специфичность – она позволяет обнаружить возбудителя на самых ранних стадиях заболевания, в том числе и во время латентной фазы, и надежно дифференцировать анаплазмоз от ряда сходных по клиническим проявлениям заболеваний [10, 11]. Другими достоинствами метода являются небольшие затраты времени на проведение анализа и возможность автоматизации процесса

Целью данной работы было изучение распространенности анаплазмоза крупного рогатого скота в Московской области, Калужской области, Кировской областях и Красноярском крае.

Материалы и методы

Образцы крови были отобраны у голштинизированного черно-белого скота в Дзержинском районе Калужской области ($n=764$, март 2018 г.), в Канском районе Красноярского края ($n=24$, декабрь 2018г), в Унинском районе Кировской области ($n=124$, ноябрь 2018 г.), Можайского района Московской области ($n=65$, октябрь 2018 г.; $n=113$, март 2016).

ДНК выделяли набором DiatomDNA Prep 100 (Изоген, Россия) согласно рекомендациям производителя. Идентификацию животных зараженных *A. marginale* проводили на основе метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, разработанного нами ранее [11]. Реакция амплификации проводилась в 10 мкл общей смеси, содержащей 5 мкл реактива для ПЦР LightCycler® 480 Probes Master ("Roche", Швейцария), праймеры прямой и обратный MSP4-F 5'-CATGAGT-CACGAAGTGGCT-3'; MSP4-R 5'-GGCACACTCA-CATCAATC-3' концентрацией 0,5 мкМ, флуоресцентно меченный зонд MSP4-probe 5'- (Cy5) AAGGGGGAGTAATGGGAGGTAGCT-3' (0,1 мкМ), 30 нг ДНК. ПЦР проводился на приборе Light Cycler 96 ("Roche", Швейцария) при следующих условиях: начальная денатурация в течение 2 мин при 95 °С, последующие 45 циклов амплификации: денатурация при 95 °С, в течение 15 с, отжиг праймеров при 58 °С, в течение 15 с, элонгация при 72 °С, в течении 15 с. Положительным контролем ПЦР служила реакционная смесь, в которую была внесена полученная нами ранее [11] контрольная плаزمиды pGEM-msp4, содержащая фрагмент гена msp4 *A. marginale* длиной 177 п.н. В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь, не содержащую ДНК. Результаты ПЦР оценивали по нарастанию флуоресценции по каналу Cy5 и методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Согласно имеющейся ветеринарной отчетности, в Российской Федерации неблагополучными по анаплазмозу являются южные области России, Брянская, Калужская, Рязанская, Калининградская, Саратовская, Тверская, Тюменская, Владимирская, Нижегородская, Новосибирская и Ульяновская области, Алтайский край [3,6]. В результате масштабных серологических и микроскопических исследований, проведенных в 2010-2014 годах, высокий уровень зараженности анаплазмозом (21,4-56%) был зафиксирован на юге Тюменской области уровень [12]. Также имеются данные исследований распространения анаплазмоза крупного рогатого скота в Тверской и Рязанской областях, считавшихся ранее благополучными по кровепаразитарным болезням – в Кадомском районе Рязанской области зараженными оказались 75 - 100% животных [13, 14]. Из четырех зон Тверской области (13 районов и 20 хозяйств общественного сектора) было исследовано 392 мазка крови от взрослого крупного рогатого скота в возрасте от 2 до 7 лет и более с

Таблица 1. Уровень инфицированности крупного рогатого скота *A. marginale*

Район	Дата забора крови	Всего отобранных образцов	Всего зараженных <i>A. marginale</i>	Уровень зараженности, %
Дзержинский район Калужской области	Март 2018	764	76	9.9%
Канский район Красноярского края	Декабрь 2018	24	2	8.3%
Унинский район Кировской области	Ноябрь 2018	124	87	70.1%
Можайский района Московской области	Март 2016	113	65	58.0%
Можайский района Московской области	Октябрь 2018	65	19	29.2%

просмотром в каждом из них 100 полей зрения. Анаплазмоносительство было обнаружено у животных во всех 13 районах, расположенных в 4-х зонах Тверской области (Вышневолоцкой, Бежецкой, Ржевской, Торжокской), с паразитемией в пределах – 1 – 3 – 5 – 8 в 100 полях зрения микроскопа [8].

В Кировской области анаплазмоз крупного рогатого скота зарегистрирован с 2005 г. Экстенсивность инвазии животных анаплазмами в течение 5 лет, начиная с 2005 по 2009 гг., находилась в пределах 76,87–100 %. В 2009 – 2010 гг. из 39 обследованных районов Кировской области, в т. ч. г. Кирова, неблагополучных по анаплазмозу выявлено 25 районов, в т. ч. животноводческие хозяйства г. Кирова. Средний процент зараженности крупного рогатого скота анаплазмами в Кировской области составлял 9,42 % [16]. В 2012 г. по данным исследований областных лабораторий и диагностического отдела Кировской облветлаборатории процент зараженности крупного рогатого скота анаплазмами в Кировской области составил 1,44 и 0,38%, соответственно. Была показана сезонность заболевания – в среднем по области отмечали два пика: максимум зараженности животных анаплазмами в ноябре (37,05 %) и в 2,2 раза ниже - в мае (17,05 %) [16]. Пики заболеваемости животных анаплазмозом совпадают с пиком нападения клещей. Сезонность заболевания отражается в неодинаковом проявлении клинических признаков на протяжении года, что обусловлено различными климатическими условиями регионов, выражающихся в различных показателях температур, напрямую влияющих на активность клещей - переносчиков возбудителя и перехода от стойлового периода содержания к пастбищному [2].

В данной работе нами были исследованы образцы крови, отобранные в хозяйствах Московской, Калужской и Кировской областей и Красноярского края.

Идентификацию *A. marginale* проводили с помощью разработанного нами ранее метода ПЦР в реальном времени с видоспецифичными праймерами и флуоресцентно-меченым зондом к гену *msp4*, чувствительность которого составляет 100 копий ДНК *A. marginale*, а специфичность позволяет надежно дифференцировать *A. marginale* от других видов анаплазм [10, 11].

Результаты исследований представлены в Таблице 1. Согласно полученным данным, процент зараженности животных в Канском районе Красноярского края составил 8.3%, в Дзержинском районе Калужской области – 9.9 %, в Унинском районе Кировской области – 70.1%. Наблюдается уменьшение количества анаплазмоносителей в Можайском районе Московской области – с 58.0% в 2016 г. до 29.2% – в 2018 г.

Таким образом, полученные в данной работе и литературные данные об уровне распространения анаплазмоза крупного рогатого скота позволяют привлечь внимание к проблеме, способной играть значительную роль в экономических потерях в животноводстве Российской Федерации. Представляется целесообразным использовать для эпизоотологического мониторинга анаплазмоза крупного рогатого скота ПЦР-диагностику в режиме реального времени, отличающуюся от других методов высокой чувствительностью и специфичностью, меньшими временными затратами на проведение анализа и возможностью автоматизации процесса.

Литература
Ахмадов Н.А. Серологические исследования анаплазмоза крупного рогатого скота в Таджикистане / Н.А. Ахмадов, Х. Георгиу, В.В. Белименко, Х.О. Давладов // Доклады ТАСХН. - 2012. - №2. - С. 52-54.
2. Блюменкранц Д.А. Дифференциально-диагностические признаки анаплазмоза животных //Сельское хозяйство. - 2018. - № 02. - С. 9-15.
3.Георгиу Х., Белименко В.В. Анаплазмоз крупного рогатого скота // РВЖ. Сельскохозяйственные животные. - 2015. - №1. - С. 5-7.
4. Георгиу Х., Хамурзов Е.М., Горбунова Е.М., Орел В.Г. К вопросу о диагностике анаплазмоза крупного и мелкого рогатого скота / Х. Георгиу, Е.М. Хамурзов и др.// Ветеринарная патология, № 2, 2008, С.41-45.
5. Георгиу Х.Современные лабораторные методы диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота и овец/ Х. Георгиу, В.В. Белименко // РВЖ. СХЖ. - 2014. - № 3. - С. 31-32.
6. Гулюкин М.И., Заблоцкий В.Т., Белименко В.В. Мониторинг эпизоотической ситуации по протозойным кровепаразитарным болезням домашних животных в Российской Федерации (2007-2012) // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. - 2013. - № 2. - С. 36-40.
7. Заблоцкий В.Т. Профилактика кровепаразитарных болезней домашних животных / В.Т.Заблоцкий, В.В. Белименко // Веткорм. - 2013. - №4. -С.38-40.
8. Заблоцкий В.Т. Терапия и специфическая профилактика анаплазмоза рогатого скота / В.Т. Заблоцкий, Н.А. Казаков, З.П. Мутузкина, О.Е. Мальцева //Тезисы докладов Международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных", посвященной 70-летию Ставропольской НИВС, Ставрополь -1999. -С.182-183.
9.Казаков Н.А., Идина М.Ф. Анаплазмоз крупного рогатого скота в Тверской области // Ветпатология. - 2009. - №2. - С.72-75.
10. Ковальчук С.Н., Бабий А.В., Архипова А.Л., Архипов А.В. Косовский Г.Ю. Оценка уровня паразитемии методом ПЦР в реальном времени при анаплазмозе крупного рогатого скота // Проблемы биологии продуктивных животных. - 2016. - №3. - С. 98-105.
11. Ковальчук С.Н., Косовский Г.Ю., Архипов А.В., Глазко Т.Т., Глазко В.И. Разработка метода выявления *Anaplasma marginale* с использованием ПЦР в реальном времени // Сельскохозяйственная биология. - 2015. - Т. 50. - № 6. - С. 825-831.
12. Либерман Е.Л., Хлызова Т.А. Зависимость инвазирования крупного рогатого скота анаплазмозом от численности насекомых комплекса "Гнус" // Educatio - 2015. - № 3. - С. 46-50.
13. Мальцева О.Е. Анаплазмоз крупного рогатого скота в Центральном регионе РФ (эпизоотология, вакцинопрофилактика, химиотерапия и меры борьбы) // Автореферат диссертации канд.биол. наук/ ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко. М. - 2004 г. - 15 с.
14. Малофеева Н.А. Анаплазмоз крупного рогатого скота и усовершенствование мер борьбы с ним в условиях Рязанской области; дис. канд. ветеринар. наук. - Москва, 2007. - С. 155.
15. Минасян В.Г., Ткаченко Ю.Г., Идина М.Ф. Методы лечения коров больных анаплазмозом//Ветеринарная патология. -2009г. -№ 4. - С. 82-85.
16.Скорнякова О.О. Эпизоотологический мониторинг и динамика сезонной восприимчивости крупного рогатого скота к бабезиозу и анаплазмозу // Российский паразитологический журнал- 2014. - №4. - С.34-39.
17. Степанова Н.И. Иммуитет и серологическая диагностика анаплазмозов и тейлериозов крупного рогатого скота. (Автореферат докторской диссертации, М.: 1971, с. 30.
18. Aubry P., Geale, D.V., A review of bovine anaplasmosis // Transbound. Emerg. Dis. -2011. - Vol. 58(1). - 1-30.
19.Battilani M., De Arcangeli, S., Balboni, A., & Dondi, F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma* // Infection, Genetics and Evolution. - 2017. - Vol. 49. - P. 195-211.
20. Brown C.G. Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle // Tropical animal health and production. - 1997. - Vol. 29. - P. 1S-3S.
21. Dreher U.M., Fuente J., Hofmann-Lehmann, R., Meli M.L., Pusterla, N., Kocan, K.M., Woldehiwet, Z., Braun, U., Regula, G., Staerk, K.D., Lutz, H. Serologic crossreactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* // Clin Diagn Lab Immunol. -2005. -Vol. 12. -P. 1177-1183.
22. Kivaria F.M. Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania // Tropical animal health and production. - 2006. - Vol. 38. - P. 291-9.
23.Kocan K.M., de la Fuente, J., Guglielmo, A.A., Mel-ndez, R.D., 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle // Clin. Microbiol. Rev. - 2003. - Vol.16(4). - P. 698-712.
24. Wall D.T. Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa // Ann N Y Acad Sci. - 2000. - № 916. - P. 474-83.