

Евгений Борисович Никитин

Инновационный Евразийский университет, ректор, доктор ветеринарных наук, профессор, Павлодар, Казахстан

E-mail: rektor@ineu.kz

Людмила Ивановна Проскурина

Приморская государственная сельскохозяйственная академия, профессор Института животноводства и ветеринарной медицины, доктор ветеринарных наук, профессор, Уссурийск, Россия

E-mail: lyudmila_proskur@mail.ru

Илья Игоревич Кулык

Инновационный Евразийский университет, заведующий лабораториями микробиологических и химических процессов, магистр биотехнологии, Павлодар, Казахстан

E-mail: kii_cit-205@mail.ru

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА С ПРИМЕНЕНИЕМ ДИАГНОСТИКУМА ОСПЫ ОВЕЦ

Цель исследования – разработка методов специфической диагностики нодулярного дерматита с применением диагностикума оспы овец. Задачи исследования: определить возможность диагностики нодулярного дерматита крупного рогатого скота (КРС) при использовании средств и методов диагностики оспы овец. Объекты исследования – кожа КРС с клиническими признаками нодулярного дерматита; кожа здоровых животных; сыворотка крови больного и переболевшего скота; сыворотка крови здоровых животных; наборы диагностикумов для РСК и РДП при оспе овец производства НИИ проблем биологической безопасности (пгт. Гвардейский Жамбылской области, Казахстан). Всего исследовано 32 пробы сыворотки крови больных и здоровых животных и 12 проб органотканевого материала с антигеном вируса оспы овец. Все реакции для статистической обработки проводили в пяти вариантах. Исследуемый материал от КРС с клиническими признаками нодулярного дерматита и от здоровых животных и особей с проявлением сходных клинических признаков поражения кожи, но без положительной реакции по вирусоскопии, был получен в районной ветеринарной станции г. Аксу Павлодарской области. В результате исследования было установлено, что нодулярный дерматит является относительно новым и не типичным для Казахстана инфекционным заболеванием КРС. В реакциях диффузионного осаждения и связывания комплемента с использованием диагностических наборов для оспы овец была подтверждена антигенная связь между нодулярным вирусом КРС и вирусом оспы овец. Средства и методы лабораторной диагностики оспы овец могут быть использованы для прижизненной и посмертной диагностики нодулярного дерматита КРС с высокой степенью эффективности и надежности.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, нодулярный дерматит, экзотическое трансграничное заболевание, распространение, реконвалесцентны, диагностика, сыворотка крови, антиген, серологические реакции, оспа овец, набор диагностикумов.

Evgeny B. Nikitin

Dr. Vet. Sci., Prof., Rector, Innovative Eurasian University, Pavlodar, Kazakhstan

E-mail: rektor@ineu.kz

Ludmilla I. Proskurina

Dr. Vet. Sci., Prof., Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Primorsky State Agricultural Academy, Ussuriysk, Russia

E-mail: lyudmila_proskur@mail.ru

Ilya I. Kulik

Master in Biotechnology, Head of Laboratories for Microbiological and Chemical Processes, Innovative Eurasian University, Pavlodar, Kazakhstan

E-mail: kii_cit-205@mail.ru

WORKING OUT THE METHODS FOR THE SPECIFIC DIAGNOSTICS OF NODULAR DERMATITIS USING DIAGNOSTIC SMALLPOX IN SHEEP

The goal of the research is to work out the methods for the specific diagnostics of nodular dermatitis using diagnostic smallpox in sheep. Research objectives is to conduct studies that determine the possibility of diagnostics nodular dermatitis of cattle using the means and methods for diagnostics smallpox in sheep. The study objects were as follows: cattle skin with the clinical signs of nodular dermatitis; good-doers' skin; blood serum of ill and recovered cattle; blood serum of good-doers; sets of diagnostic agents for complement fixation test and diffuse precipitation reaction of smallpox in sheep produced by the Research Institute for Biological Safety Problems (Gvardeysky urban-type settlement of Zhambyl Region, Kazakhstan). In total 32 samples of blood serum from sick and healthy animals with antigen of virus smallpox in sheep and 12 samples of organ tissue material were examined. All reactions for statistical processing were performed in five variants. The test material from cattle with the clinical signs of the nodular dermatitis was obtained at the regional veterinary station of Aksu city, Pavlodar Region. As a result of the research, it was found that nodular dermatitis disease is a relatively new and not typical for Kazakhstan infectious disease of cattle. Consequently, studies have found that in the reactions of diffusion deposition and component fixation with the use of the sets of diagnostic agents for smallpox in sheep, the antigenic relationship between nodular virus of cattle and virus in smallpox was proved. Means and methods of laboratory diagnostics of smallpox in sheep can be used for intravital and postmortem diagnostics of nodular dermatitis of cattle with a high degree of efficiency and reliability.

Keywords: *cattle, nodular dermatitis, exotic trans-boundary disease, spread, convalescents, diagnostics, blood serum, antigen, serological reactions, smallpox in sheep, set of diagnostic agents.*

Введение. Распространение различных болезней животных в Казахстане является одной из наиболее актуальных проблем животноводства республики. Болезни представляют угрозу не только для продуктивности животных, но и для жизни животных в целом [1].

Инфекционный узелковый дерматит – это трансмиссивное заболевание крупного рогатого скота и азиатских буйволов, которое характеризуется поражением кожи в виде узелков. Эта болезнь эндемична по всей Африке и Ближнему Востоку, а с 2015 г. она распространилась на Балканы, Кавказ, юг Российской Федерации, где болезнь продолжает распространяться, несмотря на принятые меры по ее профилактике [2, 3].

Новые вспышки нодулярного дерматита в России были зафиксированы 25 мая 2016 г. в Краснодарском крае. С 29 мая по 12 июня в Республике Дагестан было найдено 15 очагов заболевания, где они были обнаружены на фермах, в которых содержалось в общей сложности 360 645 животных [4].

Первые случаи нодулярного дерматита КРС в Казахстане были зафиксированы в 2016 г. на западе страны. 7 тысяч животных заболели, из них 1 150 умерли. Вирусный нодулярный дерматит был выявлен в Костанайской, Акмолинской, Северо-Казахстанской и Павлодарской областях.

В 2017 г., благодаря усилиям ветеринарных служб, новых вспышек в регионах удалось избе-

жать. Однако новые очаги болезни появились в других регионах страны.

С 2016 по 2018 г. нодулярным дерматитом было поражено большое поголовье КРС и выявлено много очагов заболевания, которые начали распространяться из мест первичных вспышек на границах республики вглубь страны [5].

Нодулярный дерматит – это экзотическое трансграничное заболевание, согласно классификации Международного эпизоотического бюро, оно относится к первой группе особо опасных заболеваний, наряду с сибирской язвой и бешенством, и характеризуется как экономически и социально значимое заболевание. Передача вирусной инфекции осуществляется кровососущими насекомыми, но она также может распространяться и через потребление зараженных кормов или воды, прямым контактом с животными, спариванием или искусственным осеменением [6].

Антигенные свойства, родство и изменчивость вируса нодулярного дерматита изучены не полностью. Антигенно вирус связан с вирусом оспы овец и, возможно, вирусом оспы козы.

При культивировании вируса нодулярного дерматита используются первичные культуры клеток органов ягнят, детей и телят.

Для диагностики вируса нодулярного дерматита в настоящее время используются вирускопия, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлуоресценции, реакция иммунодиффузии в агаровом геле, полимераз-

ная цепная реакция (ПЦР), реакция нейтрализации и непрямые флуоресцентные антитела; выделение вируса путем заражения культуры клеток и его обнаружение с помощью электронной микроскопии; а также постановка биоанализа на естественно восприимчивых животных.

Нодулярный дерматит является относительно новой болезнью, требующей разработки методов диагностики, поэтому изучение возможности диагностировать заболевание с помощью серологических методов диагностики оспы овец является актуальным на сегодняшний день [7, 8].

Из-за сложной эпизоотической ситуации и угрозы дальнейшего распространения нодулярного дерматита на территории Республики Казахстан актуальной задачей является изучение биологических свойств возбудителя с целью разработки высокоэффективных диагностических препаратов и специфических профилактических средств, а также использование серологической диагностики оспы овец с помощью РСК, РДСК, РДП, так как они антигенно связаны с нодулярным дерматитом КРС, что позволило бы в короткие сроки выявить возбудителя и быстро остановить распространение инфекции.

Цель исследования: разработка методов специфической диагностики нодулярного дерматита с применением диагностикума оспы овец.

Задачи исследования: провести исследование, определяющие возможность диагностики нодулярного дерматита КРС при использовании средств и методов диагностики оспы овец.

Объекты и методы исследования. Объекты исследования – кожа КРС с клиническими признаками нодулярного дерматита; кожа здорового КРС; сыворотка крови больного и переболевшего нодулярным дерматитом КРС; сыворотка крови здоровых животных; наборы диагностикумов для РСК и РДП при оспе овец производства НИИ проблем биологической безопасности (пгт. Гвардейский Жамбылской области Республики Казахстан).

Исследуемый материал от КРС с клиническими признаками нодулярного дерматита (кожа и сыворотка крови переболевших животных) был получен в районной ветеринарной станции г. Аксу Павлодарской области. Для контроля специфичности метода использовали материал, полученный в районной ветеринарной станции г. Аксу Павлодарской области от здоровых животных и животных с проявлением сходных клинических признаков поражения кожи, но без положительной реакции по вирусоскопии. Здесь же для прижизненной диагностики у больных

животных были взяты образцы сыворотки крови на разных стадиях инфекционного процесса (начальный период, выраженные признаки заболевания, выздоровление).

Всего исследовано 32 пробы сыворотки крови больных и здоровых животных с антигеном вируса оспы овец и 12 проб органотканевого материала. Все реакции для статистической обработки проводили в пяти вариантах.

В процессе исследования применяли методы вирусоскопии (окраска по методу А.М. Морозова, 1925); РСК в модификации длительного связывания комплемента; РДП по методу Оухтерлони, используя 1 % агар Difco, поддерживая реакцию при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение двадцати четырех часов.

Для получения образцов сыворотки крови отбор производился в стерильные пробирки, которые помещали в термостат при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на три-четыре часа. После отделения сыворотки ее разливали в отдельные стерильные пробирки, при необходимости центрифугировали для осаждения клеток крови и использовали в серологических реакциях для обнаружения антител.

Для исследования в серологических реакциях на обнаружение вирусного антигена нодулярного дерматита КРС использовали участки пораженной кожи, из проб которых была приготовлена 20 % суспензия в физиологическом растворе, которую однократно замораживали и оттаивали, центрифугировали при 4000–5000 об/мин в течение 30 мин и супернатант использовали для исследования.

Результат РСК считали положительным, если в двух пробирках с последовательными разведениями испытуемого материала (сыворотки или органотканевого антигена) была полная (задержка гемолиза 100 %) или выраженная задержка гемолиза, по меньшей мере, на 2 креста в каждой пробирке (гемолиз 50 %) или более выраженная (25–0 % гемолиз). За титр испытуемого материала в этом случае принимали последнее его разведение, вызывающее задержку гемолиза на 50 % и более.

Результат РДП в агаровом геле по методу Оухтерлони считался положительным, если между лунками с исследуемым материалом (органотканевой материал или сыворотка крови) и диагностическим препаратом образовались визуально заметные полосы преципитации. Последнее разведение испытуемого материала, вызывающее проявление линии преципитации, принимали за его титр [9].

При исследовании сыворотки крови диагностические антигены вируса оспы овец вводили в центральные лунки в разведении 1 : 2, в периферических исследуемая сыворотка крови была интактной.

При постановке реакции для проверки специфичности и активности диагностических препаратов делали постановку контрольных проб от здоровых животных.

Серологические реакции РДСК, РДП были использованы для определения специфической активности сыворотки крови животных, а также для выявления и количественного определения специфических антигенов вируса нодулярного дерматита КРС в коже больных животных.

В количественной версии РДСК и РДП исследуемый материал использовали в виде суспензии пораженных участков кожи в разведениях от 1 : 2 до 1 : 24, либо сыворотки в разведениях от цельного до 1 : 32, реакции проводили с соответствующими специфическими и контрольными нормальными диагностическими препаратами,

взятыми в рабочем разведении, и комплементом с использованием его четырехкратного предельного титра в гемолитической системе.

В качественном варианте РДСК и РДП исследуемый материал использовали в разведении 1 : 2.

Статистическую обработку полученных данных проводили разностным методом Стьюдента, описанным В.А. Чистяковым [10].

Результаты исследования и их обсуждение. Как видно из данных, представленных в таблице 1, вирус-специфические антитела, связанные с антигеном вируса *Sheerpx*, были обнаружены в сыворотке крови больных животных в разные периоды заболевания. Так, у животных с выраженными клиническими признаками – в титрах до 1 : 8 в РДСК и в разведениях до 1 : 2 в РДП. У переболевших животных он составил в РДСК до 1 : 16 и РДП до 1 : 4.

Сыворотка крови от животных с другими заболеваниями и сыворотка крови от здорового скота показали отрицательную реакцию.

Таблица 1

Результаты серологических реакций при исследовании проб сыворотки крови больного КРС с антигеном вируса оспы овец

Испытуемые сыворотки крови от животных	Кол-во проб	Антиген вируса оспы овец	
		РДСК	РДП
С выраженными клиническими признаками	12	1 : 2–1 : 8	Ц–1 : 2
Выздоровевших (реконвалесцентов)	4	1 : 4–1 : 16	1 : 2–1 : 4
Больных дерматитом без положительной вирусоскопии	10	–	–
Здоровых	6	–	–

Из данных таблицы 2 видно, что при использовании специфической сыворотки для вируса оспы овец антигены нодулярного дерматита КРС были обнаружены в образцах кожи в титрах от целого до 1 : 8 в РДСК и в разведениях до 1 : 4 в РДП.

Исследования по контролю специфичности препаратов кожи КРС, полученных от здоровых и больных животных с другими кожными заболеваниями, показали отрицательный результат.

Таблица 2

Результаты исследования в РДСК и РДП проб органотканевого материала у КРС

Органотканевой материал	Кол-во проб	Сыворотка к оспе овец	
		РДСК	РДП
Подтвержденный вирусоскопией на наличие оспоподобного вируса	4	1 : 4–1 : 8	1 : 2–1 : 4
С отрицательной вирусоскопией	4	–	–
Контроль (материал от здоровых животных)	4	–	–

В результате проведенных исследований было установлено, что серологические реакции на нодулярный дерматит у КРС могут быть выполнены с использованием средств и методов диагностики оспы овец.

На основании проведенного исследования ниже предлагается схема прямой и ретроспективной серологической диагностики нодулярного дерматита КРС (рис.).

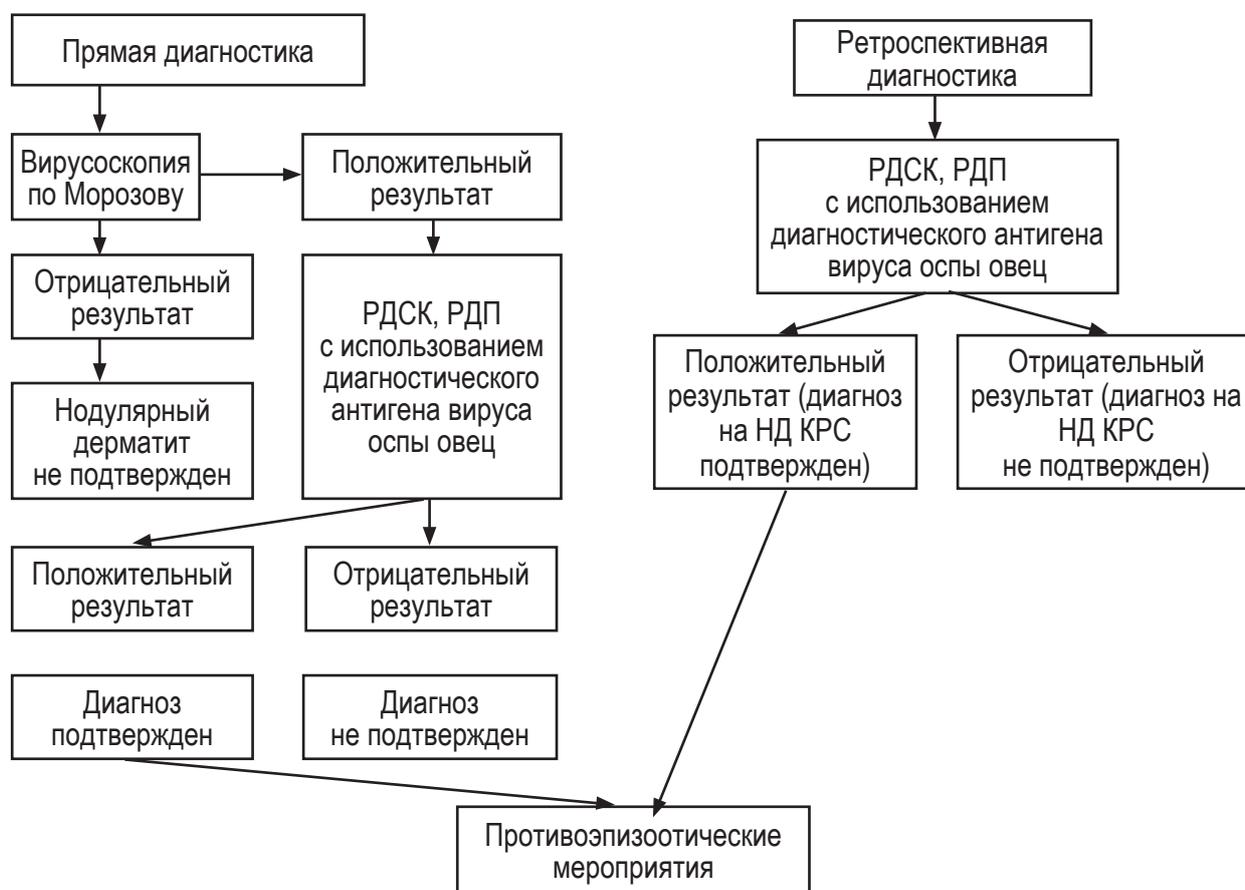


Схема прямой и ретроспективной серологической диагностики нодулярного дерматита КРС

Для прямой диагностики (обнаружения вирусного антигена) в качестве проб патологического материала необходимо использовать кусочки пораженной кожи КРС.

На первом этапе готовят мазок-отпечаток из пораженной кожи на участке, граничащем со здоровой кожей. Мазок окрашивают по методу серебрения по А.М. Морозову.

При отрицательном результате вирусоскопии по А.М. Морозову проводят дальнейшую диагностику на наличие других заразных или незаразных заболеваний, вызывающих дерматиты.

При положительном результате вирусоскопии из участков пораженной кожи готовят суспензию на физиологическом растворе, которую исследуют методами РДСК и РДП с использованием специфических диагностических сывороток при оспе овец. При положительном результате диагноз на нодулярный дерматит КРС считают установленным.

Для ретроспективной диагностики нодулярного дерматита КРС отбирают сыворотки крови от больных и переболевших животных, которые исследуют методами РДСК и РДП с использованием диагностических антигенов, взятых из наборов для диагностики при оспе овец. Положительный результат серологических реакций свидетельствует о болезни или переболевании КРС нодулярным дерматитом.

Этот метод в настоящее время рекомендуется для индикативной и дифференциальной диагностики нодулярного дерматита КРС. С этой целью предлагается к практическому применению для КРС использование разработанной схемы прямой и ретроспективной серологической диагностики заболевания.

Выводы. Нодулярный дерматит является относительно новым и не типичным для Казахстана на инфекционным заболеванием КРС.

В реакциях диффузионного осаждения и связывания комплемента с использованием диагностических наборов для оспы овец была подтверждена антигенная связь между нодулярным вирусом КРС и вирусом оспы овец.

Средства и методы лабораторной диагностики оспы овец могут быть использованы для прижизненной и посмертной диагностики нодулярного дерматита КРС с высокой степенью эффективности и надежности.

Литература

1. Республика Казахстан. О государственном регулировании развития агропромышленного комплекса и сельских территорий: закон от 8 июля 2005 г. № 66-III ЗРК // Казахстанская правда. 2005. 12 июля.
2. Şevik M. Epidemiological and Molecular Studies on Lumpy Skin Disease Outbreaks in Turkey during 2014–2015 // *Transbound Emerg Dis.* 2016. Vol. 64, № 4. P. 6.
3. Saegerman C. Risk of introduction of Lumpy Skin Disease into France through imports of cattle // *Transbound Emerg Dis.* 2019. Vol. 66, № 2. P. 40.
4. Мищенко А.В., Мищенко В.А. Эпизоотическая ситуация по трансграничным и экономически значимым инфекционным болезням КРС в России в 2013–2014 гг. // X Балтийский форум ветеринарной медицины и продовольственной безопасности: тез. конф. (Санкт-Петербург, 18–20 сентября 2014 г.). СПб., 2014. С. 165–167.
5. Обеспечение ветеринарной безопасности в хозяйствах – членах республиканской Палаты казахской белоголовой породы / сост. А.А. Суминов, А.Ю. Мальчевский. Астана, 2015. 54 с.
6. Косарева О.А., Кукушкина М.С., Константинов А.В. и др. Нодулярный дерматит (бугорчатка), клинические признаки при экспериментальном заражении крупного рогатого скота // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. Владимир, 2010. Т. 8. С. 73–83.
7. Орлова Е.С. Совершенствование методов диагностики оспы овец и оспы коз: автореф. ... дис. канд. биол. наук. Владимир, 2007. 23 с.
8. Кульк И.И., Никитин Е.Б. Гетерологическая серологическая диагностика нодулярного дерматита крупного рогатого скота // Мат-лы

V Междунар. науч.-практ. конф. Павлодар, 2020. С. 246–249.

9. Сюрин В.Н. Руководство по ветеринарной вирусологии. М.: Колос, 1966. С. 55–76.
10. Ивченко Г.И., Медведев Ю.И., Чистяков А.В. Задачи с решениями по математической статистике. М.: Дрофа, 2007. 318 с.

Literatura

1. Respublika Kazahstan. O gosudarstvennom regulirovanii razvitiya agropromyshlennogo kompleksa i sel'skih territorij: zakon ot 8 iyulya 2005 g. № 66-III ZRK // *Kazahstanskaya pravda.* 2005. 12 iyulya.
2. Şevik M. Epidemiological and Molecular Studies on Lumpy Skin Disease Outbreaks in Turkey during 2014–2015 // *Transbound Emerg Dis.* 2016. Vol. 64, № 4. R. 6.
3. Saegerman C. Risk of introduction of Lumpy Skin Disease into France through imports of cattle // *Transbound Emerg Dis.* 2019. Vol. 66, № 2. R. 40.
4. Mischenko A.V., Mischenko V.A. `Epizooticheska ya situaciya po transgranichnym i `ekonomicheski znachimym infekcionnym boleznyam KRS v Rossii v 2013–2014 gg. // H Baltijskij forum veterinarnoj mediciny i prodovol'stvennoj bezopasnosti: tez. konf. (Sankt-Peterburg, 18–20 sentyabrya 2014 g.). SPb., 2014. S. 165–167.
5. Obespechenie veterinarnoj bezopasnosti v hozyajstvah – chlenah respublikanskoj Palaty kazahskoj belogolovoj porody / sost. A.A. Suminov, A.Yu. Mal'chevskij. Astana, 2015. 54 s.
6. Kosareva O.A., Kukushkina M.S., Konstantinov A.V. i dr. Nodulyarnyj dermatit (bugorchatka), klinicheskie priznaki pri `eksperimental'nom zara-zhenii krupnogo rogatogo skota // *Trudy Federal'nogo centra ohrany zdorov'ya zhivotnyh.* Vladimir, 2010. T. 8. S. 73–83.
7. Orlova E.S. Sovershenstvovanie metodov diagnostiki ospy ovec i ospy koz: avtoref. ... dis. kand. biol. nauk. Vladimir, 2007. 23 s.
8. Kulyk I.I., Nikitin E.B. Geterologichnaya serologicheskaya diagnostika nodulyarnogo dermatita krupnogo rogatogo skota // *Mat-ly V Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. Pavlodar, 2020.* S. 246–249.
9. Syurin V.N. Rukovodstvo po veterinarnoj virusologii. M.: Kolos, 1966. S. 55–76.
10. Ivchenko G.I., Medvedev Yu.I., Chistyakov A.V. Zadachi s resheniyami po matematicheskoj statistike. M.: Drofa, 2007. 318 s.