

На правах рукописи

Генджиев
Александр Ялмтаевич

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРИ ЛЕЙКОЗЕ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
В СИСТЕМЕ ОЗДОРОВИТЕЛЬНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ
СКОТОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВ КАЛМЫКИИ

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Ставрополь 2019

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет
им. Б.Б. Городовикова»

Научный руководитель: **Абакин Сергей Стефанович**
кандидат ветеринарных наук, доцент

Официальные оппоненты: **Смирнов Павел Николаевич**,
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Новосибирский государ-
ственный аграрный университет»,
заведующий кафедрой физиологии и
биохимии человека и животных

Красникова Екатерина Сергеевна,
доктор ветеринарных наук, доцент
ФГБОУ ВО «Саратовский государствен-
ный аграрный университет имени
Н.И. Вавилова», доцент кафедры
микробиологии, биотехнологии и химии

Ведущая организация: **Институт экспериментальной ветери-
нарии Сибири и Дальнего Востока
Федерального государственного бюд-
жетного учреждения науки «Сибир-
ский федеральный научный центр
агробиотехнологий Российской
академии наук»**

Защита состоится 05 апреля 2019 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертацион-
ного совета Д 220.062.02 при ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный
аграрный университет» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехниче-
ский, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Ставрополь-
ский государственный аграрный университет» и на официальном сайте орга-
низации www.stgau.ru

Автореферат разослан _____ 2019 г. и размещен на сайтах: ВАК Ми-
нистерства образования и науки РФ <http://www.vak.ed.gov.ru>. _____,
ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ» <http://www.stgau.ru> _____

Ученый секретарь
диссертационного совета

Дьяченко Юлия Васильевна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы и степень ее разработанности

От полноценного производства мяса, молока и другой продукции животноводства и растениеводства зависит продовольственная безопасность населения в нашей стране. Основным показателем эффективности животноводческого производства является увеличение объема качественной экологически чистой продукции, снижение затрат на ее производство. Добиться этого можно за счет роста продуктивности и накопления массива здоровых животных, за счет снижения заболеваемости животных от различных болезней, в том числе и от лейкоза крупного рогатого скота (М.И. Гулюкин, 2017; М.А. Амироков, 2011).

Сегодня все больше внимание отводится вопросу здорового питания, что предполагает использование в составе ежедневного рациона безопасных в экологическом отношении продуктов, в частности таких незаменимых, как молоко и мясо. Вступление России в ВТО значительно ужесточило требования, предъявляемые к качеству производимой продукции. В связи с этим особо актуальной проблемой стало выращивание здорового молодняка сельскохозяйственных животных, что в свою очередь невозможно без качественной профилактики, ранней диагностики и лечения особо опасных инфекционных заболеваний (А.Ф. Валихов, 1977; И.М. Донник и др., 2000; Г. А.Симонян, 2007; П.Н. Смирнов, 2007; Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева, 2008; Н.В. Ковалюк, 2008; М.И. Гулюкин, 2015).

Одно из главных мест среди болезней сельскохозяйственных животных занимает лейкоз. Болезнь поражает многие виды животных, но имеет особое значение для крупного рогатого скота (КРС). Лейкоз не только приводит к гибели и преждевременной выбраковке животных, но и ставит под угрозу развитие племенных хозяйств, ведение селекционной работы, использование продуктов животноводства (С.С. Абакин, 1991; М.И. Гулюкин, 2005; М.А. Амироков, 2011).

Один из наиболее острых вопросов, связанных с вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), — возможность заражения человека данным вирусом и последствия при заражении. В ряде проведенных исследований было обнаружено наличие в крови человека антител к структурным белкам ВЛКРС. В этих исследованиях использовали РСК и РИД. Исследования, проведенные на выборке здоровых людей, контактирующих с коровами (254 человека), с использованием более чувствительных методов — ИФА и иммуноблоттинг, показали в 74 % случаев присутствие специфических антител к вирусу лейкоза (А.Н. Федоров, 1995; R. Felmer, 2005; Н.В. Грачева, 2010, G.C. Buehring, 2014).

Заболевание наносит сельскохозяйственным предприятиям различных форм собственности, в том числе племенным, большой экономический ущерб, состоящий из вынужденного убоя животных, потери племенного молодняка, утраты генфонда высокопродуктивных животных, запрета племенной продажи, преждевременной выбраковки коров и быков-производителей, нарушения воспроизводительной функции больных коров, ограничения племенной работы и хозяйственной деятельности в связи с неблагополучием (Л.М. Сургучева, 2012; Ю.Г. Боев, 2015; М.И. Гулюкин, 2015).

Несмотря на принимаемые меры, проблема ликвидации лейкоза продолжает оставаться актуальной. Радикальные меры борьбы с заболеванием, применяемые в ряде зарубежных стран и заключающиеся в полной единовременной замене стада, в условиях нашей страны экономически не обеспечены (М.И. Гулюкин, 2015; А.В. Высочин, 2011; П.Н.Смирнов 2010).

Возможность определения генетического разнообразия циркулирующих вирусов и первичной структуры вируса лейкоза из разных регионов дает возможность оценки и установления их филогенетического родства, слежения эволюционного развития (Н.И. Петров, 2001; Н.А. Мальцева с соавт., 2002; Г. А. Симонян, 2007, 2015; П.Н.Смирнов с соавт., 2007; М.И. Гулюкин, 2008, 2009, 2015; И.М. Донник с соавт., 2000, 2008, 2010).

За последние двадцать лет подходы, выстраиваемые исключительно на молекулярно-генетических принципах идентификации возбудителя к таксономической классификации ВЛКРС, претерпели значительные изменения, начиная от различных стратегий типизации, основанных на интерпретации генерируемых ПЦР-ПДРФ-профилей, заканчивая современной оценкой генотипического разнообразия BLV на основе филогенетического анализа локуса *pol*-гена (Т.А. Гаврилова, 2005; П.Н. Смирнов, 2007; М.И. Гулюкин, А.Ф. Валихов, В.М. Нахмансон, Л.А. Иванова, К.П. Грек, С.В. Лопунов, 2008; И.М. Донник, 2000, 2010; Г.А. Симонян, 2015).

Важная задача, стоящая перед исследователями, это выявление патогенного агента с помощью генотипирования и проведения филогенетического анализа ВЛКРС.

В настоящее время представляется необходимым исследовать эпизоотию лейкоза в конкретном субрегионе. Ещё важнее выяснить причины значительного распространения, длительного неблагополучия, чтобы прогнозировать её изменения в будущем. Если настоящее является закономерным проявлением прошлого, то прогнозировать будущее можно на основе анализа прошлого и настоящего (М.И. Гулюкин 2002; И.М. Донник, 2008).

Недостаточная изученность эпизоотической ситуации по лейкозу в ряде регионов Российской Федерации и необходимость в совершенствовании системы противоэпизоотического обеспечения животноводства с целью снижения риска биологической опасности и экономического ущерба определили актуальность нашего исследования и обусловили выбор темы «Молекулярно-генетический контроль при лейкозе крупного рогатого скота в системе оздоровительных мероприятий скотоводческих хозяйств Калмыкии».

Цель исследований

Изучить роль и результативность иммунологических и молекулярно-генетических методов контроля для идентификации возбудителя лейкоза крупного рогатого скота при проведении комплекса противоэпизоотических мероприятий в мясном скотоводстве Республики Калмыкия.

Задачи исследований

1. Провести ретроспективный анализ и дать характеристику нынешней эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в скотоводческих хозяйствах Республики Калмыкия.

2. Изучить полиморфизм изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на территории Республики Калмыкия, провести филогенетический анализ на основе гена *pol* ВЛКРС.

3. Провести молекулярный метод детекции провирусной ДНК-BLV в иксодовых клещах, как фактора риска распространения инфекции.

4. Разработать и внедрить систему оздоровительных мероприятий, обеспечивающую благополучие популяции крупного рогатого скота от лейкоза в хозяйствах Республики Калмыкия.

Методологической основой решения поставленных задач служила эпизоотологическая диагностика, сущность которой заключалась в комплексной оценке эпизоотической ситуации и причинно-следственных связей, обуславливающих массовое проявление болезни. Методической основой планирования и осуществления профилактических, противоэпизоотических мероприятий и перспективного прогнозирования являлся анализ и оценка факторов риска с учетом популяционных, территориальных и временных границ проявления инфекционного процесса.

Объект исследований

Особенности проявления эпизоотологического процесса при лейкозе крупного рогатого скота в мясном скотоводстве Республики Калмыкия.

Предметом рассматриваемой темы являются результаты эпизоотологических наблюдений, обследований распространенности лейкоза и производственные опыты, характеризующие эпизоотический процесс по всему лейкозоологическому профилю болезни крупного рогатого скота в республике.

Гипотеза исследований

Повышение эффективности противолейкозных мероприятий в скотоводстве может быть достигнуто за счет совершенствования технологии воспроизводства стада и выращивания молодняка, путем использования репродуктивного потенциала интактных животных. Выявление источников возбудителя и движущих сил эпизоотического процесса непосредственно в хозяйствах позволит качественно повысить уровень противоэпизоотических мероприятий.

Научная новизна работы

Впервые установлено распространение ВЛКРС среди скота мясной продуктивности, который ранее считался невосприимчивым к лейкозу. Установлена степень распространения лейкозной инфекции. Установлены причины возникновения, широкого распространения и длительного неблагополучия инфекции в мясном скотоводстве. Осуществлен комплексный подход к усовершенствованию и внедрению оздоровительных методов против лейкоза крупного рогатого скота в мясном скотоводстве Республики Калмыкия.

Впервые проведена амплификация целевого участка гена *pol* ВЛКРС методом секвенирования с использованием праймеров PF2-PR2. Выделены участки ДНК изолятов провируса ВЛКРС и дана их характеристика. Проведён анализ филогенетических отношений полученных изолятов провируса ВЛКРС, выделенных на территории Республики Калмыкия с изолятами других стран и регионов России. Изучена биологическая характеристика разводимого скота в республике.

Определены территориальные границы уровня инфицированности ВЛКРС в Республике Калмыкия. Установлены различия по уровню инфицированности вирусом лейкоза КРС в естественных условиях, в зависимости от породы.

Впервые методом флюоресцентной гибридизации в режиме «реального времени» проведена детекция провирусной ДНК ВLV в иксодовых клещах. Установлена провирусная ДНК ВLV в иксодовых клещах, снятых с инфицированных и здоровых животных. Впервые установлен неспецифический фактор трансмиссивного пути передачи вируса ЛКРС иксодовыми клещами. Проведен сравнительный анализ серологического и молекулярного методов диагностики в определении носителей ВЛКРС и высокая чувствительность ПЦР анализа.

Разработана и внедрена в производство схема ветеринарно-профилактических мероприятий с научным обоснованием, которая обеспечивает

оздоровление хозяйств Республики Калмыкия независимо от первоначального уровня пораженности животных вирусом лейкоза крупного рогатого скота.

Практическая значимость

В условиях круглогодичного пастбищного содержания в мясном скотоводстве впервые проведен комплекс мероприятий по исследованию лейкоза крупного рогатого скота. Проведен анализ диагностических исследований в республике, где серологическим методом исследовано 2840901 голов и выявлено 62290 реагирующих в РИД животных. Гематологическим методом исследовано 280036 голов КРС и обнаружено 7026 больных животных. Впервые установлено, что ВЛКРС имеет значительное распространение среди скота мясной продуктивности (процент больных животных в племенных хозяйствах достигал 7%), ранее считавшихся невосприимчивыми к этой инфекции. Разработан усовершенствованный метод борьбы с лейкозом крупного рогатого скота, обусловленный особенностями вольно-выгульного содержания животных. Установлено, что эпизоотологический мониторинг и анализ являются определяющим моментом в прогнозировании эпизоотического процесса при лейкозе крупного рогатого скота, позволяющие своевременно планировать и проводить с высокой эффективностью ветеринарно-санитарные мероприятия, направленные на борьбу с лейкозом. Была полностью ликвидирована лейкозная инфекция в оздоравливаемых хозяйствах. Устранен экономический ущерб, возникающий при вынужденном убою и утилизации туш больных животных, преждевременной выбраковке коров и быков-производителей, нарушении воспроизводительной функции больных коров, потерей племенного молодняка и ограничением племенной работы и хозяйственной деятельности в связи с неблагополучием. Исключена для населения социальная опасность от продукции, инфицированной вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Установлена возможность трансмиссивного пути передачи ВЛКРС при инфестации животных клещами, и в систему противолейкозных мероприятий включен комплекс мер по деакаризации животных и помещений.

Научные разработки «Методические рекомендации по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота в мясном скотоводстве» (2011 г.) и «Методические рекомендации по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота в мясном скотоводстве Республики Калмыкия» (2018) были внедрены в производственную деятельность ветеринарных учреждений и хозяйств разных форм собственности во всех административных районах республики. Результаты исследований используются также в учебном процессе при подготовке специалистов по специальности: «Ветеринария», «Зоотехния», «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» аграрного факультета ФГБОУ ВО «КалмГУ им. Б.Б. Городовикова».

Положения диссертации, выносимые на защиту

Эпизоотологический анализ лейкоза крупного рогатого скота в Республике Калмыкия свидетельствует о широком распространении заболевания и длительном неблагополучии хозяйств.

Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на территории Республики Калмыкия, позволило выявить особенности его молекулярно-генетической структуры на основе гена *rol* ВЛКРС и детектировать провирусную ДНК-BLV в иксодовых клещах.

Внедрение в производство системы оздоровительных мероприятий способствует полному освобождению от лейкоза крупного рогатого скота всех племенных хозяйств и снижению превалентности инфекции в Республике Калмыкия.

Апробация результатов исследований

Основные положения диссертационной работы доложены и одобрены на заседаниях Республиканской ветеринарной лаборатории (1995-2001), кафедры «Зоотехния» аграрного факультета ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова» (2002-2017), Ученого совета аграрного факультета ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова» (2003-2017), Управления ветеринарии Министерства сельского хозяйства Республики Калмыкия (2005-2017), учебно-производственного центра «БИО-ВЕТ» ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова» (2011-2017). На конференциях: Международная научно-практическая конференция, посвященная 75-летию Ставропольского Аграрного университета, «Актуальные проблемы ветеринарного акушерства, гинекологии и биотехники размножения животных», Ставрополь, 2007; Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы развития агропромышленного комплекса Юга России», Элиста, 2008; Международная научно-практическая конференция «Инновационные пути развития животноводства», Нижний Архыз, 2009; III Международная научно-практическая конференция «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения», Ульяновск, 2011; Российско-Казахстанская международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы социально-экономического развития Прикаспийского региона в условиях инновационной экономики», Элиста, 2012; II Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы и перспективы развития сельскохозяйственных наук», Омск, 2015.

Внедрение результатов исследований

Разработанные нами методики были использованы при проведении оздоровительных мероприятий в животноводческих предприятиях Республики Калмыкия, вследствие которых отмечается положительная динамика сокращения количества неблагополучных по ВЛКРС ферм и снижение уровня инфицированности животных.

Результаты научных исследований по оптимизации работы комплексной системы по ликвидации лейкоза крупного рогатого скота, прошедшей проверку на практике в сельскохозяйственных организациях, крестьянско-фермерских и личных подсобных хозяйствах республики, утверждены на региональном и федеральном уровнях, использованы в методической литературе.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является результатом тринадцатилетних исследований автора. Представленные в диссертации экспериментальные исследования и разработки, теоретический и практический анализ полученных результатов проведены диссертантом самостоятельно. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 90%.

Публикации результатов исследований

Основные результаты исследований опубликованы в 8 научных работах, в том числе 5 – в ведущих рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень ВАК РФ, 1 статья в базе данных SCOPUS «Biology and Medicine» Volume 6, Issue 4, Article ID:BM-055-14, 2014, Indexed by Scopus (Elsevier), одном учебном пособии, одной рекомендации. Материалы диссертационной работы опубликованы в цен-

тральных специализированных журналах страны: «Ветеринарная патология», «Актуальные вопросы ветеринарии», «Ветеринарная медицина», «Российский ветеринарный журнал», «Ветеринария Кубани», а также в материалах международных научно-практических конференциях и в других изданиях.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 154 страницах компьютерного текста, включает 28 таблиц, 14 рисунков и схем, состоит из введения, обзора литературы, материала и методики исследований, результатов собственных исследований, анализа полученных результатов, выводов, практических предложений производству, списка использованной литературы, включающего 243 источника, в том числе 70 иностранных авторов, приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе приведены данные об эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в России и за рубежом, особенностях проявления эпизоотологического процесса, формах клинического проявления, современных направлениях в диагностике и профилактике инфекции.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методика исследований

Настоящая работа выполнялась в учебно-производственном центре «БиоВет» ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова» (2011-2016), а также казенном учреждении Республики Калмыкия "Республиканская ветеринарная лаборатория" в 2004-2016 гг., в лаборатории по изучению лейкозов Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ) РАСХН в рамках Российской НТП.

При изучении эпизоотической ситуации руководствовались развернутым планом эпизоотологического обследования, представленного в «Методических рекомендациях по эпизоотологическому исследованию при лейкозе крупного рогатого скота», Москва, 2001 г.

При обработке ветеринарной документации, представленной Управлением ветеринарии Республики Калмыкия, изучалась эпизоотическая обстановка по инфекционным заболеваниям крупного рогатого скота. Исходным материалом служила отчетная документация: Форма № 1-ВЕТ Сведения о заразных болезнях животных; Форма № 1-ВЕТ А Сведения о противоэпизоотических мероприятиях; Форма № 4-ВЕТ Сведения о работе ветеринарных лабораторий; Форма № 5-ВЕТ Сведения о ветеринарно-санитарной экспертизе сырья и продуктов животного происхождения.

Объекты исследования: крупный рогатый скот, пробы крови, сыворотки крови и лейкоконцентрат из крови животных, а также образцы ДНК - участка гена *rol*.

Лабораторные диагностические исследования крови, сыворотки крови животных в РИД, ИФА, ПЦР проведены согласно «Методических указаний по диагностике лейкоза крупного рогатого скота», утвержденных Департаментом ветеринарии МСХ РФ от 23.08.2000г.

Гематологические исследования: подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов, выведение лейкоформулы проведены по общепринятым методикам [7].

Серологические исследования проведены при помощи набора реагентов для постановки РИД в агаровом геле (производитель ФГУП «Курская биофабрика – фирма “Биок”); постановка ИФА – тест-системой производства НПО «Нарвак». Учет реакции – на иммуноферментном анализаторе АИФР-01 Униплан с последующим вычислением коэффициента.

Эпизоотологический мониторинг и анализ проводили, обобщая результаты серологических, гематологических, молекулярно-генетических исследований, выполненных в 13-ти административных районах Республики Калмыкия. Глубина ретроспективного анализа 13 лет (2004-2016).

При разработке и реализации оздоровительных мероприятий по лейкозу опирались на действующие «Правила по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота» (МСХ и продовольствия РФ, 1999), «Методические рекомендации по эпизоотическому исследованию при лейкозе крупного рогатого скота» (2001), с учетом полученных нами эпизоотологических данных и результатов лабораторных исследований. Одновременно были внедрены усовершенствованные методы борьбы с этой нозологией, связанные с технологическими особенностями содержания животных.

Исследование полиморфизма изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота было проведено на базе лаборатории ГНУ ВИЭВ (г. Москва) в рамках выполнения проекта по государственному контракту с Министерством образования и науки РФ от 29 апреля 2011 г. N16.M04.11.0018 по теме: «Разработка препаратов и тест-систем для диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота». При изучении полиморфизма изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующих в хозяйствах Городовиковского района Республики Калмыкия, был применен метод секвенирования и проведен филогенетический анализ на основе гена *pol* ВЛКРС. Для этого использовали 90 образцов провирусной ДНК, выделенных из цельной крови коров в возрасте старше 5 лет из хозяйств Городовиковского района Республики Калмыкия.

На начальном этапе пробы крови исследовали в РИД, ИФА и ПЦР. Экстракцию ДНК из 100 мкл цельной крови проводили с помощью коммерческих наборов реагентов отечественного производства по инструкции производителя. Элюировали ДНК в 50 мкл ТЕ-буфера. Для амплификации и секвенирования участка гена *pol* ВЛКРС использовали разработанные праймеры PF2/PR2. ПЦР проводили на матрице ДНК ВЛКРС в программируемом термоциклере «Терцик» в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл ДНК пробы, 5 мкл буфера ПЦР, 3Мм MgCl₂, 10 Мм каждого Днтф, по 10 пмоль каждого праймера, 5 ед. полимеразы Таq, бидистиллированную воду. Для прохождения реакции амплификации искомого участка ДНК использовали следующие параметры: начальная денатурация ДНК при 95°C – 3 мин; затем 35 циклов: 94°C – 20 с, 62°C – 30 с, 72°C – 1 мин; 72°C – 3 мин. Детекцию продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в объеме 15 мкл, содержащем 2,5 мкл раствора бромистого этидия. Результаты электрофореза регистрировали с помощью системы гельдокументирования PowerShotA510 и заносили в базу данных. Нуклеотидные последовательности, полученные в результате секвенирования, были идентифицированы в базах данных GenBank с помощью сервиса BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Филогенетический анализ выполняли с помощью программы Mega 3.1. Дендрограммы были построены дистанционными методами присоединения соседей NJ (neighbor-joiningmethod, SaitouandNei, 1987), минимума эволюции ME (minimumevolution,

Cavalli-Sforza and Edwards, 1967, Saitou and Imanishi, 1989, Rzhetsky and Nei, 1993) с использованием р-дистанций. Статистическую достоверность топологии филогенетического древа оценивали с помощью метода бутстрэп-анализа при количестве случайных выборок 100 и 1000. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности гена *pol* изолятов ВЛКРС, представленные в БД GenBank.

На базе молекулярно-генетической лаборатории Центра коллективного пользования ФГБОУ ВПО «КалмГУ» были проведены детекции провирусной ДНК лейкоза КРС. При исследовании клещей выделение ДНК из тканей проводили с использованием набора «Ампли Прайм ДНК-сорб-В». Для амплификации участка ДНК провируса ВЛКРС использовали тест-систему ПЦР – комплект реагентов вариант FRT – 50 F (изготовитель ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). ПЦР-амплификацию и детекцию продуктов амплификации проводили с использованием приборов «Real-time», «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия). При анализе результатов амплификации специфического участка ДНК провируса лейкоза КРС (*Bovine leukosis virus*) использовали программу JOE/YellowRotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67).

Объем проведенных исследований

Вид исследований	Объект исследования	Ко-во исследований
ПЦР	кр. рог. скот	1250
РИД	кр. рог. скот	1450
ИФА	кр. рог. скот	1450
Гемисследования	кр. рог. скот	850
Молекулярно-генетические исследования	кр. рог. скот	92
Детекция провирусной ДНК-BLV	В иксодовых клещах	186

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Характеристика условий проведения исследований

В последние годы в республике наблюдается заметное увеличение численности поголовья крупного рогатого скота. Самая низкая численность поголовья – 197,2 тыс. голов за период исследований, отмечается в 2004 году.

Движение поголовья крупного рогатого скота в хозяйствах всех категорий собственности по республике представлено в таблице 1.

Таблица 1. Поголовье скота в хозяйствах всех категорий собственности, тыс. голов

Годы	Всего голов	В том числе коровы
2004	197,2	88,0
2005	205,9	93,7
2006	234,8	107,7
2007	313,0	146,3
2008	368,8	177,5
2009	332,4	168,1
2010	434,5	256,7
2011	496,9	311,7
2012	577,2	377,7
2013	589,6	392,7
2014	535,9	373,7

2015	499,3	355,4
2016	475,5	337,3

Республику можно отнести к региону развитого мясного скотоводства, которому предстоит сыграть важную роль в возрождении и создании специализированной отрасли мясного скотоводства России, поэтому сохранение эпизоотического благополучия поголовья по инфекционным заболеваниям имеет существенное значение.

Поголовье крупного рогатого скота в Калмыкии на 01.01.2016г. составляло 475,5 тыс. голов. Племенное поголовье калмыцкого скота составляет 78,3 тыс. голов, из них коров – 38,7 тыс. голов.

3.2. Мониторинг распространенности лейкоза крупного рогатого скота в скотоводческих хозяйствах Республики Калмыкия

Проведен анализ проявления лейкозной инфекции на протяжении более 10 лет (2004-2016гг.). Дана оценка изменений эпизоотической ситуации и сделан прогноз развития эпизоотического процесса. Временная характеристика эпизоотического процесса соответствует периоду, когда в республике проводилась масштабная работа по охвату серологическими исследованиями поголовья животных в хозяйствах всех категорий и проведению анализа распространения лейкозной инфекции, т.е. созданию реальной картины распространения инфекции. Действующие на тот момент «Правила по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота» (1999), кроме организационно-хозяйственных мероприятий включали оздоровительные мероприятия, заключающиеся в разделении животных на две группы – серопозитивных и серонегативных, изолированном их содержании и сдачу на убой больных животных. В этот же период стала внедряться разработанная нами система мероприятий по борьбе с лейкозом КРС, система учета и анализа проводимых мероприятий.

3.2.1. Эпизоотическая обстановка по лейкозу крупного рогатого скота в сельскохозяйственных организациях и в личных подсобных хозяйствах региона

С целью проведения сравнительного анализа эпизоотического процесса по лейкозу крупного рогатого скота в сельскохозяйственных организациях и в личных подсобных хозяйствах районов республики были сопоставлены показатели распространенности лейкоза крупного рогатого скота в данных категориях хозяйств за период 2005-2016 гг.

При этом в данные диагностики личных подсобных хозяйств, включали результаты обследования крестьянских фермерских хозяйств (КФХ) и индивидуальных предпринимателей (ЛПХ).

В Республике Калмыкия в состав агропромышленного комплекса в настоящее время входят 116 сельскохозяйственных организаций, 3423 фермерских хозяйства и более 60 тысяч личных подсобных хозяйств, которые осуществляют производство сельскохозяйственной продукции. В общем количестве производства сельскохозяйственной продукции доля крестьянских фермерских хозяйств и личных подсобных хозяйств составляет более 60 процентов, многие из них являются крупнотоварными, ориентированными на производство и реализацию продукции за пределы республики.

Всего за 12 анализируемых лет было подвергнуто серологическим (РИД) исследованиям 2048057 голов крупного рогатого скота. Из исследуемого поголовья

реагировали положительно 22736 голов. Средний процент превалентности инфекции по республике за период с 2005 по 2016 гг. составил 2,54%. При этом средний процент превалентности инфекции за период с 2010 по 2016 гг. снизился по сравнению с периодом с 2005 по 2009 гг. в 2,34 раза. Однако за усредненными данными скрывается сложная ситуация в Городовиковском районе, где среднее значение превалентности инфекции в стадах за 2005-2016 гг. составляет 18,32%.

Вместе с тем следует отметить положительные тенденции, сложившиеся в этом районе. Процент превалентности инфекции там снижен в 1,33 раза и составил на период с 2010 по 2016 гг. 12,86%.

В целом, полученные данные свидетельствуют о снижении уровня распространения лейкозной инфекции на большей части территории республики. Так, в Яшкульском, Яшалтинском, Кетченеровском, Юстинском и Сарпинском районах превалентность инфекции в стадах снизилась в 46,0; 35,5; 22,0; 18,14 и 15,0 раза соответственно. В Ики-Бурульском, Лаганском, Черноземельском, Октябрьском, Приютненском, Целинном, Малодербетовском районах распространенность инфекции снизилась в 4-10 раз.

По показателям 2016 года и сложившейся эпизоотической ситуации нами составлена карта, характеризующая благополучие районов республики по лейкозной инфекции, из которой видно, что единственным очагом, где регистрируется процент превалентности инфекции выше 10-30%, является Городовиковский район. На территории двух районов еще встречаются хозяйства, где регистрируется инфицированность до 10%, а в 10 районах республики отмечается благополучие по лейкозной инфекции.

3.3. Эпизоотологическая диагностика и факторы риска лейкоза крупного рогатого скота на период 2004- 2016 гг.

В процессе проведенной работы нами установлено, что в условиях длительного неблагополучия хозяйств республики, факторами риска являются:

- Инфицированный и гематологически больной скот;
- Использование репродуктивного потенциала животных инфицированных вирусом лейкоза, а, в некоторых случаях, коров с клинико-гематологической формой проявления болезни;
- Естественное осеменение животных быками-производителями, без подтверждения благополучия по вирусной инфекции;
- Пренатальное и раннее постнатальное инфицирование потомства коров с различным уровнем компрометации по лейкозу;
- Хозяйственное использование потомства инфицированных и больных лейкозом животных;
- Трансплацентарная передача вируса и заражение на раннем этапе постнатального онтогенеза, что способствует развитию иммунологической толерантности (ареактивности);
- Присутствие провирусной ДНК BLV (*Bovine leucosis virus*) в иксодовых клещах как фактор трансмиссивного пути передачи ВЛКРС.

Установленные в процессе исследований причины развития лейкозного процесса, подбор наиболее эффективных оздоровительных мероприятий, легли в основу разработанных нами методических рекомендаций, куда включена оценка временного эпизоотического периода за 13 лет – с 2004 по 2016 гг., и пространственного (в разрезе районов республики).

Показатели эпизоотического процесса лейкоза крупного рогатого скота в Республике Калмыкия на период с 2004 по 2016 гг. представлены в таблице 2.

Таблица 2. Показатели эпизоотического процесса периода исследований (2004-2016 гг.)

Годы	% охвата в РИД	РИД +	Пораженность	% охвата гем. исслед.	Гем. +	Заболееваемость
2004	47,14	2926	3,19	39,62	352	0,40
2005	53,34	3149	2,88	38,85	350	0,37
2006	49,14	2476	2,16	40,48	134	0,12
2007	47,53	2302	1,56	36,83	253	0,17
2008	85,40	2227	0,71	49,25	68	0,04
2009	107,3	2910	0,87	64,50	150	0,09
2010	97,01	2403	0,57	143,4	839	0,33
2011	81,52	2438	0,59	48,48	322	0,10
2012	77,17	2833	0,60	61,77	311	0,08
2013	78,12	1799	0,39	74,26	78	0,02
2014	84,78	1100	0,24	85,45	21	0,01
2015	112,3	945	0,17	94,2	38	0,42
2016	101,6	650	0,13	113,8	16	0,08
Средняя за 13 лет	78,64	2 166	1,08	57,44	323,2	0,03
Темп прироста, %	60,6	-51,9	-92,9	142	-88,3	-98,2

Данные таблицы 2 свидетельствуют о снижении напряженности эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота. Если в 2004-2005 гг. пораженности поголовья инфекцией отмечалось в 3,19 и 2,88%, то к концу периода исследований (2015-2016 гг.) отмечается 0,17% и 0,13% соответственно, что в 18,7 раза меньше начального периода исследований. За весь период исследований средний показатель превалентности лейкоза среди крупного рогатого скота республики составил 1,08%. Заболеваемость в начале периода исследований (2004 г.) была в пределах 0,40%, тогда как к 2016 году снижена до 0,08%. Таким образом, уровень заболеваемости в популяции животных снизился в 5 раз.

При увеличении выходного поголовья в хозяйствах республики (от 197200 голов в 2004 году до 475500 голов в 2016 году), темп прироста охвата поголовья исследованиями поднялся до 60,6% за счет количества серологических исследований (от 92590 голов в 2004 году до 484000 голов в 2016 году), при этом число исследованных животных к 2016 году возросло более чем в 5,2 раза.

Средний показатель охвата поголовья серологическими исследованиями за тринадцатилетний период составляет 78,64%, с темпом прироста за последние годы до 142%.

Всего за период наблюдений (2004-2016 гг.) было исследовано 2473508 голов крупного рогатого скота и выявлено 39258 голов сероположительных животных, что говорит о значительном распространении лейкозной инфекции.

При этом следует отметить, что при возрастающем количестве поголовья крупного рогатого скота в республике и усилении проводимых противоэпизооти-

ческих мероприятий в районах по выявлению и выведению из популяции серопозитивных животных, количество гематологически больных животных остается примерно на одном уровне. При отрицательном темпе прироста больных животных в стадах (-88,3%) средний показатель регистрируемых заболевших животных за период 2004-2016 гг. оставался в пределах 323 голов.

Таким образом, независимо от степени инфицированности, выведение из стада положительно реагирующих в реакции иммунодиффузии коров имеет большое значение в скотоводстве республики. Следовательно, разрыв звеньев эпизоотического процесса влечет за собой локализацию распространения инфекции и снижение пораженности стада.

3.4. Риски возникновения и распространения лейкоза в скотоводческих хозяйствах Республики Калмыкия

Начиная с 50-х годов прошлого столетия в страну активно завозился из стран западной Европы крупный рогатый скот, зачастую из неблагополучных по лейкозу прибалтийских республик. Замена аборигенных пород скота завозимыми высокопродуктивными животными и отсутствие на тот период эффективных методов диагностики привели к широкому распространению инфекции в масштабах всей страны. В хозяйствах Калмыцкой АССР на 1982 год общее поголовье крупного рогатого скота в общественном животноводстве составляло 285471 голов, в том числе маточное поголовье - 88992 головы. Из них в хозяйствах республики разводят скот следующих пород: калмыцкой (225987, коров 71744), черно-пестрой (1442, коров 547), красной степной (59664 и 17248), симментальской (311 и 110). Только в 1981 году в республику было завезено из Ставропольского края 1151 голов скота красной степной породы, из Краснодарского края 119 телок и 10 быков производителей. Из Ростовской области было завезено 479 коров и 46 быков производителей красной степной породы и 215 коров калмыцкой породы. Из Пензенской области в том же году завезли 434 коров черно-пестрой породы. Из Московской области 5 быков- производителей черно-пестрой породы и Омской области 50 голов телок красной степной породы. При завозе скота на тот период не применялся гематологический метод диагностики на лейкоз, а серологическая диагностика еще не была разработана. Закупленное поголовье распределялось по следующим районам: Целинный, Городовиковский, Яшкульский, Яшалтинский, Приютненский, Лаганский, Сарпинский, где и была в последующие годы зафиксирована высокая инфицированность скота лейкозом. В тех же хозяйствах, куда не было завезено инфицированное поголовье, животные оставались здоровыми. Очевидно, что источником инфекции для местных животных явился завозимый скот.

3.5. Значение комплексной диагностики при оздоровлении хозяйств Калмыкии от лейкоза крупного рогатого скота

Для сравнения эффективности двух методов серологической диагностики нами проведено параллельное тестирование животных в РИД и ИФА. Результаты исследований показали, что иммуноферментный анализ позволяет выделять дополнительно до 10 – 12 % инфицированных ВЛ животных, что является существенным при искоренении вирусной инфекции.

Анализируя результаты серологических (РИД) исследований с учетом возраста и пола крупного рогатого скота выявили своеобразную зависимость. Так, из общего количества обследованных в РИД животных – 151593 головы, положи-

тельно реагировали 2227 голов, показатель инфицированности составил 98,3%, телок и нетелей - 1,1%, быков и бычков - 0,4%. При этом удельный вес инфицированных коров и нетелей в возрасте 2-4 года составил 28,1 %, а коров 4-6 лет – 70,2%, что на 42,1% больше, чем у нетелей и коров.

Таким образом, возрастная закономерность проявления лейкоза характеризуется тем, что коровы до 4-х лет являются животными повышенной группы риска, а у телят до 2-х лет при условии пренатального или постнатального заражения отмечается иммунологическая толерантность. В случае, если телята не инфицированы, то они проявляют устойчивость к заражению.

Гематологическому исследованию подвергаются животные с двух лет и старше, положительно реагирующие в диагностической тест-системе РИД, ИФА и ПЦР.

Выявление гематологически больных лейкозом животных с последующим удалением их из стада при ликвидации данного заболевания показало свою слабую эффективность, т.к. через короткие промежутки времени вновь появлялись животные с изменениями крови, характерными для лейкоза.

Рекомендованные нами оздоровительные мероприятия по лейкозу КРС в республике имеют особенность в связи с технологией разведения животных, когда теленок находится с матерью (подсосный период) на протяжении 7-9 месяцев на пастбище. При такой технологии содержания животных, эпизоотический процесс лейкоза крупного рогатого скота закономерно поддерживается за счет передачи возбудителя больными и инфицированными коровами своему приплоду, т.е. обеспечивается эстафетная передача возбудителя инфекции. Это значит, что возбудитель этой болезни передаётся, преимущественно, вертикальным путём, что объясняет причины стабильного неблагополучия по лейкозу крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах республики.

Следует отметить также, что если неблагополучной по этому заболеванию является племенная ферма, то степень распространения инфекции значительно увеличивается в связи с реализацией племенных животных.

Анализ данных по носительству провируса ДНК, показывает, что процент инфицированных на основании ПЦР-исследований не соответствует проценту РИД-позитивных животных. Совпадение результатов РИД и ПЦР выявлено только в 75% случаев. ПЦР-исследование выявило на 4 случая больше носителей провируса ДНК. Следовательно, если проводить разделение телочек методом ПЦР на носителей провируса и здоровых в первые 2-3 недели жизни животного, можно оздоравливать хозяйства значительно быстрее. Молекулярный метод позволяет провести раннюю диагностику инфицированности как взрослых животных, так и молодняка и определить их в категорию откормочных животных.

3.6. Характеристика проявления эпизоотического процесса лейкоза у крупного рогатого скота среди различных пород, разводимых в Республике Калмыкия

В хозяйствах Калмыкии проведен анализ данных серологических исследований с целью выяснения степени распространения вируса лейкоза крупного рогатого скота различных пород. Установлено, что высокие показатели инфицированных и больных животных выявляются в хозяйствах, где разводят скот красной степной породы. Инфицированность животных среди данной породы составила 24,07%, при этом пораженность всей популяции животных инфекцией составила

22,2%, что превышает средние республиканские показатели этого периода в 5,12 и 24,6 раза соответственно. Среди чистопородного калмыцкого скота инфицированность животных составила 3,7%, при этом превалентность инфекции в стадах на 1,8% меньше и составила 1,9%. Инфицированность черно-пестрой породы составляла 13,8%, что сопоставимо со значениями превалентности инфекции в популяции (13,2%).

Показано, что распространение лейкозной инфекции среди калмыцкого скота в 11,6 раза меньше, чем среди скота красной степной породы и в 6,9 раз меньше чем среди поголовья черно-пестрой породы. Инфицированность и превалентность инфекции среди поголовья красной степной породы превышает аналогичные показатели черно-пестрой породы в 1,74 и 1,68 раз соответственно.

3.7. Генотипирование изолятов ВЛКРС на территории Республики Калмыкия

Возможность определения генетического разнообразия циркулирующих вирусов и первичной структуры вируса лейкоза из разных регионов дает возможность оценки и установления их филогенетического родства, слежения эволюционного развития. В исследовании этапов лейкозогенеза, выявление того или иного генотипа ВЛКРС может играть определенно важную роль. Определение нуклеотидной последовательности ВЛКРС может помочь также в выяснении источника инфицирования животных.

Наличие в составе ретровирусов фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы, осуществляющей важный этап жизненного цикла – синтез ДНК на матрице РНК, является их отличительной чертой. (Felmer R.G., 2005). Впоследствии ДНК-копия вирусного генома встраивается в геном клетки хозяина и остаётся в нём пожизненно.

Известно, что ВЛКРС формирует отдельную филогенетическую ветвь внутри семейства ретровирусов.

Целью данного исследования являлось изучение полиморфизма изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующих в хозяйствах Республики Калмыкия, методом секвенирования и проведение филогенетического анализа на основе гена *pol* ВЛКРС.

При проведении амплификации целевого фрагмента гена *pol* с использованием разработанных праймеров PF2-PR2 получены участки ДНК изолятов провируса ВЛКРС размером 438 п.о.

При анализе филогенетических отношений нуклеотидные последовательности исследуемых изолятов ВЛКРС были выровнены с соответствующими консенсусными последовательностями провирусного гена *pol* изолятов ВЛКРС, представленными в БД GenBank. По результатам филогенетического анализа на основе *pol* гена построены дендрограммы.

Дендрограммы построены дистанционным методом минимума эволюции (ME) с использованием *r*-дистанций и бутстрэп-анализа (N=1000). Массив составляет 22 последовательности.

Согласно топологии древа на рисунке 1 исследуемые изоляты провируса лейкоза КРС, циркулирующие на территории Городовиковского района Республики Калмыкия, отнесены к группе изолятов, к которой принадлежат штаммы из Аргентины, Австралии, Японии, США, Бразилии. При этом данные изоляты отлича-

ются от штаммов из США (M10987), Северной Италии (S83529) и также США (NC001414, AF033818), которые формируют отдельные клады.

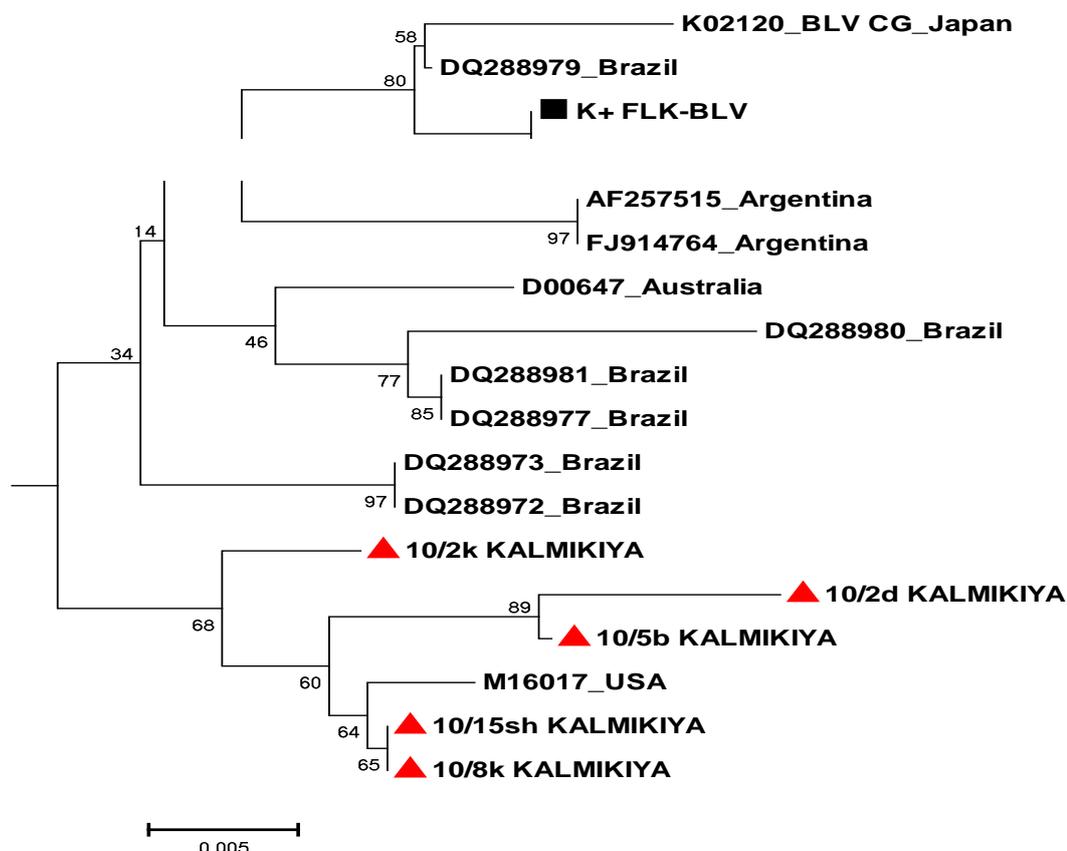


Рис. 1. Ветвь филогенетического дерева. Дендрограмма построена дистанционным методом минимума эволюции (ME) с использованием р-дистанций и бутстрэп-анализа (N=1000).

Определение нуклеотидной последовательности ВЛКРС может помочь в выяснении источника инфицирования животных. В данном случае установление близкородственных отношений изолятов 10/5b KALMIKIYA, 10/2d KALMIKIYA и 09/5164 ROSTOV подтверждается действительно имевшим место фактом ввоза скота из Ростовской области на территорию Республики Калмыкия, что, возможно, и послужило источником инфекции. Так, только в 1981г. из Ростовской области было ввезено 479 коров и 46 быков производителей красно-степной породы и 215 коров калмыцкой породы. В свою очередь не исключается факт перевоза скота в Ростовскую область из Калужской области, что объясняет присутствие филогенетического родства изолятов 10/13 KALUGA и 10/8k KALMIKIYA. При этом следует отметить, что в других районах республики, где не было контакта местного КРС с инфицированными животными, скот остается здоровым.

3.8. Детекция провирусной ДНК-BLV в иксодовых клещах как фактор риска распространения инфекции

Одним из наиболее обсуждаемых является вопрос об этиологической связи вируса ВЛКРС с определенными факторами риска развития лейкоза КРС. Нами

рассмотрен вопрос о носительстве иксодовыми клещами возбудителя лейкозной инфекции как фактора её распространения.

Для обнаружения провирусной ДНК лейкоза крупного рогатого скота (BLV-провирус) нами были проведены исследования клещей, как естественных резервуаров инфекционных возбудителей с применением ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией. Исследованию подвергались клещи вида *Hyalomma scupense* (сбор в январе, феврале) и *Hyalomma mardinatum* (сбор в апреле, мае).

Выявлено, что среди видового состава клещей, снятых с крупного рогатого скота в разных районах республики, провирусные ДНК (BLV-провирус) присутствуют у *Hyalomma mardinatum*, *Hyalomma scupense*, что доказывает присутствие возбудителя инфекции в одном из природных резервуаров - в иксодовых клещах. При этом частота встречаемости BLV-провирус в снятых со скота в разных районах отличается (табл. 3).

Таблица 3. Частота встречаемости провирусной ДНК (BLV-провирус) в клещах

Наименование хозяйства	Количество исследованных голов (клещей)	Частота встречаемости провируса BLV		Количество реагирующих коров в ПЦР на ВЛКРС
		<i>Hyalomma scupense</i>	<i>Hyalomma mardinatum</i>	
п. Дружба Городовиковский район	20 (124)	0,60	0,30	7
п. Торячи Малодербетовский район	22 (168)	0,10	0	1
с. Приютное Приютненский район	20 (120)	0,20	0	1
КФХ Баина Лаганский район	20 (100)	0,10	0	0
КФХ Алтн Гасн Лаганский район	20 (100)	0,10	0	1
и/сектор г. Лагань Лаганский район	20 (100)	0	0	0
с. Северное Лаганский район	20 (100)	0	0	0
п. Гашун Бургуста Кетченеровский район	20 (80)	0	0	0
п. Ачинеры Черноземельский район	25 (140)	0	0	0

Так, наибольшая частота встречаемости BLV-провируса отмечается в клещах *Hyalomma scupense*, собранных с животных в Городовиковском районе в феврале, что соответствует показателю 0,60. С частотой 0,20 встречается провирус в клещах этого же вида в с. Приютное Приютненского района. В трех хозяйствах - КФХ Баина и КФХ Алтн Гасн Лаганского района и в п. Торячи Малодербетовского района встречаемость составляет 0,10.

В клещах вида *Hyalomma mardinatum*, снятых в апреле-мае с коров в п. Дружба Городовиковского района, также найден BLV-провирус. Таким образом, впервые методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией выявлен BLV-провирус в клещах *Hyalomma mardinatum* и *Hyalomma scupense*.

Результаты полученных нами исследований показали, что при инфестации животных клещами существует возможность трансмиссивного пути передачи ВЛКРС. Поэтому в систему противолейкозных мероприятий нами был включен комплекс мер по деакаризации животных и помещений.

3.9. Оптимизированная система мероприятий для скотоводческих хозяйств Республики Калмыкия по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота

Рекомендованные нами оздоровительные мероприятия по лейкозу КРС в республике имеют особенность в связи с технологией разведения животных, когда теленок находится с матерью (подсосный период) на протяжении 7-9 месяцев на пастбище. При такой технологии содержания животных эпизоотический процесс лейкоза крупного рогатого скота закономерно поддерживается за счет передачи возбудителя больными и инфицированными коровами своему приплоду, т.е. обеспечивается эстафетная передача возбудителя инфекции. Это значит, что возбудитель этой болезни передаётся преимущественно вертикальным путём, что объясняет причины стабильного неблагополучия по лейкозу крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах республики.

Таким образом, традиционная биотехнология воспроизводства (вольная случка) и выращивания молодняка способствует вертикальному пути передачи вирусов в фетальный и постнатальный периоды. Следовательно, своевременное выявление инфицированных животных и изолирование их позволяет обеспечить оздоровление поголовья животных от данной нозологии.

Учитывая, что традиционный метод выращивания молодняка в скотоводстве не обеспечивает блокирования инфекции, мы разработали оптимизированную систему противолейкозных мероприятий для сельскохозяйственных предприятий республики. Исходя из экономических возможностей для реализации, предлагается комплекс мер, направленных на элиминацию зараженных лейкозом животных из популяции крупного рогатого скота независимо от степени инфицированности стад. Они направлены на жесткий контроль за серопозитивными животными и их своевременной выбраковкой из стада. При этом инфицированное взрослое поголовье немедленно сдается на убой, не дожидаясь проявления гематологической стадии заболевания. Приплод, полученный от этих животных, ставится на откорм и также сдается на мясо. Такое положение дел было связано с особенностями организации содержания крупного рогатого скота в мясном скотоводстве (вольновыгульное содержание), где исключается возможность изолированного содержания серопозитивного и серонегативного поголовья.

Таким образом, противозооотические мероприятия, проводимые с учетом реальной степени угрозы, позволили оздоровить крупный рогатый скот всех племенных хозяйств от лейкозной инфекции (племенные заводы, племенные репродукторы и племенные фермы) к концу 2014 года. При этом отмечаются отличия в длительности оздоровления стад от данной нозологии. Применение метода оздоровления, включающего двукратную серологическую диагностику со своевременной элиминацией всего зараженного поголовья, позволяет полностью оздоровить поголовье в короткие сроки, в течение 5-7 лет. Однократное серологическое исследование с последующим удалением всех реагирующих в РИД животных удлинит сроки оздоровления примерно в 2 раза, но является наиболее приемлемым для большинства хозяйств. Предложенная нами методика позволила, в первую очередь, оздоровить все племенные хозяйства республики. В настоящее время ста-

тус благополучия племенных хозяйств подтверждается ежегодными однократными исследованиями.

3.10. Результативность проводимых мероприятий по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота на территории Калмыкии

Весь период исследований (2004-2016гг.) характеризуется снижением напряженности эпизоотического процесса лейкоза крупного рогатого скота. Начиная с 2002 года, в республике были развернуты широкомасштабные противолейкозные мероприятия, которые включали как своевременное удаление из стада серопозитивных животных, так и полную одновременную замену некоторых инфицированных стад. В последние годы отмечается стабильный спад инфицированности, что, в первую очередь, связано с внедрением противолейкозных мероприятий по ликвидации всех серопозитивных животных. Нами показано, что эффективное решение проблемы оздоровления неблагополучных по лейкозу хозяйств может быть достигнуто путем быстрого и радикального удаления источника и блокирования возможности распространения инфекции.

В целом, анализируя динамику распространения лейкозной инфекции с 2000 по 2016 годы, можно сделать вывод, что было достигнуто благополучие крупного рогатого скота лейкозом на значительной территории республики. Данные показатели отражают эффективность внедряемой системы борьбы с лейкозной инфекцией.

3.11. Результаты экономической действенности оздоровительной работы от лейкоза крупного рогатого скота

Расчет экономической эффективности профилактических и оздоровительных противоэпизоотических мероприятий, а также способов ликвидации отдельных инфекционных болезней животных осуществляли (из расчета на 1 гурт) с использованием коэффициентов заболеваемости и летальности, а также удельных величин потерь основной продукции, которые установлены для основных инфекционных болезней животных.

Ущерб, предотвращенный в результате профилактики и ликвидации лейкоза крупного рогатого скота в хозяйстве с поголовьем 3500 животных, составил 1 048300 рублей.

Предотвращенный ущерб в результате проведения оздоровительных мероприятий против лейкоза крупного рогатого скота в одном условно взятом хозяйстве с количеством 3500 голов составил в среднем 1824600 рублей.

Заключение

Анализ факторов эпизоотологического риска и их оценка являются важным этапом эпизоотологических исследований. К видам рисков следует отнести занос и распространение вируса лейкоза в хозяйствах республики и длительное неблагополучие. К группам риска можно отнести инфицированных и больных животных; потомство, полученное от этих животных, а также иммунодефицитных и толерантных животных. К факторам риска, в первую очередь, следует отнести: совместное содержание инфицированных и здоровых животных в одной группе, использование репродуктивного потенциала животных, инфицированных вирусом лейкоза, хозяйственное использование телок, полученных от больных и инфицированных животных, а также естественное осеменение животных быками-производителями, не обследованными на вирусоносительство.

Таким образом, проведенные исследования структурируют систему профилактических и оздоровительных мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота, основными пунктами которой являются:

1. Профилактические:

- индивидуальный учет животных всех возрастных групп;
- строгое соблюдение правил асептики и антисептики при проведении ветеринарных и зоотехнических манипуляций;
- своевременная диагностика с полным охватом поголовья;
- формирование маточного состава свободного от вируса лейкоза.
- проведение обработок животных от клещей.

2. Ограничительные:

- запрет на ввоз и вывоз скота, а также их перегруппировка без разрешения ветеринарных специалистов;
- запрет на использование непроверенных на носительство возбудителя быков-производителей для вольной случки;
- запрет на совместное содержание инфицированных и интактных животных;
- запрет на передержку гематологических инфицированных животных в отсутствие изоляции;
- запрет на использование репродуктивного потенциала инфицированных и больных животных.

3. Оздоровительные:

- вывод всех инфицированных животных;
- откорм с последующим убоем всех сероположительных и больных животных;
- получение потомства, свободного от вируса лейкоза, путем подбора родительских пар с учетом результатов их серологического тестирования;
- дезинфекция, дезисекция и деакаризация мест содержания животных.

ВЫВОДЫ:

1. Значительное распространение лейкоза среди популяции крупного рогатого скота и длительное неблагополучие ферм, в том числе и племенных, характеризует развитие эпизоотического процесса в хозяйствах республики. В период с 1970 по 1984 гг. болезнь регистрировалась во всех административных районах республики. При невысоком охвате гематологическими исследованиями (16,06%), процент больных животных в данный период составлял 0,31%, а процент заболеваемости - 0,07%.
2. На молекулярном уровне (ПЦР-анализ) подтверждены возможные пути заноса лейкозной инфекции в республику. Выявлена идентичность на основе гена *pol* провируса лейкоза КРС изолятов 10/5b KALMIKIYA, 10/2d KALMIKIYA с изолятом 09/5164 ROSTOV (JQ400141) из Ростовской области, а изолята 10/8k KALMIKIYA с изолятом 10/13 KALUGA (JQ400146) из Калужской области.
3. Установлена причинно-следственная связь распространения лейкозной инфекции на территории Республики Калмыкия. В условиях подсосного выращивания телят до 7-9 месяцев вероятность заражения в постнатальный период наиболее высокая. Кроме того, система противоэпизоотических мероприятий не адекватна степени угроз, обусловленных отсутствием искусственного осеменения и использованием

при воспроизводстве животных вольной случки быков-производителей, что является причиной распространения инфекции.

4. Установлены различия по уровню инфицированности и заболеваемости скота лейкозом в естественных условиях в зависимости от породы. Среди скота калмыцкой породы показатель инфицированности по лейкозу КРС составил 1,9%, среди красной степной породы – 22,2% и среди черно-пестрой породы – 13,2%. Однако заболеваемость среди животных черно-пестрой породы составляла 1,28%, среди красной степной – 1,12%, а среди калмыцкой породы скота – 0,02%.
5. При разработке системы профилактических и оздоровительных мероприятий необходимо учитывать степени угроз и особенности проявления инфекционного, иммунного и эпизоотического процесса. Особенностью технологии разведения в мясном скотоводстве республики является подсосное содержание на пастбище телят до 7-9 месяцев. При такой технологии содержания животных эпизоотический процесс лейкоза крупного рогатого скота закономерно поддерживается за счет передачи возбудителя больными и инфицированными коровами своему приплоду, т.е. обеспечивается эстафетная передача возбудителя инфекции. Это означает, что возбудитель этой болезни передаётся, преимущественно, вертикальным путём, что объясняет причины стабильного неблагополучия по лейкозу крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах республики. Фактором риска распространения инфекции в республике является использование репродуктивного потенциала инфицированных животных. Поэтому в основе разработанной нами системы мероприятий по борьбе с лейкозом в хозяйствах республики лежит комплекс мер, направленных на удаление зараженных лейкозом животных из популяции крупного рогатого скота, независимо от степени инфицированности стад.
6. С целью ускорения эффективного оздоровления стад крупного рогатого скота от лейкоза проведена ранняя диагностика инфекции с использованием молекулярно-биологических методов выявления инфицированного поголовья животных. В этом плане полимеразная цепная реакция (ПЦР) является перспективным методом, который позволяет выявлять провирусную ДНК или вирусную РНК в образце крови животного.
7. При проведении исследования клещей как естественных резервуаров инфекционных возбудителей с применением ПЦР гибридно-флюоресцентной детекцией выявлены провирусные ДНК лейкоза крупного рогатого скота (BLV-провирус). Выявлено, что среди видового состава клещей, снятых с крупного рогатого скота разных районов республики, провирусные ДНК (BLV-провирус) присутствуют у клещей рода *Hyalomma mardinatum* и *Hyalomma scupense*. При этом наибольшая частота встречаемости BLV-провируса (0,60) отмечается в клещах *Hyalomma scupense*, собранных с животных в хозяйствах с инфицированностью выше 30%. С частотой 0,20 встречается провирус в клещах этого же вида в хозяйствах, где инфицированность коров не превышает 10%. Результаты полученных нами исследований показали, что при инфестации животных клещами существует возможность трансмиссивного пути передачи ВЛКРС.
8. Эффективность системы оздоровительных мероприятий выразилась полным освобождением от лейкоза крупного рогатого скота всех племенных хозяйств и снижением превалентности инфекции в республике к 2016 году до 0,28% и заболеваемости до 0,01%. В настоящее время оздоровлены практически все

хозяйства 12 районов республики из 13. Всего оздоровлено 2128 пунктов крупного рогатого скота, включая хозяйства сельскохозяйственных организаций, крестьянско-фермерских хозяйств, индивидуальных предпринимателей и личных подсобных хозяйств.

Предложение производству

Результаты исследований приняты Управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства Республики Калмыкия для включения в ряд мероприятий по диагностике и профилактике лейкоза крупного рогатого скота в республике, а также в организации и проведении противоэпизоотических мероприятий по предотвращению лейкозной инфекции у животных.

Предложена система ранней диагностики инфицированных животных с использованием ПЦР-анализа. Целесообразно совместно с РИД и непрямым ИФА использовать методы, позволяющие выявлять непосредственно вирус или провирус у инфицированных животных.

Считаем необходимым внести в действующие нормативные документы: «Правила по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота» (1999) и «Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота» (2000) дополнения с учетом разработанных за прошедшие годы новых методов диагностики, целесообразно при установлении диагноза ввести ИФА и ПЦР. Необходимо определиться по формулировке первичный диагноз «на основании положительных результатов серологического и гематологического (а если гематологии нет?) или патоморфологического исследований, т.е. более конкретизировать, т.к. в хозяйствах этот пункт трактуют по своему усмотрению, не выделяются гематологически больные животные, следовательно, оздоровительные мероприятия можно не проводить; не прописано, что делать с инфицированными животными и как поступать в случае невозможности раздельного содержания.

В пункт **4.3.** добавить, что по условиям ограничений запрещается продажа инфицированных ВЛ животных;

В пункте **4.4.** считаем необходимым указывать в ветеринарных сопроводительных документах, что молоко получено от инфицированных ВЛ коров;

В пункт **5.3.** прописать, что делать с молодняком, полученным от инфицированных коров, но давших отрицательный результат. Возможность использования ранней диагностики в ПЦР с 2-х недельного возраста;

Раздел **6** дополнить пунктом, что в случае выявления инфицированных ВЛ животных в племенных хозяйствах и непринятия руководством мер по его оздоровлению (разработки комплексной программы, выполнению ограничительных мероприятий) снятие статуса племенного.

Рекомендации по использованию научных выводов

Так как результаты полученных нами исследований показали, что при инфекции животных клещами существует возможность трансмиссивного пути передачи ВЛКРС, поэтому в систему противолейкозных мероприятий рекомендовано включать комплекс мер по деакаризации животных и помещений.

Результаты исследований применять в учебном процессе в вузах по дисциплинам «Эпизоотология и инфекционные болезни животных» и «Иммунология и микробиология».

Список опубликованных работ по теме диссертации:

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Генджиев А.Я. Обзор эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Калмыкия /А.Я. Генджиев, С. С. Абакин //Вестник АПК Ставрополья. - 2018.- №1. - С. 29-34.
2. Генджиева О.Б. Обзор эпизоотического состояния по инфекционным заболеваниям КРС в хозяйствах Республики Калмыкия /О.Б. Генджиева, А.Я. Генджиев //Ветеринарная патология. - 2009.- №3.- С. 75-78.
3. Генджиева О.Б. Эпизоотологический мониторинг лейкоза крупного рогатого скота в Республике Калмыкия /О.Б. Генджиева, А.Я. Генджиев //Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса. – 2012.- №1(25). - С. 109-113.
4. Генджиева О.Б. Эпизоотологический мониторинг лейкоза крупного рогатого скота в Республике Калмыкия /О.Б. Генджиева, А.Я. Генджиев //Ветеринарная медицина.- 2012.- № 2.- С. 11-15.
5. Генджиева О.Б. Детекция провирусной ДНК BLV в иксодовых клещах/О.Б. Генджиева, А.В. Руденко, Р.В. Басангова, А.В. Убушиева, А.Я. Генджиев, Л.Г. Моисейкина // Ветеринария Кубани.- 2015.- №5.- С. 10-13.

Публикации в научных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования

6. Moiseikina L.G. Immunogenetic markers of body type and body weight of calves of the Kalmyk breed /A.Y Gendzhiev. N.V. Chimidova, O.B. Gendzhieva// Biology and Medicine. Volume 6, Issue 4, Article ID: BM-055-14, 2014. Indexed by Scopus (Elsevier).

Учебно-методические работы:

7. Генджиев А.Я. Методические рекомендации по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота в мясном скотоводстве/А.Я. Генджиев, В.А. Шаханов // Методические рекомендации. МСХ РК. - 2018.- 19 с.
8. Генджиева О.Б. Эпизоотология лейкоза крупного рогатого скота в скотоводстве Республики Калмыкия /О.Б. Генджиева, М.И. Гулюкин, А.Я. Генджиев // Монография.- Элиста, 2013. - 163 с.

Подп. в печать 31.01.2019 г. Бумага офсетная. Формат 60x84 1/16.
Зак. № 28. Печ. лист 1,0. Тираж 100 экз.

Цех оперативной полиграфии ВНИИОК-
филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ»
г. Ставрополь, пер. Зоотехнический 15.

