

Мамбеталы Садывалыевич Турсумбетов

Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии им. А. Дуйшеева, старший научный сотрудник лаборатории по изучению бруцеллеза сельскохозяйственных животных, Бишкек, Киргизия
E-mail: mambetalytursumbetov@gmail.com

Саламат Биримкулович Чегиров

Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии им. А. Дуйшеева, старший научный сотрудник лаборатории бруцеллеза животных, кандидат биологических наук, Бишкек, Киргизия
E-mail: ch_salamat15@mail.ru

Замира Садыбакасовна Кельдибекова

Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, доцент кафедры инфекционных и инвазионных болезней животных, кандидат ветеринарных наук, Бишкек, Киргизия
E-mail: zkeldibekova@gmail.com

МЕЖВИДОВАЯ МИГРАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА СРЕДИ ЯКОВ

Цель исследования – изучение наличия межвидовой миграции возбудителя бруцеллеза среди яков и видовой принадлежности бруцелл с помощью полимеразной цепной реакции. Лабораторные исследования проводили с применением серологических и классических методов ПЦР анализа. Объектом исследования послужили яководческие фермы и частные подворья, занимающиеся разведением яков из Иссык-Кульской и Нарынской областей, располагающих обширными высокогорными пастбищами. Кровь от яков, различных по полу и возрасту, отбирали из вены одноразовой иглой в стерильную вакуумную систему типа Vacutainer. На первом этапе в сыворотке крови животных методом роз-бенгал теста и иммуноферментного анализа определили наличие бруцеллезной инфекции у яков. Лабораторный анализ сывороток крови от 56 яков указал, что в 14 случаях они были инфицированы бруцеллезом. Клинические признаки проявления болезни во время отбора проб крови не проявлялись. Затем положительно реагирующие пробы исследовали методом ПЦР для установления типовой принадлежности бруцелл. Результаты показали, что в крови инфицированных яков были найдены Br. Melitensis, это указывало на происходящую миграцию бактерий от мелкого и крупного рогатого скота. Межвидовой миграции бруцелл способствовало совместное содержание яков с крупным и мелким рогатым скотом на общей территории фермерских и частных подворий. А также в распространении бруцеллеза и миграции бруцелл сыграло свою роль совместное (КРС, МРС, яки) круглогодичное использование пастбищных угодий высокогорных естественных пастбищ Нарынской и Иссык-Кульской областей. Определение видовой принадлежности бруцелл у конкретного вида животных будет полезно при разработке научно обоснованного плана противоэпизоотических мероприятий против бруцеллеза и подборе специфических средств профилактики.

Ключевые слова: бруцеллез яков, типизация, праймеры, ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), иммуноферментный анализ (ИФА), роз-бенгал тест (РБТ), полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Mambetali S. Tursumbetov

Senior Researcher, Laboratory for the Study of Brucellosis of Farm Animals, Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duisheeva, Bishkek, Kyrgyzstan
E-mail: mambetalytursumbetov@gmail.com

Salamat B. Chegirov

Cand. Biol. Sci., Senior Researcher, Laboratory for the Study of Brucellosis of Farm Animals, Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duisheeva, Bishkek, Kyrgyzstan
E-mail: ch_salamat15@mail.ru

Zamira S. Keldibekova

Cand. Vet. Sci., Assoc. Prof., Chair of Infectious and Invasive Animal Diseases, Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Scriabin, Bishkek, Kyrgyzstan
E-mail: zkeldibekova@gmail.com

INTERSPECIFIC MIGRATION OF AGENT BRUCELLOSIS AMONG YAKS

The aim of the research is to study the presence of interspecific migration of the pathogen of brucellosis among yaks and the specific belonging of brucella using polymerase chain reaction. Laboratory studies were carried out using serological and classical methods of PCR analysis. The object of the study was yak farms and private farmsteads engaged in breeding yaks from the Issyk-Kul and Naryn regions, which have extensive high-mountain pastures. Blood from yaks of different sex and age was taken from a vein with a disposable needle into a sterile vacuum system of the Vacutainer type. At the first stage, the presence of brucellosis infection in yaks was determined in the blood serum of animals using the rose-bengal test and enzyme-linked immunosorbent assay. Laboratory analysis of sera from 56 yaks indicated that in 14 cases they were infected with brucellosis. Clinical signs of disease manifestation during blood sampling did not appear. Then, positively reactive samples were examined by PCR to establish the type of Brucella. The results of laboratory tests showed that Br. Melitensis was found in the blood of infected yak, which indicated the ongoing migration of bacteria from small and large ruminants. The interspecific migration of brucella was facilitated by the joint keeping of yaks with large and small ruminants on the common territory of farms and private households. The joint (small ruminants, large ruminants, yaks) year-round use of pastures of high-mountain natural pastures from the Naryn and Issyk-Kul regions also played an important role in the spread of brucellosis and brucella species migration. Determination of Brucella species belonging to a particular animal species will help to develop an evidence-based plan for anti-epizootic measures against brucellosis and select specific means of prevention.

Keywords: brucellosis of yaks, typing, primers, DNA (deoxyribonucleic acid), enzyme immunoassay (ELISA), rose bengal test (RBT), polymerase chain reaction (PCR).

Введение. Среди инфекционных заболеваний бруцеллез представляет наибольшую опасность для здоровья человека. Болезнь, как правило, протекает в хронической форме, вызывает поражение суставов и раннюю потерю трудоспособности.

К бруцеллезу восприимчивы все виды сельскохозяйственных и многие виды диких животных. В Кыргызстане бруцеллез среди яков диагностирован в 1955 г. на территории внутреннего Тянь-Шаня Нарынской и Иссык-Кульской областей. Позже возбудитель бруцеллеза у яков был выявлен в южных регионах страны. Зараженность яков бруцеллезом в различных регионах не одинакова и колеблется от 1 до 60 %.

Как показывают наблюдения, наиболее опасным источником распространения бруцеллеза являются вагинальные и маточные выделения больных бруцеллезом якоматок. Они при родах инфицируют значительные участки пастбищ, являясь вторичным фактором передачи возбудителя бруцеллеза через травостой здоровым животным [1, 2].

Возбудитель бруцеллеза сельскохозяйственных животных относится к роду *Brucella*, который в свою очередь подразделяется на 6 видов:

Br. abortus, *Br. melitensis*, *Br. suis*, *Br. canis*, *Br. ovis*, *Br. neotomae*. К возбудителям *Br. abortus*, *Br. melitensis* и *Br. suis* восприимчивы все виды домашних и сельскохозяйственных животных. Следовательно, эти 2 вида представляют наибольшую опасность [4, 5]. Для человека опасность представляет *Br. melitensis* (овечий вид). При этом, как установлено исследователями, *Br. melitensis* может мигрировать от зараженных овец и коз к крупному рогатому скоту [6]. В яководческих хозяйствах Таджикистана были установлены факты межвидовой миграции бруцелл от крупного рогатого скота к якам, а также регистрировались случаи выделения культуры *Br. melitensis* [3]. Так, С.Б. Чегировым установлены факты миграции возбудителя *Br. melitensis* от мелкого рогатого скота к крупному рогатому скоту, при этом были определены биовары 1-2-3 возбудителя [7, 8]. В последние годы в яководческих хозяйствах Кыргызстана регистрируются частые случаи заражения бруцеллезом вида *Br. abortus*. При этом бруцеллез, вызванный видом *Br. melitensis*, среди яков не установлен.

Основную роль в противоэпизоотических мероприятиях по борьбе с бруцеллезом играет своевременное выявление фактов и путей меж-

видовой миграции возбудителя и определение видовой принадлежности возбудителя современными методами.

Цель исследования: изучение наличия межвидовой миграции возбудителя бруцеллеза среди яков и видовой принадлежности бруцелл с помощью полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось в Кыргызском научно-исследовательском институте ветеринарии, а также в Центре ветеринарной диагностики и экспертизы по северному региону. Исследования проведены с применением серологических методик – роз-бенгал теста (РБТ), иммуноферментного анализа (ИФА) COMPELIS Akit for the diagnosis of Brucellosis фирмы «APHASCIENTIFIC» и классического метода ПЦР. Постановку ПЦР анализа проводили согласно наставлению по диагностике бруцеллеза животных МСХ РФ от 29.09.2003 г. № 13-15-02/0850, а также с использованием ГОСТ КР 25385-91 «Животные сельскохозяйственные: методы диагностики бруцеллеза». В опыте было отобрано 56 яков разного пола, возраста из нескольких яководческих хозяйств Иссык-Кульской, Нарынской областей. От них были взяты образцы крови и исследованы лабораторно на наличие бруцеллезной инфекции.

Из 56 проб, исследованных серологическими методами, 14 проб сывороток крови яков реагировали положительно. Для выделения бруцелл были применены бактериологические методы исследований [4]. Для этого использовали пита-

тельные среды по культивированию на них бактерий. Положительные пробы крови засеивали на кровяной агар (по 5 мл), с добавленным антикоагулянтном в объеме 7 мл. Посевы выдерживали в термостате при температуре 36–37,5 °С. Инкубировали в присутствии 10–15 % CO₂ и в обычных атмосферных условиях. Рост культур обнаруживали в 8 пробах на 8-й день после засева. Биоматериалом для выделения возбудителя и постановки ПЦР использованы выраженные культуры. При постановке ПЦР для типизации бруцелл до вида экстрагировали нуклеиновую кислоту из выраженных культур бруцелл. В результате копирования ПЦР продукта дифференцировали типовую принадлежность бруцелл.

Для типизации возбудителя бруцеллеза использовали метод ПЦР с применением набора QIAGEN «DNeasy@Blood&TissueKit». При постановке ПЦР анализа применяли реагенты и реакционные смеси фирмы Promega, а также праймеры фирмы «ОДОпраймтех»: универсальный IS711 primer 5'-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3', *Br. melitensis* primer 5'-AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA-3', *Br. abortus* primer 5'-GACGAACGGAA TTTTCCAATCCC-3'. Для учета результатов в амплификации применяли 2 % агарозный гель на 1x TAE буфере с бромистым этидием в системе BIO-RAD GelDoc XRTM.

Результаты исследования. Результаты лабораторных исследований на зараженность яков бруцеллезом с применением серологических методик РБТ и ИФА приведены в таблице.

Наличие положительно реагирующих проб на бруцеллез в реакциях РБТ и ИФА

№ п/п	Возраст, лет	Идентификационный номер	РБТ		ИФА		ПЦР	
			проб	%	проб	%	проб	%
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	3	0397	–		–			
2	6	0373	–		–			
3	3	9960	+		+			
4	5	0295	–		–			
5	4	0350	+		+			
6	7	0447	+		+		+	
7	3	0291	–		–			
8	5	0329	–		–			
9	4	0303	+		+			
10	3	0293	+		+			
11	7	0306	–		–			
12	5	0346	–		–			
13	3	0290	–		–			
14	5	0365	+		+		+	

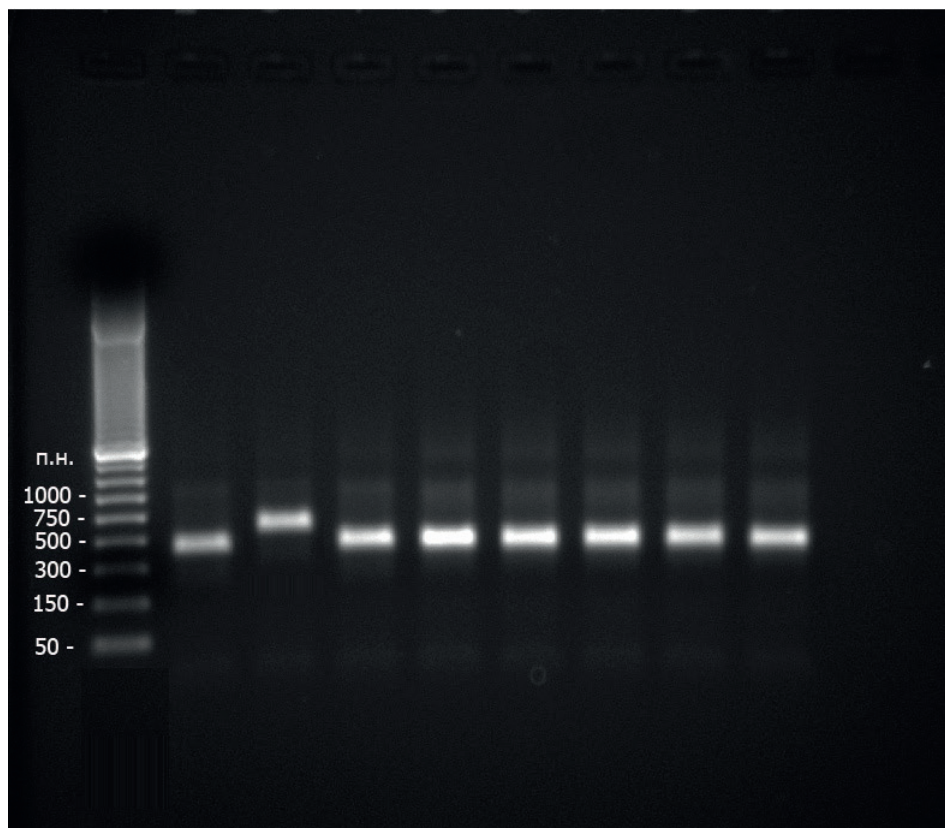
Окончание табл.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
15	7	0297	–		–			
16	6	0304	+		+		+	
17	5	0324	–		–			
18	8	0435	+		+		+	
19	7	0319	+		+		+	
20	6	0448	+		+		+	
21	9	0334	–		–			
22	6	0282	–		–			
23	7	0368	–		–			
24	8	0388	–		–			
25	4	9962	–		–			
26	9	0364	–		–			
27	6	0385	–		–			
28	3	0337	–		–			
29	6	0433	+		+		+	
30	5	–	+		+		+	
31	7	–	–		–			
32	6	0285	–		–			
33	4	–	–		–			
34	4	–	–		–			
35	6	–	–		–			
36	4	0331	–		–			
37	9	0325	–		–			
38	4	0413	–		–			
39	7	0323	+		+			
40	8	0398	+		+			
41	2	–	–		–			
42	1	–	–		–			
43	3	–	–		–			
44	2	0281	–		–			
45	2	0333	–		–			
46	2	–	–		–			
47	3	–	–		–			
48	1	0430	–		–			
49	1	0432	–		–			
50	6	0353	–		–			
51	1	–	–		–			
52	1	–	–		–			
53	2	–	–		–			
54	4	–	–		–			
55	1	–	–		–			
56	1	–	–		–			
Всего 56 проб			14	25	14	25	8	14

Как следует из данных таблицы, из 56 исследованных образцов сыворотки крови положительно на бруцеллез реагировали 14 проб, т. е. 25 % от числа исследованных. А в реакции ПЦР из 14 положительных проб только в 8 пробах выявлены бруцеллы, т. е. 14 % от общего числа исследованных проб. В среднем зараженность яководческих

ферм, где проводились наблюдения, была в пределах 10–15 %. В связи с отсутствием профилактических мероприятий зараженность яков бруцеллезом имеет тенденцию роста.

При типизации бруцелл ПЦР были обнаружены специфические полосы на уровне 498 п.н. и одна проба на уровне 731 п.н. (рис.).



Результаты амплификации образцов

В 2 % агарозном геле обнаружены фрагменты ДНК бактерии *Br. abortus* на уровне 498 п.н. и *Br. melitensis* на уровне 731 п.н.

В результате применения высокочувствительного ПЦР анализа было установлено, что бруцеллез у 7 исследованных яков был вызван возбудителем *Br. abortus* и у одного *Br. melitensis*. Лабораторные исследования и проведенные наблюдения показали, что миграция возбудителя *Br. melitensis* среди яков происходила в результате их контакта с инфицированным крупным и мелким рогатым скотом при совместном их содержании на общих естественных пастбищах.

Выводы. Результаты наблюдений и лабораторных исследований показали, что распространение бруцеллеза среди яков происходит в большинстве случаев во время случек и отела якоматок. Межвидовая миграция возбудителя

бруцеллеза вида *Br. melitensis* среди яков, овец и крупного рогатого скота происходит в результате совместного их содержания на сезонных естественных пастбищах. Немаловажное место в распространении бруцеллеза занимает заражение пастбищного травостоя аборт плодами инфицированных якоматок.

Проведенные лабораторные исследования подтвердили вероятность миграции бруцелл видов *Br. abortus* и *Br. melitensis* среди яков, о чем сообщалось другими исследователями. ПЦР диагностика по идентификации видов бруцелл является преобладающим методом установления путей миграции возбудителя бруцеллеза и выбора средств и методов мер борьбы с бруцеллезной инфекцией.

Литература

1. *Ким В.И.* Вклад кыргызских ученых в изучение бруцеллеза животных. Кара-Балта, 2004. С. 140–143.
2. *Беляков А.И.* Материалы по изучению бруцеллеза яков в Киргизской ССР: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук. Фрунзе, 1971. С. 5–7.
3. *Таранов В.А.* Материалы по изучению бруцеллеза сельскохозяйственных животных в Таджикистане за 20 лет и бактериологическая, сероаллергическая диагностика бруцеллеза у яков: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук. Фрунзе, 1971. С. 13–14.
4. *Триленко П.А.* Бруцеллез сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1976. С. 256–257.
5. *Скляр О.Д.* Молекулярные механизмы генотипирования патогенов // Сб. науч. тр. ВГНКИ. М., 2003. С. 64.
6. *Федоров Н.А., Суханов Ю.С., Асади Мобархан А.Х. и др.* Полимеразная цепная реакция (ПЦР): метод. пособие. М., 1996. С. 33.
7. *Жованик П.Н., Демченко А.В., Божко Г.К., Коротич А.С.* Бруцеллез. Киев: Урожай, 1975. С. 9.
8. *Чегиров С.Б.* Молекулярно-биологическая характеристика бруцеллы мелитензис и бруцеллы абортус в Кыргызстане: дис. ... канд. биол. наук: 06.02.02. Бишкек, 2015. С. 68–71.

Literatura

1. *Kim V.I.* Vklad kyrgyzskih uchenykh v izuchenie brucelleza zhivotnykh. Kara-Balta, 2004. S. 140–143.
2. *Belyakov A.I.* Materialy po izucheniyu brucelleza yakov v Kirgizskoy SSR: avtoref. dis. ... kand. veterinar. nauk. Frunze, 1971. S. 5–7.
3. *Taranov V.A.* Materialy po izucheniyu brucelleza sel'skohozyajstvennykh zhivotnykh v Tadzhikistane za 20 let i bakteriologicheskaya, seroallergicheskaya diagnostika brucelleza u yakov: avtoref. dis. ... kand. veterinar. nauk. Frunze, 1971. S. 13–14.
4. *Trilenko P.A.* Brucellez sel'skohozyajstvennykh zhivotnykh. M.: Kolos, 1976. S. 256–257.
5. *Sklyarov O.D.* Molekulyarnye mehanizmy genotipirovaniya patogenov // Sb. nauch. tr. VGNKI. M., 2003. S. 64.
6. *Fedorov N.A., Suhanov Yu.S., Asadi Mobarhan A.H. i dr.* Polimeraznaya cepnaya reakciya (PCR): metod. posobie. M., 1996. S. 33.
7. *Zhovanik P.N., Demchenko A.V., Bozhko G.K., Korotich A.S.* Brucellez. Kiev: Urozhaj, 1975. S. 9.
8. *Chegirov S.B.* Molekulyarno-biologicheskaya harakteristika brucelly melitenzis i brucelly abortus v Kyrgyzstane: dis. ... kand. biol. nauk: 06.02.02. Bishkek, 2015. S. 68–71.

