УДК 619:616.155.37-022.6

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ АЛЕУТСКОЙ БОЛЕЗНИ НОРОК

Садовникова Е.Ф., Васютович О.В.
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

В статье приводятся данные научно-хозяйственных опытов по применению различных методов диагностики алеутской болезни норок в сравнительном аспекте.

The article presents the scientific data and economic experiences in a comparative perspective on the application of various methods of diagnosis of Aleutian mink disease.

Введение. Начало развития белорусского звероводства относится к середине 50-х годов XX века. В то время отечественная продукция пользовалась спросом как на внутреннем рынке, так и за рубежом. За последние годы звероводческие хозяйства Республики Беларусь выросли в крупные специализированные комплексы, насчитывающие десятки тысяч зверей маточного стада, а вместе с молодняком – более 100 тысяч животных [1, 2].

В настоящее время в республике занимаются звероводством 20 организаций, в том числе 2 зверохозяйства и 5 сельскохозяйственных отделений Белкоопсоюза, 11 организаций коммунальной формы собственности и 2 организации частной формы собственности. Основным объектом разведения в отрасли являются норки. Их удельный вес в общем объеме производства пушнины составляет 99,1% [1].

Перевод клеточного звероводства на промышленную основу выдвинул перед ветеринарной наукой и практикой ряд задач по разработке эффективных методов профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний. В настоящее время эпизоотическая ситуация остается сложной. Такое инфекционное заболевание пушных зверей, как алеутская болезнь, представляет серьезную угрозу и способно нанести ощутимый экономический ущерб звероводству.

Алеутская болезнь представляет серьезную ветеринарную проблему для звероводства как в Республике Беларусь, так и в ряде других стран. Данное заболевание приводит к большим экономическим потерям в связи с высокой гибелью норок, ухудшением качества меха, снижением плодовитости самок, повышенной стерильностью самцов, падежом молодняка и большими затратами на проведение оздоровительных мероприятий [1, 2].

Данная болезнь регистрируется во многих зверохозяйствах Республики Беларусь, в частности в СПК «Остромечево» Брестской области, где и по сей день не удалось искоренить данную проблему. Несомненно, ядром при проведении оздоровительных мероприятий при любом инфекционном заболевании является успешная и качественная диагностика, позволяющая вовремя обнаружить больных животных и вирусоносителей [7].

Алеутская болезнь норок (вирусный плазмоцитоз), (Morbus aleutica lutreolarum) – хроническая контагиозная иммунокомплексная болезнь, характеризующаяся распространенной пролиферацией плазматических клеток (плазмоцитоз), высоким уровнем подъема иммуноглобулинов, прогрессирующим исхуданием, кровотечениями из носа и рта, жаждой, явлениями геморрагического диатеза, анемией, резорбцией эмбрионов у самок, гломерулонефритом, артериитом и гепатитом [3, 4].

Данное заболевание приводит к большим экономическим потерям в связи с высокой гибелью норок, ухудшением качества меха, снижением плодовитости самок, повышенной стерильностью самцов, падежом молодняка и большими затратами на проведение оздоровительных мероприятий. На территории Республики Беларусь алеутская болезнь норок регистрируется повсеместно, поражая в отдельных норководческих хозяйствах до 32–54% поголовья [7].

Возбудитель болезни – ДНК-геномный вирус из семейства Parvoviridae. Вирионы имеют форму икосаэдра и размер 20–25 нм. Антигенной вариабельности и родства его с другими вирусами не установлено. Спектр патогенности ограничен норками и хорьками. Вирус относится к 1-й группе по устойчивости к дезсредствам.

У больных зверьков наблюдаются следующие клинические признаки болезни: угнетение, ухудшение аппетита, жажда, дегтеобразные фекалии, периодические кровотечения изо рта и носа, бледность видимых слизистых оболочек, исхудание.

При вскрытии павших норок обнаруживают, что почки увеличены, серо-желтого цвета с множественными беловатыми и коричневатыми очажками, что придает почке своеобразную крапчатость. По мере развития процесса эти очажки увеличиваются в размерах и приобретают вид целых полей, проникающих в мозговой слой. Граница слоев несколько стерта.

При хроническом течении болезни почки нередко даже уменьшены в объеме, серо-желтого цвета, сморщены, приобретают вид тутовых ягод. Капсула также, как и при остром течении, снимается легко. Таким образом, в почках развивается нефрозо-нефрит. Лимфатические узлы увеличены, отечны, светло-серого или красно-серого цвета. Селезенка увеличена в 2–10 раз, иногда пятнистая, с напряженной капсулой. Печень увеличена в 1,5–2 раза по сравнению с нормальной, полнокровна, красно-коричневого цвета (цвет красного дерева), на разрезе рисунок дольчатого строения нечеткий, выражена мускатность [2].

Основным методом диагностики алеутской болезни в Республике Беларусь на сегодняшний день является РИЭОФ (реакция иммуноэлектроосмофореза) [5, 6, 8]. Однако в связи с актуальностью данного

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

заболевания в настоящее время возникла необходимость в изучении других методов, которые не уступают по чувствительности основному, а также являются экономически выгодными в использовании.

Материалы и методы исследований. Экспериментальные исследования по теме данной работы были выполнены в 2012–2013 гг. в условиях зверохозяйства СПК «Остромечево» Брестского района и на кафедре болезней мелких животных и птиц УО ВГАВМ. В Остромечевском зверохозяйстве выращиваются норки 8 цветовых групп: темно-коричневый стандарт, пастель, паломино, сапфир, сканблэк, сканбраун, вельвет и белая. Данные о поголовье норок в динамике развития за последние 3 года приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Движение поголовья основного стада, выход молодняка норки по зверохозяйству СПК «Остромечево»

Год, показатели	Основное стадо	Основное стадо самок	Молодняк	Выход щенков на 1 самку
2010	1245	5565	603	4,4
2011	1338	5945	772	3,9
2012	1023	4655	356	3,9

Из данных таблицы 1 видно, что поголовье норок в 2011 году по сравнению с 2010 годом увеличилось за счет роста численности приплода, но уже в 2012 году снизилось из-за уменьшения приплода. Выход щенков норок в 2010 году составил 4,4 на 1 самку, в 2011 году уменьшился и составил 3,9 щенка, а в 2012 году остался на прежнем уровне – 3,9 щенка на 1 самку.

С целью установления причин заболевания алеутской болезнью и гибели норок в зверохозяйстве СПК «Остромечево» были применены следующие методы диагностики:

– эпизоотологический;
– клинический (ежедневный осмотр, выборочная термометрия);
– патологоанатомический (осмотр трупа, описание патизменений органов по системам);
– лабораторные методы (серологическая диагностика алеутской болезни у норок в реакциях РИЭОФ и ИФА);

Для разработки методов диагностики руководствовались принципами комплексного подхода и экономической целесообразности.

Объектом исследования служили больные алеутской болезнью норки, диагноз которых был подтверждён серологическим исследованием крови в реакциях РИЭОФ и ИФА.

Серологическое исследование крови.

Первый день исследования.

Кровь для исследования брали из периферических сосудов пальца путем срезания коготка. После этого проводили постановку РИЭОФ.

Постановка РИЭОФ

Для РИЭОФ применяли мединал-вероналовый раствор. Мединал-вероналовый буфер готовили путем растворения 10,32 г мединала в 300 см^3 дистиллированной воды и последующего добавления 1,84 г веронала. Раствор помешивали и держали в водяной бане при 40ºС до полного растворения веронала. Затем раствор доводили дистиллированной водой до объема 1 литр и измеряли pH. В том случае, если реакция приготовленного мединал-вероналового раствора получилась ниже 8,6, добавляли мединал, а если выше – веронал. После добавления мединала или веронала каждый раз определяли pH раствора, доводя его до нужной концентрации. Буферный раствор использовали в течение трех-четырех дней. При ухудшении линий преципитации в контроле заменяли раствор и проверяли активность диагностикума.

На чистую обезжиренную стеклянную пластинку размером 8 х 15 см наливали 30 см^3 1%-го горячего раствора агара, разведенного пополам дистиллированной водой. После застывания в агаровом геле делали лунки при помощи пробойника, соединенного трубкой с вакуумным насосом. Всего на агаровой пластинке делали 206 лунок с таким расчетом, чтобы получилось десять полных горизонтальных рядов по 20 лунок в каждом и одиннадцатый нижний неполный (для контроля) с шестью лунками, размещенными парами слева, справа и в середине ряда. Диаметр лунок должен быть 2,5 мм, глубина – 2,5 мм, фактический объем около 0,01 см^3, расстояние между центрами соседних лунок каждого горизонтального ряда – 6 мм. Края агаровой пластинки на расстоянии не менее 1 см не должны иметь лунок.

Для более точного расположения лунок использовали заранее размеченную миллиметровую бумагу, которую помещали под стеклянную пластинку, или накладывали направляющую пластинку из оргстекла с просверленными для пробойника отверстиями. При единичных исследованиях можно использовать предметные стекла или стеклянные пластинки меньшего размера. После разлива агара пластинки использовали не позднее двух часов при хранении во влажной камере (камера для электрофореза, эксикатор и т.д.)

Кровь для исследования у норок брали в стеклянные капилляры, которые с одного конца закрывали пластилином и центрифугировали при 1500–3000 об/мин в течение 5 минут. Затем отламывали часть капилляра с сывороткой и, не допуская ее разбрызгивания, осторожно выдували при помощи специальной груши в очередную лунку четного вертикального ряда. При необходимости можно использовать цельную кровь, осадок эритроцитов, гемолизированную или хилезную сыворотку. Для контроля реакции в четные лунки 11 горизонтального неполного ряда вносили положительную контрольную сыворотку. Антиген закапывали пастеровской пипеткой во все лунки нечетных вертикальных рядов, включая и контрольные, и помещали пластинку в камеру электрофореза с таким расчетом, чтобы ток проходил параллельно горизонтальным рядам. К краям пластинки прикрепляли по 4–5 полосок фильтровальной бумаги и

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

опускали их свободные концы в ванны с буферным раствором, наполненные примерно на 2/3 объема. Камеру закрывали крышкой и подключали к выпрямителю тока так, чтобы положительный полюс был справа (со стороны крайнего вертикального ряда с сыворотками). Сила тока должна быть 10–15 миллиампер на каждую стеклянную пластинку (0,08–0,12 ма/см^2), напряжение на выходе – 120–220 в. Требуемые параметры тока (по показаниям приборов выпрямителя) достигаются путем изменения количества полосок фильтровальной бумаги, если регулировка тумблером не приводит к желаемому результату.

Предварительную читку реакции проводили через 15–45 минут после размещения пластинки в силовом поле. Для этого отключали от сети выпрямитель, открывали крышку камеры, вынимали пластинку и просматривали ее в косопроходящем свете на темном фоне в затемненном помещении.

Положительная РИЭОФ характеризуется наличием тонкой четкой прямой линии преципитации в горизонтальных рядах геля примерно на середине расстояния между лунками с сывороткой и антигеном. Расплывчатые полосы в геле, диффузные или ограниченные изменения его прозрачности, а также отсутствие изменений расценивается как сомнительный результат.

Второй день исследования.

Окончательную читку реакции проводили после экспозиции стекла с агаровой пластинкой в гипертоническом растворе (12,5%) хлористого натрия в течение 7–10 мин и последующего отмывания в дистиллированной воде (6–18 ч) для удаления неспецифических полос сывороточного белка.

При обнаружении едва различимой линии преципитации результат РИЭОФ считали сомнительным. В этом случае реакцию ставили повторно с новой пробой сыворотки. Подтвержденный сомнительный результат РИЭОФ засчитывали как положительный.

Показания РИЭОФ признавали действительными, если на данной пластинке в 11 горизонтальном ряду во всех трех контролях была ясно выражена линия преципитации.

Положительный результат РИЭОФ указывает на заражение норок вирусом алеутской болезни и на необходимость изолированного их содержания до момента убоя.

Результат исследования крови норок в хозяйствах записывали в акте с указанием даты проведения исследований, количества и процента реагирующих норок по отделениям и бригадам, наименования диагностикума, номера его серии, контроля, предприятия-изготовителя, срока годности, фамилии, имени и отчества ветработника, проводившего исследования.

Третий день исследования.

Проводили исследование крови норок в ИФА.

Прямой ИФА

1. В лунках панелей адсорбировали антигены (исследуемый материал). В качестве контроля использовали лунки с адсорбированным положительным контрольным образцом, в котором обязательно содержится искомый антиген, и отрицательным контрольным образцом, заведомо не содержащим исследуемого антигена.

2. Блокировали свободные места связывания, оставшиеся на твердой фазе, с помощью БСА казеина и др. (для предотвращения неспецифической сорбции конъюгата на твердой фазе).

3. В лунки вносили меченные ферментом антитела (конъюгат), инкубировали. Связывание конъюгата с твердой фазой будет происходить лишь в случае комплементарности обоих компонентов системы. После инкубации с конъюгатом лунки отмывали, удаляя, таким образом, не связавшуюся часть конъюгата.

4. Затем в лунки вносили субстрат, специфичный для используемого фермента, и инкубировали. По достижении оптимального уровня окрашивания в лунках с положительным контролем ферментативную реакцию останавливали.

5. Учет реакции. Сначала результаты реакции учитывали визуально. Для более точного учета результатов интенсивность окрашивания оценивали на ИФА-ридере с соответствующим светофильтром. По результатам проведенного анализа строили график зависимости оптической плотности от концентрации.

Результаты исследований.

В результате обследования и изучения документации за последние 5 лет было установлено, что в 2008 году средний % больных алеутской болезнью норок составил 6,7%; за 2009 год – 14,9%; за 2010 год – 36,5%; за 2011 год – 17,3% и за 2012 год – 19%. Следовательно, можно сделать вывод, что с годами не только не удалось снизить распространение данного заболевания, но, напротив, процент зараженных норок только возрос. Пик заболеваемости приходился на 2010 год.

Наиболее вероятными причинами подобной картины мы считаем завоз большого количества положительно реагирующих норок из других государств и зверохозяйств. Это подтверждают результаты исследования, проведенного в период с 21 августа по 20 сентября 2012 года, которые показали, что из всех норок, доставленных из Пинского зверохозяйства, 44,3% положительно реагировали на алеутскую болезнь; среди норок, доставленных из России – 0,6%, а из Калинковичей – 2,2%. В результате в общей сложности около 50% (а именно 47,1%) привезенных зверьков оказались положительно реагирующими на алеутскую болезнь.

В результате этого в зверохозяйстве СПК «Остромечево» наблюдается высокая заболеваемость норок алеутской болезнью. У всех инфицированных норок регистрируется следующая клиническая картина: угнетение, анорексия, жажда, диарея, фекалии дегтеобразные, кровоточивость десен, кровотечения изо рта и носа, анемичность видимых слизистых оболочек, подушечки лап бледно-розового цвета, у некоторых зверьков – с желтушным оттенком, заметно истощение, на слизистой рта и твердого неба – мелкие язвы. У отдельных норок нарушена координация движений, отмечаются парезы и параличи конечностей. У самок часто регистрируются аборты, пропустование, рождение мертвых щенков, гибель

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

молодняка в первые дни жизни, рассасывание плодов, а также потеря материнского инстинкта. Все больные норки были отправлены на убой.

На вскрытии было обнаружено: отмечается нефрозо-нефрит, почки увеличены, серо-желтого цвета с множественными беловатыми и коричневатыми очажками. У некоторых норок эти очажки имеют вид целых полей, проникающих в мозговой слой. Граница между корковым и мозговым слоями стерта. Капсула снимается легко. Лимфатические узлы увеличены, отечны, светло-серого, иногда красно-серого цвета. Селезенка увеличена, иногда пятнистая, капсула напряжена, при разрезе края разрезанной капсулы не сходятся, паренхима выбухает. Печень увеличена, полнокровна, красно-коричневого цвета, с рисунком мускатного ореха. Желчный пузырь пустой, воспален. На деснах, твердом и мягком небе у некоторых норок множественные мелкие язвочки с коричневатым дном, покрытые «дифтеритической» пленкой. В желудке и кишечнике – дегтеобразная масса. На их слизистой оболочке – мелкие геморрагические эрозии.

На основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений был поставлен предварительный диагноз – алеутская болезнь норок. Однако известно, что многие норки могут являться вирусоносителями и клинические признаки у таких зверьков не регистрируются, кроме того, что показатели щенения самок в этих случаях бывают в среднем на 0,5–2,5 щенка ниже, чем у здоровых. Выявить их возможно только путем постановки серологических реакций. Поэтому для уточнения диагноза были проведены серологические исследования – РИЭОФ и ИФА. Результаты исследований приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Результат исследования крови норок в РИЭОФ

Дата исследования	Цветовая гамма норки	% положительно реагирующих
Февраль 2013 год	СТК	1,7
Февраль 2013 год	СТЧ	16,5
Февраль 2013 год	Пастель	33,1
Февраль 2013 год	Белая	0,5
Февраль 2013 год	Сапфир	2,41
Февраль 2013 год	Сканблэк	3,7
Февраль 2013 год	Паломино	2,9

В результате выявили, что из всех исследуемых 1109 норок 61,41% положительно реагирует на алеутскую болезнь в РИЭОФ. После постановки РИЭОФ провели исследование крови от тех же норок в реакции ИФА. Данное исследование было проведено в условиях зверохозяйства СПК «Остромечево» впервые с экспериментальной целью, для сравнения чувствительности данного метода с РИЭОФ и проверки результатов первого исследования. После постановки реакции проводили учет результатов. Оценка проводилась визуально, по изменению цвета исследуемых лунок. В результате был получен следующий результат.

Таблица 3 – Результат исследования крови норок в ИФА

Дата исследования	Цветовая гамма норки	% положительно реагирующих
Февраль 2013 год	СТК	1,7
Февраль 2013 год	СТЧ	16,5
Февраль 2013 год	Пастель	33,75
Февраль 2013 год	Белая	0,75
Февраль 2013 год	Сапфир	2,41
Февраль 2013 год	Сканблэк	3,7
Февраль 2013 год	Паломино	3

В результате исследования крови норок мы получили следующий результат: из 1109 норок 61,81% положительно реагирует в ИФА, что немного превышает процент, полученный после проведения РИЭОФ.

Заключение. Проведенными исследованиями установлено, что чувствительность нового, не внедренного в практику СПК «Остромечево» метода ИФА, ничем не уступает традиционному РИЭОФ, и он может быть использован в качестве основного в производственной практике.

Также известен ряд преимуществ ИФА перед РИЭОФ: требуется меньше трудозатрат, стоимость диагностики ниже по сравнению с РИЭОФ. Экономическая эффективность метода ИФА составила 10,2 рубля на рубль затрат.

Литература. *1. Берестов, В.А. Звероводство / В.А. Берестов – СПб: Издательство «Лань», 2002 – 480 с. 2. Герасимчик, В.А. Инфекционные и незаразные болезни пушных зверей и кроликов / В.А. Герасимчик – Витебск: ВГАВМ, 2012. – 190 с. 3. Заразные болезни пушных зверей: справочник / А.И. Ятусевич [и др.] – Витебск: ВГАВМ, 2010. – 138 с. 4. Инфекционная патология животных / А. Я. Самуйленко [и др.] – Москва: Академкнига, 2006. – 1911 с. 5. Сюрин, В.Н. Диагностика вирусных болезней животных / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина; Москва: Агропромиздат, 1991. – 528 с. 6. Обухов, И.Л. Диагностика и молекулярно-генетическое типирование возбудителя алеутской болезни норок / И.Л. Обухов // Ветеринария. – 2003. – №10. – С. 22-25. 7. Слугин, В.С. Современные ветеринарные проблемы в звероводстве / В.С. Слугин // Кролиководство и звероводство. – 2005. – №1. – С.24-29. 8. Диагностика алеутской болезни норок [Электронный ресурс] /Звероводство.ru – режим доступа: www.zverovodstvo.ru.*

Статья передана в печать .2013

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ