

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

**КЫРГЫЗСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА**

Диссертационный совет Д.06.11.037

На правах рукописи
УДК 619:578. 835.1.

СААДАНОВ ИСКЕНДЕР УСЕНБЕКОВИЧ

**МЕЖВИДОВАЯ МИГРАЦИЯ ВИРУСА ЯЩУРА
И СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА**

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

БИШКЕК – 2012

Диссертационная работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева и на базе неблагополучных по ящуру хозяйств Кыргызской Республики.

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, профессор
член-корреспондент Национальной
Академии Наук Кыргызской Республики
Нургазиев Рысбек Зарылдыкович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Тулобаев Аскарбек Зарлыкович

кандидат ветеринарных наук
Искембаева Гульмайрам Асановна

Ведущая организация: «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт» г. Алматы, Республика Казахстан.

Защита диссертации состоится 11 мая 2012 г. в 14 00 на заседании диссертационного совета Д.06.11.037 при КНАУ им. К.И.Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. О. Медерова, 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. О. Медерова, 68.

Автореферат разослан " " апреля 2012 г.

**Ученый секретарь
диссертационного
совета, кандидат
ветеринарных наук**

Е.Д. Крутская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В животноводстве Кыргызской Республики превалирует отгонная система ведения, в весенне-летний период животноводы отгоняют свой скот на горные и высокогорные пастбища. На этих же пастбищах выпасается скот из соседних стран. В результате на пастбищах происходит скопление большого количества животных, что соответственно приводит к контактам между ними и создает опасность возникновения и распространения многих инфекционных заболеваний, в том числе и ящура сельскохозяйственных животных. Данные обстоятельства были приняты во внимание при изучении межвидовой миграции вируса ящура, эпизоотологии и разработке противоящурных мероприятий в республике.

В весенне-летние и осенние периоды, когда животные находятся на отгонных пастбищах, как правило, вспышки ящура сильно прогрессируют. Осенью животные обратно возвращаются в фермерские и частные хозяйства. Во время перегона происходит контакт между здоровыми и больными или переболевшими животными. Здоровый и не вакцинированный скот, заражаясь вирусом ящура, заболевает в хозяйствах. Роль же диких животных при переносе ящура и межвидовой миграции до конца не изучена. Хотя мы полагаем, что межвидовая миграция происходит в основном между домашними животными (КРС, овцы, козы и свиньи). Так как все виды животных содержатся вместе, наблюдается тесный контакт между животными, что приводит к межвидовой миграции. Вирус ящура способен адаптироваться к определенному виду животного, поэтому передача вируса между животными одного вида происходит легче, чем передача животному другого вида. Но, как показала практика, овцы могут быть переносчиками вируса от КРС. Недостаточный охват вакцинацией приводит к распространению ящура среди восприимчивых животных. Так, в конце 2010 года насчитывалось 1278 тыс. голов КРС, 4815 тыс. голов МРС, 61 тыс. голов свиней, общее количество всех восприимчивых к ящuru животных составляло 6155 тыс. голов. По плановой вакцинации израсходовано 2639 тыс. доз противоящурной вакцины для иммунизации КРС и МРС. Как видно свиньи не были вакцинированы против ящура, хотя они также являются восприимчивыми к этой болезни. Таким образом, не иммунизированными остаются еще 3516 тыс. голов восприимчивых к ящuru животных, т.е. 57%. Это говорит о том, что в республике большое количество не вакцинированных животных, которые контактируют с вирусоносителями и со здоровыми животными, что ведет к распространению инфекции. Нами часто наблюдались случаи, когда заболевали вакцинированные животные. В патологических материалах больных животных находили тип вируса ящура, против которого проводилась вакцинация. Причиной этому могло быть недостаточно эффективная вакцина, изготовленная не из местного штамма или возбудителем является вирус того же типа, но другого варианта.

В стратегии борьбы с ящуром одной из важных проблем является дифференцирование вакцинированных животных от вирусоносителей. Это является очень актуальным вопросом, так как некоторые животные не проявляют клинических признаков заболевания, но выделяют вирус во внешнюю среду с молоком, мочой и слюной в течение многих лет. Такие животные представляют угрозу для других восприимчивых животных. Риск передачи болезни от вирусоносителей еще недостаточно изучен, и это иногда приводит к необоснованному убою животных, имевших контакт с зараженными животными. На сегодняшний день совершенствуются методы исследования антител у вакцинированных и зараженных животных. Во многих странах, где ранее были вспышки ящура, используя метод выявления неструктурных белков вируса ящура в ИФА, удается вновь обрести статус «свободного» от ящура и восстановить внешнюю торговлю продукцией животного происхождения.

Связь темы диссертации с основными научными программами. Научные исследования, проведенные по теме диссертации, являются составной частью тематического плана научно-исследовательских работ лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени Арстанбека Дуйшеева, по теме «Эпизоотологический, серологический мониторинг ящура сельскохозяйственных животных и разработка средств специфической профилактики на основе местных штаммов» № гос. регистрации 0004028.

Цель исследования. Изучить межвидовую миграцию вируса ящура среди сельскохозяйственных и диких животных и идентифицировать возбудителя. Изучить штамм вируса ящура типа «О», выделенного на территории республики.

Задачи исследования:

1. Типизировать вирус ящура в зонах возникновения вспышек.
2. Изучить межвидовую миграцию вируса ящура среди разных видов животных.
3. Дифференцировать вирусоносителей от вакцинированных животных путем выявления 3 АВС неструктурных белков вируса ящура.
4. Определить длительность вирусоносительства у переболевших животных.
5. Изучить поствакцинальный иммунитет у вакцинированных животных.
6. Провести выделение и адаптацию выделенного изолята на культурах клеток.

Научная новизна. Впервые в ветеринарной науке Кыргызской Республики исследовано наличие 3АВС неструктурных белков вируса ящура у вакцинированных и не вакцинированных животных с целью определения их на вирусоносительство. Впервые выявлены антитела к вирусу ящура у диких парнокопытных и яков. Это означает, что они также могут быть переносчиками

ящура. Установлено, что при совместном содержании разных видов животных происходит межвидовая миграция вируса ящура.

Практическая значимость полученных результатов. Для более эффективной борьбы с ящуром на территории республики ветеринарной практике рекомендовано:

- 1) полный охват вакцинацией всех восприимчивых к ящуру животных;
- 2) перед массовой вакцинацией восприимчивых животных проводить обязательную проверку на вирусоносительство, т.е. на наличие ЗАВС неструктурных белков вируса ящура;
- 3) с целью предупреждения перезаражения практиковать раздельное содержание вакцинированных животных от переболевших ящуром (в течение года после их переболевания).

Экономическая значимость полученных результатов. Внедрение в ветеринарную практику методов предотвращения распространения ящура среди разных видов животных позволит сократить заболеваемость и потери продуктов животноводства от ящурной инфекции. Выявлением ЗАВС неструктурных белков вируса ящура у животных возможно определение эпизоотического статуса хозяйства, его благополучия по данной инфекции. Наличие таких хозяйств в республике говорит о циркуляции вируса ящура в стране, что ограничивает возможности реализации продукции животноводства на внешнем рынке.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Идентифицирован вирус ящура в неблагополучных хозяйствах; определен тип вируса ящура современными методами ИФА и ПЦР.
2. Зарегистрирован новый подтип О вируса ящура.
3. Определен титр антител к вирусу ящура у больных животных и дифференцированы вакцинированные животные от вирусоносителей.
4. Изучена миграция вируса ящура между разными видами животных.
5. Выделен и адаптирован новый штамм вируса ящура типа О

Личный вклад соискателя. Диссертантом самостоятельно проведен сбор и подготовка патологического материала от больных животных. Проведены лабораторные исследования вируса ящура с применением ИФА и ПЦР. Проведены типизация, выделение и адаптация вируса ящура типа О, выявление неструктурных белков вируса ящура. Лабораторные исследования выполнены с участием сотрудников лаборатории вирусологии и биотехнологии КыргызНИИВ Н.Т. Джапаралиева, Э.К. Акматовой, Е.Д. Крутской, Ж.Ч. Орозова, Н.К. Абдыкеримова, А.Т. Мамытовой, А.Р. Нургазиевой под научным руководством член-корр. НАН КР, д.в.н., профессора Р.З. Нургазиева.

Апробация материалов диссертации. Материалы диссертации были доложены на международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию научно-исследовательского института проблем биологической безопасности НЦБ МОН РК. г. Алматы, Республика Казахстан, 2008, на

конференции посвященной 90 летию д.в.н., профессора Алдашева Абдулхая Алдашевича, КАУ, Бишкек, 2009 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, две рекомендации, получен патент на штамм «Иссык-Куль-2004» типа О.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 134 страницах компьютерного текста и включает перечень условных обозначений, символов и терминов, оглавление, введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список использованных источников литературы и приложения. Работа иллюстрирована 15 рисунками, 11 диаграммами, 27 таблицами. Список использованных литературных источников включает 176 наименований, из которых 117 иностранных авторов. В приложении содержатся копии документов, подтверждающих результаты отдельных этапов работы, их научную новизну и практическую значимость.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследований, необходимость изучения межвидовой миграции вируса ящура и его иммунобиологических свойств при разработке вакцинных препаратов и проведении профилактических мероприятий.

В главе 1 «Обзор литературы» по материалам отечественных и зарубежных публикаций дана характеристика циркулирующих вирусов ящура, их биологических свойств и метода выявления ЗАВС неструктурных белков вируса ящура для дифференциации вакцинированных животных от инфицированных; роль диких животных в распространении ящура; использование определенных видов вакцин в борьбе с ящуром сельскохозяйственных животных.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» дана характеристика объектов исследования и методических подходов выполнения исследований. Работа выполнялась в лаборатории вирусологии и биотехнологии КыргызНИИВ им. А.Дуйшеева, на базе неблагополучных по ящуру хозяйствах в период с 2007-2011 гг. Опытные образцы вакцины проверялись на животных Сокулукского опытного хозяйства, научно-экспериментальной базы КыргызНИИ ветеринарии. Материалом для исследований были сыворотка крови, патологический материал от больных животных, который отбирался в хозяйствах, неблагополучных по ящуру.

В работе использовались материалы государственной ветеринарной отчетности по заболеваемости животных ящуром, результаты серологических, вирусологических и биологических исследований Республиканской и межрайонных центров ветеринарной диагностики.

Подопытные животные: не вакцинированные против ящура 36 голов крупного рогатого скота 6-18 ти месячного возраста массой 150-250 кг, 15 голов овец 6-8 месячного возраста из благополучных по ящуру регионов.

Выделение вируса ящура из патологического материала методом ИФА выполняли согласно «Временному наставлению по применению набора для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом», разработанному в ФГУ «ВНИИЗЖ» и утвержденному Департаментом ветеринарии МСХ РФ 22.04.2002.

Уровень антител к вирусу ящура в сыворотке крови определяли с помощью «Набора для выявления антител к вирусу ящура иммуноферментным анализом» производства ФГУ «ВНИИЗЖ» согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10. 11. 2002г., коммерческих наборов, полученных из ВСЛ (Пирбрайт, Великобритания).

Для дифференциации вакцинированных животных от вирусоносителей использовали набор СНЕКИТ FMD 3ABC bo-ov для определения неструктурных белков 3ABC в сыворотках крови сельскохозяйственных животных в ИФА (IDEXX Laboratories, Нидерланды).

Исследование РНК вируса ящура проводили с помощью реактивов компании «Invitrogen».

Для секвенирования фрагментов генома вируса ящура использовали наборы фирмы «Applied Biosystems».

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Собственные исследования» дана характеристика заболеваемости животных ящуром с 2000-2010 гг. Анализ эпизоотической ситуации по ящуру в Кыргызской Республике на основании ветеринарной отчетности указывает на то, что очаги инфекции на протяжении 2000-2008 гг. регистрировались ежегодно со значительными колебаниями [Нургазиев Р.З., Джапаралиев Н.Т., Крутская Е.Д. 2010]. В 2009 году регистрировались единичные случаи ящура. В 2010 году зарегистрировано 9 неблагополучных пунктов по ящуру среди крупного рогатого скота, а именно в Чуйской области-5, в Нарынской-области-3 и Таласской области-1 неблагополучный пункт, а среди мелкого рогатого скота 1 неблагополучный пункт в Таласской области. Как видно из диаграммы 1, в последние три года регистрировались вспышки, вызванные ВЯ типа О. Очаги инфекции регистрировались в хозяйствах Нарынской, Чуйской и Таласской областей. По данным ветеринарных специалистов животные вакцинируются ежегодно против ящура. В 2010 году все поголовье КРС вакцинировали трехвалентной противоящурной вакциной Raksha Ovac Trivalent индийского производства.



Рис 1. Очаги ящура в 2010 году

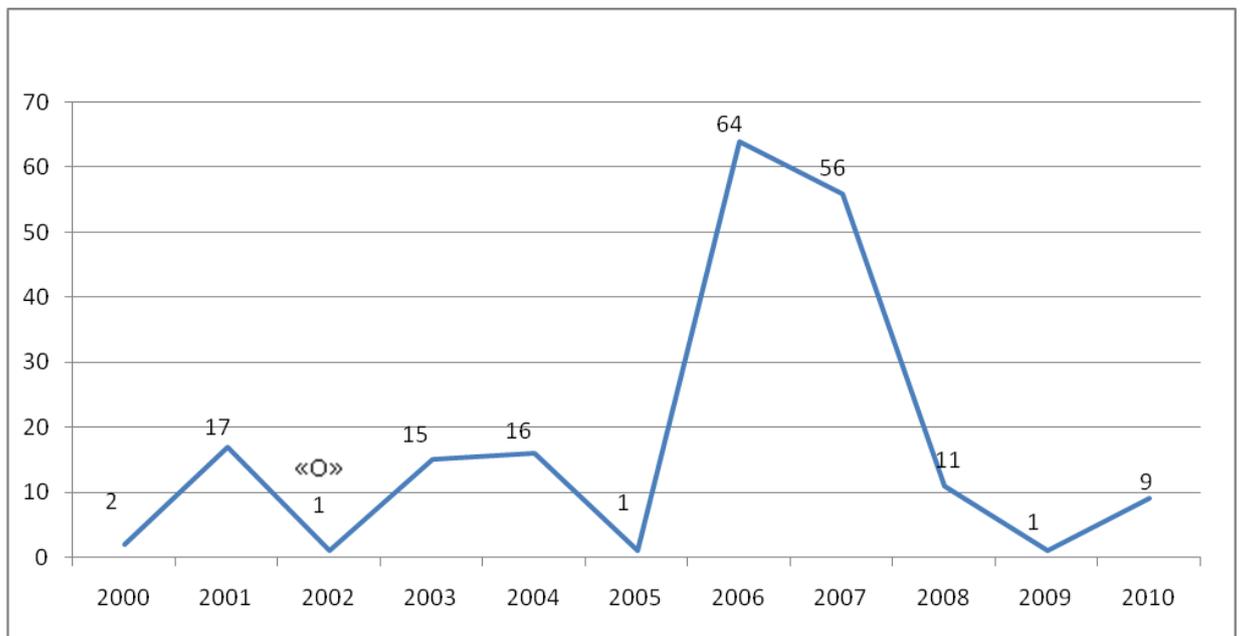


Диаграмма 1. Очаги вируса ящура 2000-2010 г.

Вспышки наблюдались и среди вакцинированных животных. Ежегодное наличие очагов свидетельствует о неблагополучии республики по ящуру. В ветеринарной практике остается невыясненной длительность вирусносительства и вероятность передачи инфекции от одного вида животного к другому. Для выяснения вероятности вирусносительства и способов передачи инфекции нами было проведено обследование и сбор патологического материала из неблагополучных по ящуру хозяйств.

16 марта 2010 года в Кочкорском районе Нарынской области были зарегистрированы больные телята в возрасте от 1 до 2 лет с признаками ящура. От больных животных взят афтозный материал для лабораторного

исследования. В результате в 2-х исследуемых пробах обнаружили антигены вируса ящура типа О (табл. 1)

По данным анамнеза все животные были вакцинированы в январе 2008 года против ящура вакциной индийского производства. У вакцинированных животных вскоре появились клинические признаки ящура, у невакцинированных животных клинические признаки появились позже. Смертельных случаев среди больных животных не выявлено.

Таблица 1 - Типизация вируса ящура

Материал от КРС разного возраста	ИФА			ПЦР		
	тип А	тип О	тип Азия-1	тип А	тип О	тип Азия-1
2 года	–	–	–	–	–	–
3 года	–	–	–	–	–	–
1 год	–	–	–	–	–	–
1,5 года	–	+	–	–	+	–
2 года	–	+	–	–	+	–

Лабораторными методами ИФА и ПЦР был типизирован вирус ящура из афтозного материала от больных животных. В двух пробах получили положительный результат, при этом был выявлен вирус ящура типа О.

13 июня 2010 года в селе Тогуз-Булак Иссык-Атинского района зарегистрирован факт болезни телят с признаками ящура. По результатам лабораторных исследований из 6 ти проб в 2-х обнаружили антиген вируса ящура типа О. По данным анамнеза сведений о вакцинации животных не было (табл. 2).

Таблица 2 - Типизация вируса ящура

Материал от КРС разного возраста	ИФА			ПЦР		
	тип А	тип О	тип Азия-1	тип А	тип О	тип Азия-1
1,5 года	–	–	–	–	–	–
1,5 года	–	+	–	–	+	–
1,5 года	–	–	–	–	–	–
1,5 года	–	+	–	–	+	–
1,5 года	–	–	–	–	–	–
1 год	–	–	–	–	–	–

Зараженные животные находились в одном дворе с другими восприимчивыми животными к ящуру. Отсутствие данных о вакцинации животных свидетельствует о серьезной угрозе заражения ящуром других восприимчивых видов скота.

Для изучения межвидовой миграции вируса ящура в хозяйствах Кара-Кужурской долины Нарынской области отобрали материал от яков с клиническими признаками данной болезни. У яков наблюдалась типичная клиническая картина, присущая ящуру, но менее выраженная, чем у КРС и МРС. У яков наблюдали обильное слюнотечение, отсутствие аппетита, взъерошенность шерсти, незначительное повышение температуры (рис 2.).

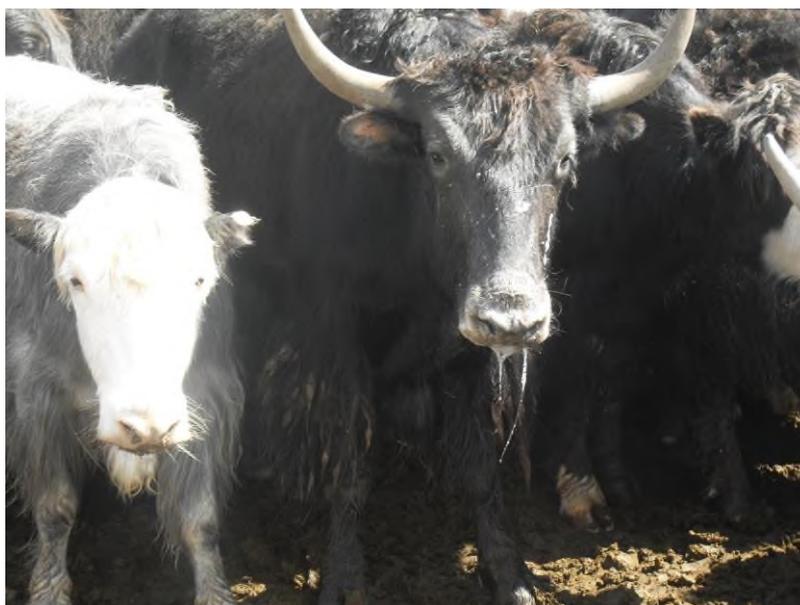


Рис 2. Клинические признаки у больного яка

Для подтверждения клинических признаков ящура у пяти больных яков исследовали сыворотку крови, афты из ротовой полости и трахеальные смывы. Провели лабораторное исследование на типы вируса ящура с помощью серологических реакций (ИФА) и молекулярно-биологических методов (ПЦР).

Таблица 3 - Исследование крови и афтозного материала яков

Яки разного возраста	ИФА			ПЦР		
	тип А	тип О	тип Азия-1	тип А	тип О	тип Азия-1
1,5 года	–	–	–	–	–	–
1 год	–	–	–	–	–	–
1,7 лет	–	–	–	–	–	–
1,5 года	–	+	–	–	+	–
1,6 лет	–	+	–	–	+	–

В результате проведенных исследований сывороток крови и афтозного материала с помощью метода ИФА и ПЦР в 2 х пробах из 5 были получены положительные результаты на тип О. На типы А и Азия-1 были получены отрицательные результаты. Следует отметить, что исследованные яки не были вакцинированы противоящурной вакциной и, следовательно, заражение их ящуром возможно произошло от переболевшего КРС.

Следующим логическим этапом работы явился филогенетический анализ, т.е. положительно реагиовавшие пробы в ИФА и ПЦР были исследованы с помощью секвенирования фрагментов генома вируса ящура.

При исследовании специфических фрагментов РНК, выделенных из проб (афты) от телят в Кочкорском районе, и яков из Кара-Кужурской долины установлено, что они находятся в тесном родстве с изолятом, выделенным на территории республики в 2008 году. Данный изолят относится к группе ПанАзия-2, который циркулировал в Казахстане в 2007 году. Это означает, что возможно вирус мигрировал в Кыргызскую Республику и вызвал болезнь у КРС и яков в Кочкорском и Нарынском районе, которые были заражены одновременно при совместном их содержании. Незначительные отличия изолятов наблюдаются при сравнении их с изолятами, выделенными в Кыргызской Республике в 2007 году. Из этого следует, что занос вируса ящура типа О в Нарынскую область произошел из Чуйской области. А в Чуйскую область вирус ящура типа О паназиатской группы 2 возможно был занесен из Казахстана, либо вспышки ящура произошли одновременно. Кроме того, наш изолят находится в дальнем родстве с изолятами выделенными в Израиле в

2007 году, Йордане в 2006 году, в Нагорном Карабахе, Армении в 2006 году и в Пакистане в 2006 году. В целом вирус ящура типа О паназиатской группы 2 регистрировался практически во всех странах Ближнего Востока и Центральной Азии. Отсутствуют данные из Узбекистана и Туркменистана, хотя из неофициальных источников известно, что в этих странах также наблюдались вспышки ящура, вызванные вирусом типа О. Впоследствии был выделен маркерный изолят, который называется Иран-05 и Турция-06. То есть первоисточником распространения вируса ящура типа О паназиатской группы 2 как и типа А явился изолят, впервые выделенный в Иране в 2005 году и далее распространился на территории Пакистана, Афганистана, возможно Туркменистана и вскоре достиг Турции в 2006 году. Это подтверждается данными филогенетического анализа (Рис.3).

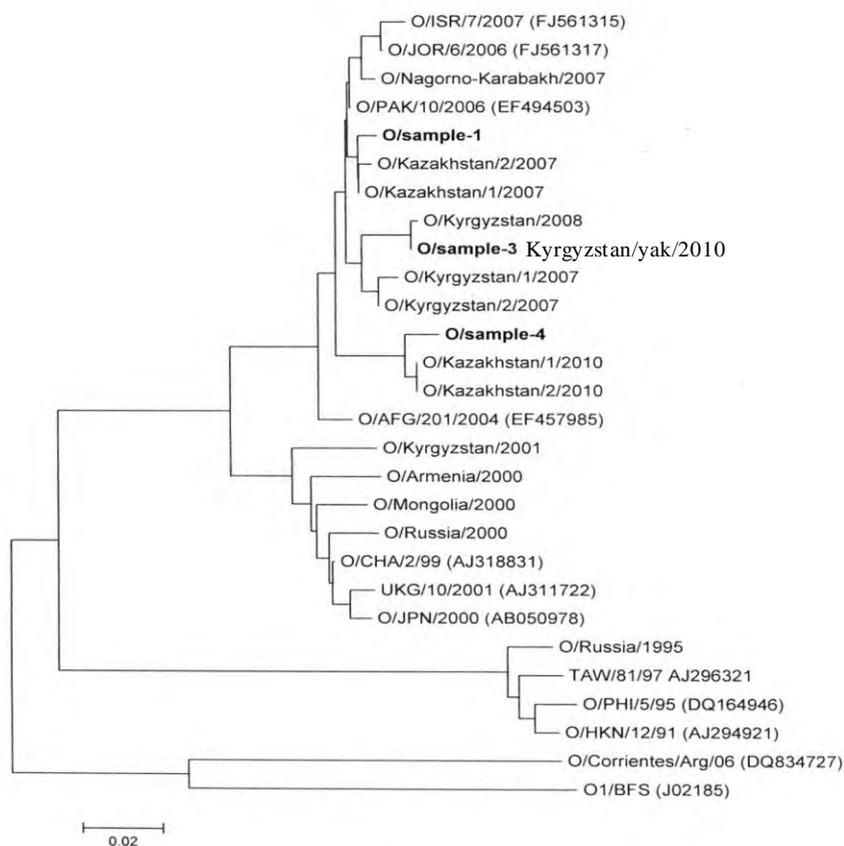


Рис 3. Дендрограмма полученных изолятов вируса ящура типа О

Выделенные нами изоляты находятся в другой группе, нежели изоляты, выделенные в Чуйской области и Казахстане в 2010 году. Данный факт говорит о том, что вирус прошел стадию мутации и в геном вируса были внесены изменения.

Невозможно однозначно определить первоисточник его изменений, произошло это из-за массового перемещения животных, транспорта либо людей через границу Кыргызской Республики и Казахстана. Изоляты вируса ящура типа О паназиатской группы 2 отличаются по своим свойствам от

изолятов паназиатской группы 1, что подтверждают данные филогенетического анализа.

В 2001 году в Кыргызской Республике циркулировал вирус ящура типа О паназиатской группы 1. Данный вирус и его разнообразные подтипы, подвергались изменениям в ходе передач разным видам животных и климатически-сезонным условиями, а также при применении вакцин и других лекарственных средств.

Широта распространения данного вируса ящура типа О паназиатской группы 1 была значительная, от Приморского края России до Кавказа. Вспышки вируса данного типа регистрировали в Амурской области, Дальнем Востоке, в Российской Федерации в целом, в Монголии, Китае, Кыргызской Республике, Казахстане, Армении и других странах.

Проведенный филогенетический анализ показал, что вакцина, которая применялась ранее, не обеспечивала достаточным иммунитетом животных, существенно отличалась по своим иммуногенным свойствам и не была пригодной для профилактической вакцинации восприимчивых животных. Поэтому следовало использовать вакцину, приготовленную из штаммов Иран-05 или Турция-06, которые наиболее схожи с изолятами, циркулировавшими в Кыргызской Республике, как показывает дендрограмма.

Ситуация по ящуру осложнялась еще тем, что в республике параллельно с типом О циркулировал тип А. Данное обстоятельство могло повлечь множественные мутации. Кроме того, в республике отсутствовала общая стратегия применения вакцин против ящура.

В условиях Кыргызстана особое экономическое, и эпизоотологическое значение имеют представители семейств оленей и диких свиней подсемейства сайгаков, горные бараны и козы, которые мигрируют на большие расстояния.

В связи с этим одним из важных вопросов в эпизоотологии ящура было изучение роли диких животных обитающих в Кыргызской Республике. Для изучения роли диких животных в распространении ящура в Нарынской области были взяты пробы крови у диких животных. По данным местных охотников дикие животные не проявляли признаков болезни присущих ящуру. Охотниками были отловлены 5 баранов Марко Поло и от них взята кровь для исследования на ящур. В лабораторных условиях были исследованы сыворотки крови на наличие антител к ВЯ методом ИФА и наличие ВЯ методом ПЦР. В результате были получены отрицательные результаты на типы А, О, Азия-1 вируса ящура.

Для изучения межвидовой миграции вируса отбирались пробы крови от 2-х диких баранов, обитающих в горах Алайского района Ошской области. Отобранные сыворотки использовали для постановки реакций в РДП и РСК с типоспецифическими сыворотками ящура О, А, Азия-1. Результаты представлены в табл. 4. В пробах сывороток крови у барана Марко-Поло выявлены антитела в РДП активностью 1:4, в РСК 1:8, в сыворотке крови у архара антитела не были выявлены. Это свидетельствует о переболевании

барана Марко-Поло вирусом ящура.

Таблица 4 - Обнаружение противоящурных антител в пробах сывороток у диких животных в серологических реакциях

№ пробы	Вид животных	РДП			РСК		
		О	А	Азия-1	О	А	Азия-1
1	Баран Марко-Поло	1:4	-	-	1:8	-	-
2	Архар	-	-	-	-	-	-

Кроме того, нами были исследованы материалы из туш убитых диких животных (лимфатические узлы головы и заглочного кольца, поджелудочную железу, мышцу сердца, кусочки верхнего отдела пищевода и глотки, миндаины).

Во всех случаях были получены отрицательные результаты. Исходя из наших наблюдений и исследований мы не можем исключить роль диких животных в переносе ящура и межвидовой миграции, но межвидовая миграция вируса происходит, в основном, между домашними животными (КРС, овцы, козы и свиньи).

Следует также учитывать источник инфекции. Вирусы способны адаптироваться к определенному виду животных. Передача вируса между животными одного вида осуществляется легче, чем передача животному другого вида. Помимо плотности популяции хозяина важным фактором, влияющим на частоту и распространение ящура, является сосуществование различных видов восприимчивых животных. Многовидовой биоценоз домашних и диких восприимчивых животных создает самые благоприятные условия для сохранения вируса в природе в межэпизоотический период и трудноразрешимые проблемы ликвидации ящура.

Кроме диких животных нами были исследованы и другие сельскохозяйственные животные. В г. Кара-Балта установили свиноматку с признаками ящура. На сосках и межкопытной щели были обнаружены афтозные поражения. Из анамнеза известно, что в хозяйстве до появления клинических признаков ящура у свиноматки, одна корова переболела ящуром. Корова была вакцинирована за 3-4 месяца до заболевания. Свиньи в этом хозяйстве не вакцинировались. Свиноматка была подсосной и в результате болезни пали 2 поросенка. Содержание животных стойловое, КРС содержится отдельно от свиней и контактов между животными никогда не происходило. Кормление и водопой производится вручную. Единственным вероятным распространителем был хозяин. Обслуживая скот, он не менял обувь и одежду, т.е. во все помещения входил в одной и той же одежде. Для проведения лабораторной диагностики нами был взят патологический материал (афты и слюна) от свиноматки.

Таблица 5 - Исследование патологического материала от свиноматки

Наименование материала	ИФА			ПЦР		
	тип А	тип О	тип Азия-1	тип А	тип О	тип Азия-1
Афты	–	+	–	–	+	–
Слюна	–	–	–	–	–	–

При исследовании патологического материала от свиноматки был выявлен антиген ВЯ типа О. Данный результат свидетельствует о циркуляции вируса ящура типа О в организме свиноматки (табл. 5).

Среди разных видов животных и в разных регионах циркулировал вирус ящура типа О. Очень часто болезнь проявляется и у вакцинированных животных. В последние годы вспышки на севере республики (в Нарынской области) возникают, в основном, среди молодняка. Были факты заражения молодняка, содержащегося рядом с невакцинированными взрослыми животными, которые не болели ящуром в то время. В борьбе с ящуром важным элементом является дифференциация вакцинированных животных от вирусоносителей. Методом ИФА стало возможным выявлять ЗАВС неструктурные белки вируса ящура в сыворотках крови восприимчивых животных. Белки - это капсула вируса, они делятся на структурные и неструктурные, необходимые для образования живого инфекционного вируса из структурных белков. Для каждой линейной молекулы РНК производится равное количество структурных и неструктурных белков.

ЗАВС неструктурные белки являются самым главным индикатором в дифференциации полевого штамма от вакцинного. С помощью данного метода возможно выявлять длительность вирусоносительства, что является главным моментом при проведении профилактических мероприятий. С целью определения иммунного статуса у животных нами был предварительно исследован титр антител к вирусу ящура, который составлял 1:32.

Таблица 6 - Наличие ЗАВС неструктурных белков вируса ящура в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота Кочкорского района

Вид животных	Через 6 месяцев после переболевания		Через 12 месяцев после переболевания	
	кол-во исследований проб	кол-во положительных результатов	кол-во исследований проб	кол-во положительных результатов
Крс	3	3	3	3
Мрс	16	7	19	7

Из табл. 6 видно, что в сыворотках крови наблюдается наличие 3 АВС неструктурных белков вируса ящура, что говорит о циркуляции патогенного вируса в организме животных. Клинических признаков ящура у овец не наблюдалось, но присутствие в организме 3АВС НБ свидетельствует о возможности межвидовой миграции вируса ящура. В организм МРС вирус ящура мог мигрировать только от КРС, так как в хозяйстве кроме КРС другие животные ящуром не болели. Полученные данные показывают наличие 3АВС НБ в организме животных на протяжении года. Овцы при заболевании ящуром не проявляют клинических признаков болезни, но при этом овцы выделяют во внешнюю среду вирус с молоком, слюной, мочой и калом. Животные после переболевания длительное время остаются вирусоносителями (табл. 7).

Таблица 7 - Наличие 3АВС неструктурных белков вируса ящур в сыворотках крови животных Кара-Кужурской долины

Вид животных и сведения о вакцинации	Через 6 месяцев после переболевания		Через 12 месяцев после переболевания	
	кол-во иссл-х проб	кол-во положит. результатов	кол-во иссл-х проб	кол-во положит. результатов
Яки (не вакц.)	17	12	19	11
Крс (вакц.)	5	5	5	5
Мрс (не вакц.)	14	5	16	6

В крови всех видов животных были обнаружены неструктурные белки вируса ящура. Все животные, в пробах крови которых обнаружены неструктурные белки, считаются вирусоносителями. Следует отметить, что неструктурные белки вируса ящура выявлены и в крови вакцинированных животных. Это говорит о недостаточной иммуногенности вакцин, либо вакцины недостаточно очищены и имеют в составе неструктурные белки вируса ящура.

Нами были исследованы слюна всех животных, у которых выявляли 3 АВС неструктурные белки вируса ящура (табл.8).

Таблица 8 – Исследование слюны у переболевших животных методом ПЦР

Наименование местности	Через 6 месяцев после переболевания			Через 12 месяцев после переболевания	
	вид животных	кол-во иссл-х проб	положит. результаты	кол-во иссл-х проб	положит. результаты
Кара-Кужурский р-н	яки	17	15	19	16
	крс	3	0	3	0
	мрс	14	0	16	0
Кочкорский р-н	крс	3	0	3	0
	мрс	16	0	19	0

Среди исследованных животных только у яков был обнаружен вирус в слюне. Следовательно, вирус не сохраняется в глотке у крупного и мелкого рогатого скота.

Для изучения вирусоносительства нами были исследованы сыворотки крови крупного и мелкого рогатого скота на наличие ЗАВС неструктурных белков из разных районов Таласской, Чуйской, Нарынской областей (табл. 9).

Таблица 9 – Исследование сыворотки крови на наличие ЗАВС

Области	Вид жив-х	Кол-во исследованных проб	Кол-во полож-х проб			
			от вакцин-х жив-х		от невакц-х жив-х	
			гол.	в %	гол.	в %
Таласская	крс	170	41	24	21	12,3
	мрс	161	-		14	8,7
Чуйская	крс	199	-		52	26
	мрс	140	15	10,7	12	8,5
Нарынская	крс	163	50	30,6	-	
	мрс	123	14	11,3	5	4

В результате исследований из 532 проб крови КРС 164 показали положительный результат, из 424 проб МРС 60 проб показали положительный

результат. Из 164 положительно реагировавшего КРС 91 голова вакцинированы против ящура, а из 60 проб МРС 29 голов вакцинированные. Как показали исследования, ЗАВС неструктурные белки присутствуют в организме вакцинированных так и не вакцинированных животных, что свидетельствует о передаче вируса ящура от переболевших к невакцинированным восприимчивым животным.

В июле 2011 года на вирусоносительство были исследованы сыворотки крови КРС из Нарынской, Иссык-Кульской, Таласской и Чуйской областей по наличию антител к неструктурным белкам вируса ящура. Всего было исследовано 1338 проб, из которых 731 показали положительный результат.

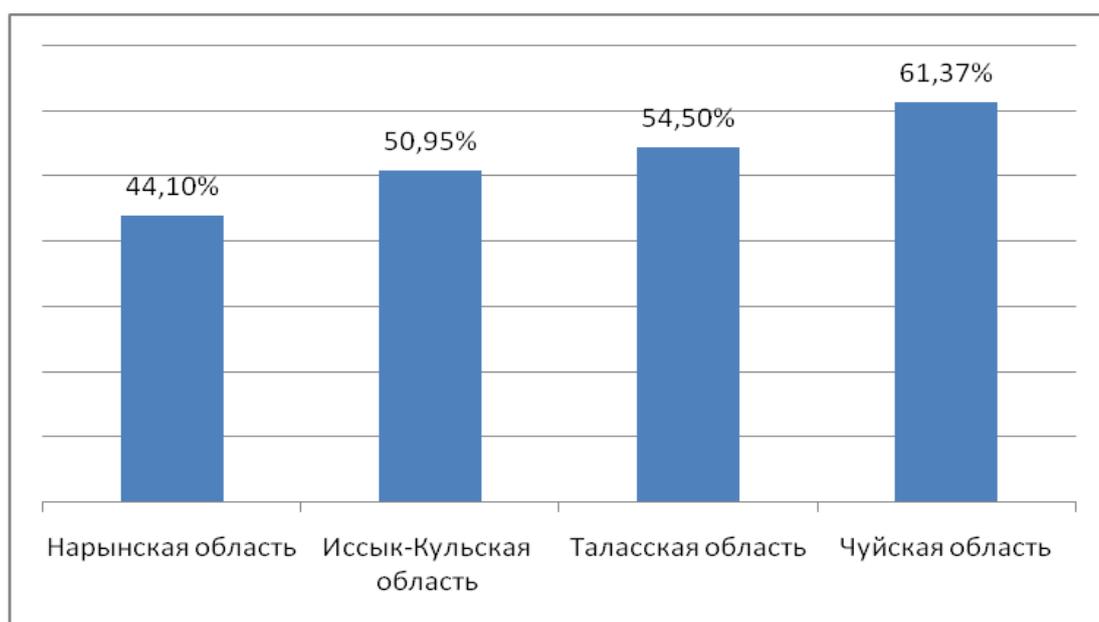


Диаграмма 2. Анализ вирусоносительства на ящур среди крупного рогатого скота

Из диаграммы 2 видно, что во всех областях среди крупного рогатого скота вирусоносительство достигает больше 40%, что свидетельствует о неблагополучии хозяйств, где ранее были зарегистрированы вспышки ящура. Обращает на себя внимание то, что пробы крови были взяты от вакцинированных животных. Это говорит о недостаточной иммуногенности использованных вакцин, либо были нарушены перевозка и правила вакцинации животных.

В связи с тем, что в приграничных зонах Казахстана были случаи вспышек ящура, нами изучено эпизоотическое состояние животных по данной болезни. Проведено исследование сывороток крови КРС и МРС, доставленных из Республики Казахстан на наличие ЗАВС неструктурных белков вируса ящура методом ИФА.

При исследовании 203 сывороток крови КРС у 75 были выявлены неструктурные белки вируса ящура, или в 36,9% случаев от общего числа исследованных проб. При исследовании 210 сывороток крови МРС в 43 пробах

выявлены неструктурные белки вируса ящура, или 20,4% от общего числа исследованных проб. Среди исследованных сывороток крови были образцы от вакцинированных животных (7 проб КРС, 7 проб МРС), в которых содержались неструктурные белки вируса ящура. Как показали диагностические исследования, Республика Казахстан является неблагоприятной по ящуру. Выявление ЗАВС неструктурных белков вируса ящура у животных Республики Казахстана говорит о представлении определенной угрозы для соседних стран.

В главе 4 «СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА» изложен материал по изучению иммуногенной активности противоящурных вакцин. Для этого исследовались сыворотки крови животных вакцинированных вакцинами производства ЗАО «Алтын-Тамыр», а также индийского происхождения Ovac Raksha Trivalent.

С целью изучения напряженности и продолжительности поствакцинального иммунитета у животных вакцинированных вакциной производства ЗАО «Алтын-Тамыр», проводили отбор сыворотки крови у 36 голов КРС из разных половозрастных групп. Сыворотки крови отбирали на 0, 14, 30 день и через 6 месяцев после вакцинации трехвалентной вакциной. Вакцинацию проводили двукратно с трехнедельным перерывом. Исследование титров антител проводили с помощью серологических реакций (РСК и ИФА).

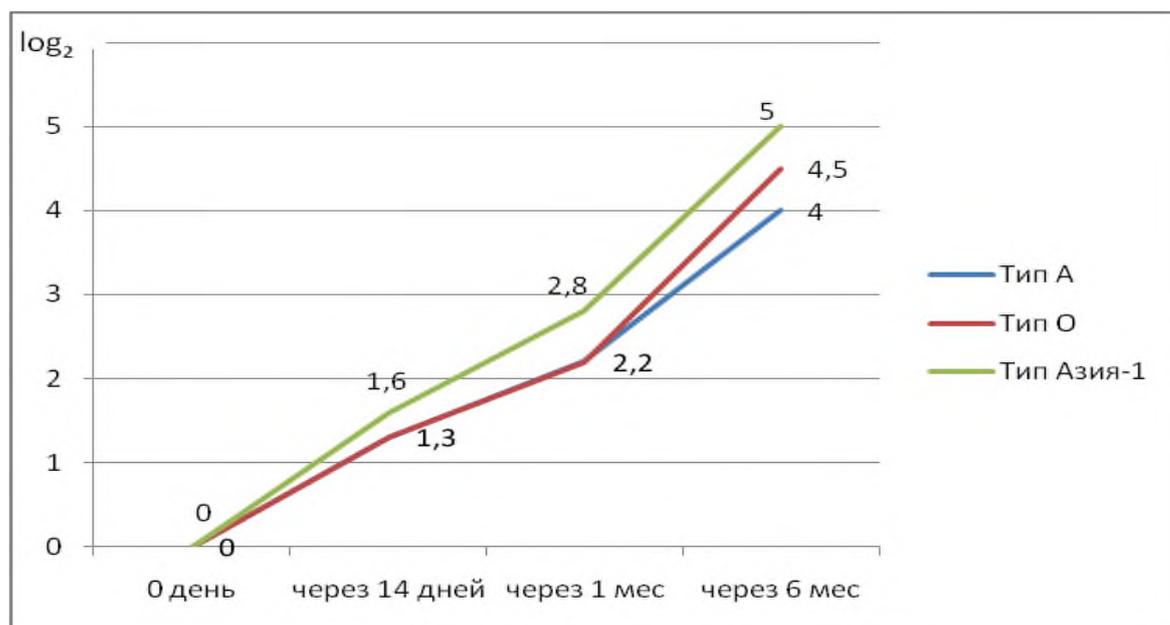


Диаграмма 3. Динамика титра антител в крови вакцинированных животных в РСК

Из диаграммы 3 видно, что в РСК титр антител повышался уже на 1-м месяце после вакцинации. Через 6 месяцев титр антител составлял 4-5 log в РСК. Это свидетельствует о высокой иммуногенности вакцины.

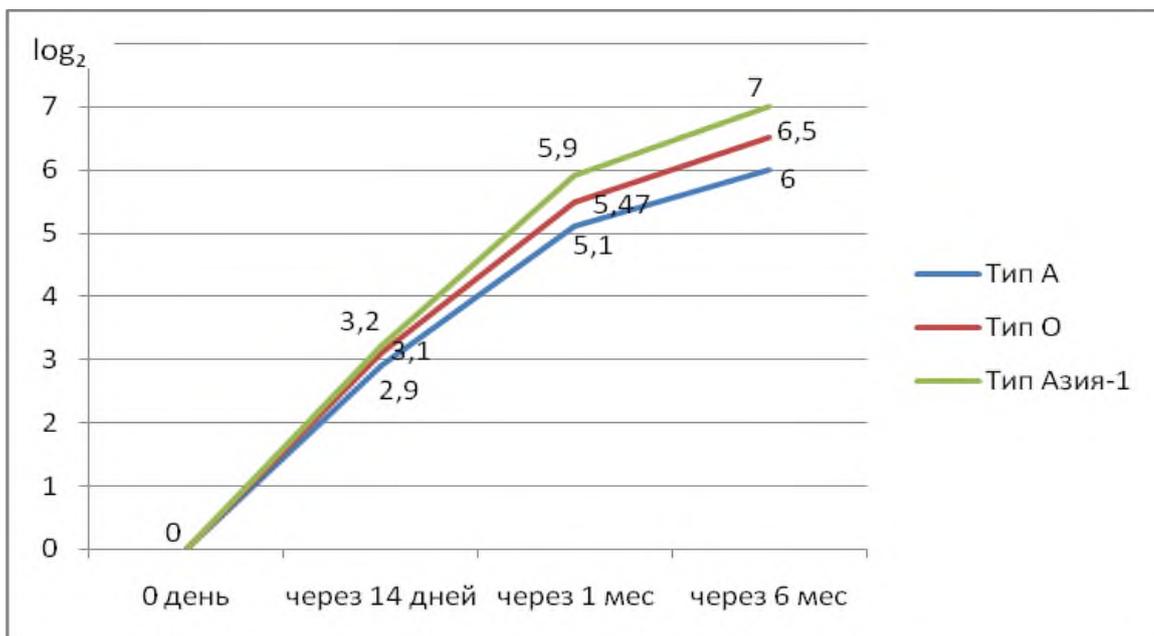


Диаграмма 4. Динамика титра антител в крови вакцинированных животных в ИФА

В ИФА наблюдается также закономерность роста титра антител ко всем типам вируса ящура и достигал до 6-7 log спустя 6 мес. после вакцинации, что говорит о высокой иммуногенности трехвалентной вакцины (диаграмма 4).

Следует учесть, что в условиях массовых вспышек ящура в соседних неблагополучных хозяйствах и частном секторе, а в опытном хозяйстве где проходило испытание вакцин мы не наблюдали заболевание. Животные во время проведения исследований оставались клинически здоровыми. Это свидетельствовало о том, что напряженность поствакцинального иммунитета у животных соответствовала требованиям, предъявляемым к противоящурным вакцинам.

В 2008 году в республике проводилась вакцинация животных трехвалентной вакциной Индийского производства Raksha Ovac Trivalent, изготовленной из штаммов А Ирак 22/64, О Паназия и Азия-1 WBN.

Для изучения иммуногенности данной вакцины нами проведена вакцинация 36 голов КРС в НЭБ и исследованы сыворотки крови на наличие антител к вирусу ящура. На нулевой день исследования ни у одного животного не выявлены в пробах крови антитела к вирусу ящура в защищающем титре 1:32. Отдельные пробы показали титр 1:4, т.е. у животных был ранее контакт с вирусом ящура или в их организме все еще циркулирует вакцинный штамм.

Пик титра антител в организме животных наступал спустя 2 месяца исследования и составил 4,6-4,91 \log_2 , что является недостаточным для полной защиты животных от заражения вирусом ящура. Спустя 3 и 4 месяца исследования титр антител снизился незначительно, а спустя 5 месяцев титр антител снизился от 0,2 - 0,5 \log_2 . Спустя 6 месяцев исследования титр антител упал до 4,11-3,3 \log_2 . Это недопустимо низкий уровень титра антител к вирусу ящура.

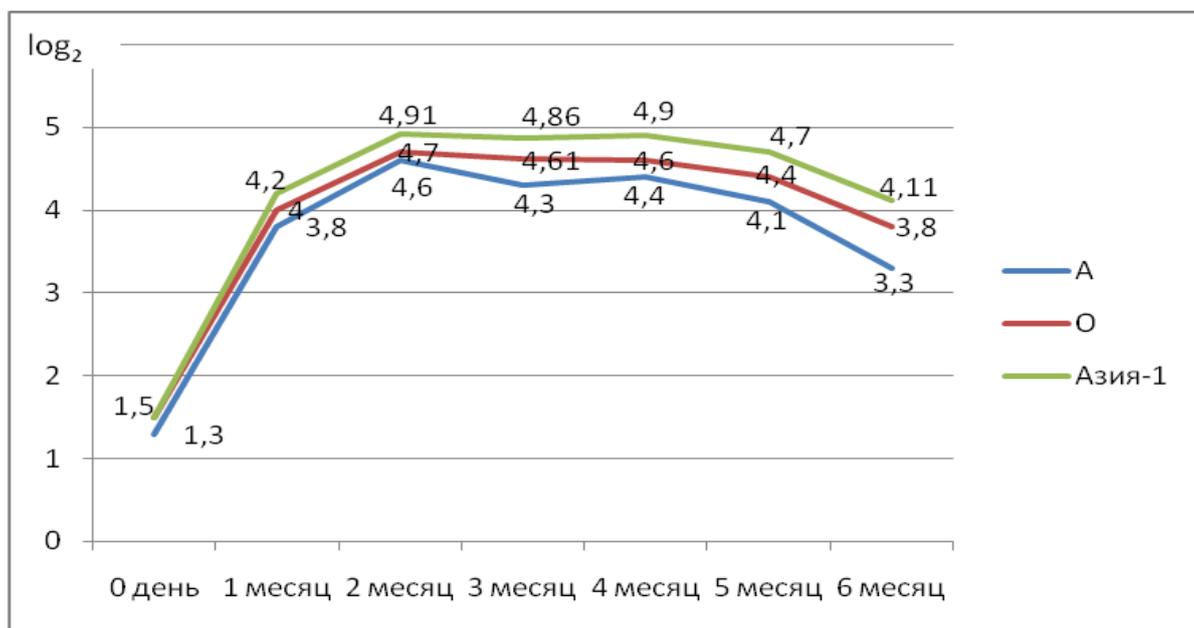


Диаграмма 5. Динамика титра антител к вирусу ящура в ИФА

Испытанная вакцина Индийского производства Raksha Ovac Trivalent изготовленный из штаммов А Ирак 22/64, О Паназия и Азия-1 WBN показала, что она недостаточно эффективна для проведения профилактических мероприятий против ящура в Кыргызской Республике.

С целью получения местного штамма вируса ящура проведено выделение и адаптация изолята на перевиваемой культуре клеток ВНК-21. Для изучения репродукции исследуемого изолята ВЯ были использованы перевиваемые КК различного происхождения – почки теленка, почки ягненка и почки сирийского хомячка.

В результате исследований установлено, что наиболее чувствительной культурой является ВНК-21. В третьем пассаже при его продолжительности 24 часа получен наивысший титр (4,5 lg ТЦД₅₀ (1мл) накопления вирусной массы).

Таблица 10 - Культивирование вируса ящура на культурах клеток

Пробы и пассаж	Продолжит. ЦПД, (час.)	Тип клеток	Титр, lg ТЦД ₅₀ (1мл)	Активность в РСК
1 пассаж	34	ВНК-21	3,25	1:4
2 пассаж	32	ВНК-21	3,5	1:8
3 пассаж	24	ВНК-21	4,5	1:16

Афты титр 2.75 lg ТЦД₅₀ (1мл)

$M \pm m = 4,11 \pm 0,37$; критерий достоверности (t) титра вируса = 11,1 из таблицы Стьюдента уровень значимости $P < 0,001$.

Таким образом, в результате многократных опытов эпизоотический штамм вируса ящура был адаптирован к культуре клеток ВНК-21. В ходе исследований из доставленных патологических материалов на культуре клеток был выделен штамм, и назван «Иссык-Куль 2004» типа О.

ВЫВОДЫ

1. С 2006-2011 гг. регистрировались вспышки ящура среди сельскохозяйственных животных вызванные вирусом ящура типа О, совместно с ФГУ «ВНИИЗЖ» на территории республики выделен вирус ящура типа О, который относится к Паназиатской группе 2.

2. Исследовано в 2010-2011 г. 1870 сывороток крови КРС (из них 1429 проб от вакцинированных животных) – вирусоносительство составило 62%; 424 сывороток крови МРС (из них 29 проб от вакцинированных животных) – вирусоносительство составило 14%,. В 203 пробах сывороток крови КРС и 210 пробах МРС из приграничных хозяйств Республики Казахстан средний показатель вирусоносителей составил 30%, что характеризует республику как неблагополучный по ящуру.

3. Установлено, что происходит миграция вируса ящура при совместном содержании больных животных разного вида.

4. Определена длительность вирусоносительства у переболевших животных, которая составляет 1 год.

5. Изучена иммуногенная активность двух вакцин:

а) вакцина производства ЗАО «Алтын-Тамыр», через 6 месяцев после вакцинации животных титр антител в сыворотке крови составлял 6-7 log в ИФА и 4-5 log в РСК, что свидетельствует о высокой ее иммуногенности.

б) трехвалентная вакцина Индийского производства Raksha ovac trivalent, через 6 месяцев после вакцинации животных титр антител в сыворотке крови составлял 3,3-4,11 log что свидетельствует о недостаточной иммуногенности препарата.

6. Выделен и адаптирован новый штамм вируса ящура «Иссык-Куль 2004» типа О, который планируется использовать в приготовлении отечественной противоящурной вакцины.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты диссертационной работы могут быть использованы при организации и проведении профилактических мероприятий по борьбе с ящуром и оздоровлении неблагополучных пунктов:

1. Перед проведением профилактических вакцинаций в ветеринарной практике рекомендовано провести анализ на наличие 3 АВС неструктурных белков, что позволит повысить эффективность профилактических мероприятий.

2. Вакцинацией против ящура необходимо охватывать всех восприимчивых к вирусу ящуру животных.

3. Рекомендован метод оздоровления животных в республике для определения страны как «свободного» от ящура в целях нормализации внешних торговых отношений.

4. В целях предотвращения перезаражения ящуром рекомендовано дифференцировать вакцинированных животных от инфицированных после переболевания животных в течение года.

5. Подготовлены рекомендации по профилактике ящура.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Акматова, Э. К.** Ящур свиней / Э. К. Акматова, И. У. Сааданов // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ им. А. Дуйшеева. – Бишкек, 2007. - № 2. – С. 112-115.

2. **Нургазиев, Р. З.** Межвидовая миграция вируса ящура / Р. З. Нургазиев, Н. Т. Джапаралиев, Т. Белеков, И. У. Сааданов // В материалах конференции «Биотехнология в Казахстане и перспективы инновационного развития». – Алматы, 2008. – С. 554-557.

3. **Сааданов, И. У.** Распространение вируса ящура и его профилактика / И. У. Сааданов // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ им. А. Дуйшеева. – Бишкек, 2009. - № 1. – С. 158-161.

4. **Абдыкеримов, Н. К.** Вероятность возникновения ящура / Н. К. Абдыкеримов, И. У. Сааданов // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина, посвященный 90-летию д.в.н., профессора А. Алдашева. – Бишкек, 2009. - №2(13)– С. 112-114.

5. **Сааданов, И. У.** Оценка риска заноса вируса ящура с мясной продукцией / И. У. Сааданов // Вестник Кыргызского научно-

исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева. – Бишкек, 2010. - № 2. – С. 91-93.

6. Сааданов, И. У. Выявление у животных неструктурных белков вируса ящура / И. У. Сааданов // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева. – Бишкек, 2010. - № 3. – С. 76-79.

7. Сааданов, И. У. Определение роли мелкого рогатого скота в распространении вируса ящура среди крупного рогатого скота, выявлением ЗАВС неструктурных белков / И. У. Сааданов // Сборник научных трудов КазНИВИ, посвященный 20-летию Независимости Казахстана. – Алматы, 2011. – Том LVII. – С. 239-242.

8. Сааданов, И. У. Применение 3 АВС неструктурных белков вируса ящура в дифференциации вакцинированных животных от инфицированных / И. У. Сааданов // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева. – Бишкек, 2011. - № 4. – С. 194-196.

9. Нургазиев, Р. З. Эпизоотологическое проявление ящура у яков / Р. З. Нургазиев, Н. Т. Джапаралиев, И. У. Сааданов // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева. – Бишкек, 2011. - № 4. – С. 180-183.

Сааданов Искендер Усенбековичтин «Шарп ылаңдаткычынын түрдүү малдардын арасында миграциясы жана өзгөчөлүк алдын алуу чаралары» темасындагы ветеринария илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу диссертациясынын 06.02.02. – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикология жана иммунология адистиги боюнча

РЕЗЮМЕСИ

Негизги сөздөр: шарп, түрдүү малдардын арасындагы миграция, шарп ылаңдаткычынын ЗАВС туруктуу эмес белоктору, вирус сактоочулук.

Изилдөөнүн объектиси: ылаңдаган малдар, патологиялык материал (афтылар), малдардын канынын сары суусу.

Иштин максаты: Шарп ылаңдаткычынын түрдүү айыл чарба малдарынын жана жапайы жаныбарлардын арасындагы миграциясын изилдөө жана ылаңдаткычты аныктоо. Республиканын аймагында бөлүнүп чыгарылган шарп ылаңдаткычынын О тибине кирген штаммын изилдөө.

Изилдөөнүн ыкмалары: эпизоотологиялык мониторинг, серологиялык, молекулярдык-биологиялык, вирусологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы: Кыргыз Республикасында биринчи жолу вирусту организмде сактап калуусун аныктоо үчүн эмделген жана эмделбеген жаныбарларды шарп ылаңдаткычынын ЗАВС

туруктуу эмес белокторуна изилдөө жүргүзүлдү. Биринчи жолу жапайы жаныбарлардын жана топоздордун жуктургучтугунун мүмкүндүгүн аныктоо үчүн ылаңдаткычка каршы антителолору изилденген. Түрдүү малдардын бир короодо турушу шарп ылаңдаткычынын миграциясына алып келет. 2011 жылдын 29 апрелинде № 1359 патенти менен бекитилген «Ыссык-Көл-2004» жаңы штаммы алынган. Бул штамм жергиликтүү эмдөө каражатын даярдоого колдонулат.

Колдонуу чөйрөсү: эпизоотологиялык, вирусологиялык жана ветеринардык практика.

РЕЗЮМЕ

диссертации Сааданова Искендера Усенбековича на тему «Межвидовая миграция вируса ящура и специфическая профилактика» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ключевые слова: ящур, межвидовая миграция, ЗАВС неструктурные белки вируса ящура, вирусоносительство.

Объект исследования: восприимчивые животные, патологический материал (афты), сыворотка крови животных.

Цель работы: Изучить межвидовую миграцию вируса ящура среди сельскохозяйственных и диких животных и идентифицировать возбудителя ящура. Изучить штамм вируса ящура типа «О», выделенного на территории республики.

Методы исследования: эпизоотологический мониторинг, серологический, молекулярно-биологический, вирусологический.

Полученные результаты и их новизна: Впервые в Кыргызской Республике исследовано наличие ЗАВС неструктурных белков вируса ящура у вакцинированных и не вакцинированных животных с целью определения их на вирусоносительство. Впервые выявлены антитела к вирусу ящура у диких парнокопытных и яков, и установлено, что они также могут быть переносчиками ящура. Установлено, что при совместном содержании разных видов животных происходит межвидовая миграция вируса ящура. Получен новый штамм «Иссык-Куль-2004», подтвержденный патентом №1359 от 29 апреля 2011 года. Штамм может использоваться для приготовления отечественной вакцины.

Область применения: эпизоотология, вирусология и ветеринарная практика.

THE RESUME

Dissertations of Saadanov Iskender Usenbekovich on a theme «Interspecific migration of a foot and mouth disease virus and specific prevention» on competition of a scientific degree of the candidate of veterinary sciences on a speciality 06.02.02 – veterinary microbiology, virology, epizootology, a mycology with micotoxicology and immunology

Keywords: foot and mouth disease, interspecific migration, 3ABC non structural proteins of a foot and mouth disease virus, virus carrying.

Object of research: susceptible animals, a pathological material (aphthas), whey of blood of animals.

The work purpose: to Study interspecific migration of a FMDV among agricultural and wild animals and to identify the activator. To study strain of FMDV type "O", allocated for republic territories.

Research methods: epizootological monitoring, serological, molecular-biological, virologic.

The received results and their novelty: For the first time in the Kirghiz republic presence 3ABC non structural proteins of a FMDV at the vaccinated and not vaccinated animals for the purpose of their definition on virus carrying is investigated. For the first time antibodies to a FMDV at wild artiodactyl and yaks that means are revealed that they also can be virus carriers. It is established that at the joint maintenance of different kinds of animals there is an interspecific migration of a FMDV. It is received new strain "Issyk-Kul-2004" confirmed with the patent №1359 from April, 29th, 2011. The strain can be used for preparation of a domestic vaccine.

Scope: epizootology, virology and veterinary practice.