

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕХНОЛОГИЙ ДИАГНОСТИКИ ТРИХИНЕЛЛЕЗА У СВИНЕЙ

Л. А. НАПИСАНОВА, О. Б. ЖДАНОВА, А. В. УСПЕНСКИЙ

*ВНИИП – филиал Федерального научного центр – Всероссийский
научно-исследовательский институт Коваленко РАН,
г. Москва, Россия*

А. К. МАРТУСЕВИЧ

*ФГОУ ВПО Нижегородская ГСХА,
Н. Новгород, Россия*

(Поступила в редакцию 18.03.2021)

Паразитарные заболевания, в т.ч. трихинеллез, наносят огромный экономический ущерб, а нередко являются фатальными. Следует учитывать, что ряд мелких фабрик по производству мясных деликатесов использует только сырое мясо, которое не подвергается термической обработке. Поэтому во многих странах ведутся комплексные ветеринарно-медико-биологические исследования по профилактике трихинеллеза, но, несмотря на это актуальность проблемы не ослабевает, а в последнее время даже возрастает. Помимо методов визуализации трихинелл компрессорной трихинеллоскопией, также кристаллографические и иммунологические методы используются для диагностики трихинеллеза. Все эти методы надежны, позволяют обнаружить трихинеллез и предотвратить развитие гельминтозооза у человека. При сравнительной характеристике всех микрокапельных методов (дот-ИФА, ИФА и кристаллографических методов) отметили превосходство дот –ИФА. Минимальный диагностический титр для мясного сока составил 1:5, в то время как для классического варианта ИФА применили 1:200, при этом 100 % специфичность установлена только среди клинически здоровых животных, а у вакцинированных свиней появлялись ложноположительные реакции, поэтому итоговая специфичность дот-ИФА и ИФА были несколько ниже. Установлено, что дот-ИФА имеет важное преимущество перед классической ИФА (а также кристаллоскопией и трихинеллоскопией), так как образцы сока можно получить и из замороженной мышечной ткани для уточнения диагноза. Преимуществом дот-ИФА также является возможность использования этого метода в различных условиях и для различных количеств исследуемых образцов. Все модификации дот-ИФА отличаются экономичным расходом реагентов, не требуют холодильников, дорогостоящих приборов, и электропитания. Диагностические наборы для дот-ИФА компактны, легко помещаются в переносные контейнеры. Учитывая вышесказанное, считаем, что в ближайшее время этот метод найдет широкое применение на перерабатывающих предприятиях и в ветеринарных лабораториях.

Ключевые слова: *trichinella spiralis, трихинеллез свиней, компрессорная трихинеллоскопия, иммунологические методы, дот-ИФА.*

Parasitic diseases, including trichinosis, cause huge economic damage, and are often fatal. It should be noted that a number of small factories for the production of meat delicacies

use only raw meat, which is not subjected to heat treatment. Therefore, in many countries, comprehensive veterinary, medical and biological studies are conducted on the prevention of trichinosis, but despite this, the urgency of the problem does not weaken, and recently even increases. In addition to the methods of visualization of trichinella by compressor trichinelloscopy, crystallographic and immunological methods are also used for the diagnosis of trichinosis. All these methods are reliable, can detect trichinosis and prevent the development of gelmintozoonosis in humans. When comparing all microdroplet methods (dot-ELISA, ELISA, and crystallographic methods), the superiority of dot-ELISA was noted. The minimum diagnostic titer for meat juice was 1:5, while for the classic version of ELISA, 1:200 was used, while 100 % specificity was established only among clinically healthy animals, and false-positive reactions appeared in vaccinated pigs, so the final specificity of dot-ELISA and ELISA was slightly lower. It was found that dot-ELISA has an important advantage over classical ELISA (as well as crystalloscopy and trichinelloscopy), since juice samples can also be obtained from frozen muscle tissue to clarify the diagnosis. The advantage of dot-ELISA is also the possibility of using this method in different conditions and for different amounts of samples under study. All modifications of the dot-ELISA are characterized by an economical consumption of reagents, do not require refrigerators, expensive appliances, and power supply. Diagnostic kits for dot-ELISA are compact, easily placed in portable containers. Given the above, we believe that in the near future this method will be widely used in processing plants and in veterinary laboratories.

Key words: *trichinella spiralis*, porcine trichinosis, compressor trichinoscopy, immunological methods, dot-ELISA.

Введение. Паразитарные заболевания, в т.ч. трихинеллез, наносят огромный экономический ущерб, а нередко являются фатальными. Следует учитывать, что ряд мелких фабрик по производству мясных деликатесов использует только сырое мясо, которое не подвергается термической обработке. В этой связи необходимо отметить, что трихинеллез представляет собой серьезную медицинскую, ветеринарную и социально-экономическую проблему во всем мире, так как наносит немалый ущерб сельскому хозяйству стран и обществу в целом [1, С. 46–49; 3, С. 151]. Поэтому во многих странах ведутся комплексные ветеринарно-медико-биологические исследования по профилактике трихинеллеза, но, несмотря на это актуальность проблемы, не ослабевает, а в последнее время даже возрастает. Принимая во внимание современные достижения и повсеместное внедрение различных методов диагностики и контроля над состоянием животных на крупных промышленных комплексах, достаточно показательными маркерами являются состав и свойства крови и плазмы, в том числе и для диагностики трихинеллеза.

Несмотря на то, что постмортальная диагностика трихинеллеза осуществляется на всех предприятиях по переработке мясной продукции с двадцатых годов прошлого столетия, в настоящее время встает вопрос об ее усовершенствовании. Ведущими методами диагностики

трихинеллеза являются компрессорная трихинеллоскопия (КТ) и исследование осадка после переваривания в искусственном желудочном соке (пептолиз), однако, современные технологии позволяют помимо идентификации личинок проводить посмертную и прижизненную диагностику по исследованию сыворотки и мясного сока [2, С. 151–157; 6, С. 1437–1441.]. Этот метод может иметь огромную важность, так как сыворотки и образцы сока можно замораживать и отправлять в диагностические центры для уточнения диагноза. Кроме того, для посмертной диагностики методов применяются различные варианты ИФА [4 С. 64–71; 5, С. 187; 7, С.18; 8, С. 280]. Кроме того, о кристаллографических методах для прижизненной также диагностики сообщают многие авторы [5, С. 187; 7, С. 20; 8, С. 280–282.]. Однако, трихинеллоскопия, несмотря на свою трудоемкость, остается основным технологическим процессом на перерабатывающих предприятиях (в данный процесс входит также подготовка трихинеллоскопа к работе, поддержание в санитарном состоянии рабочего места в течение смены и уборка рабочего места в конце рабочей смены; регистрация поступающих проб для трихинеллоскопии и выписка заключений по результатам проведенных лабораторных исследований).

Цель исследования: оценка диагностической эффективности иммуноферментного анализа (ИФА), варианта ИФА – метода дот-ИФА, и кристаллографии.

Основная часть. Исследовали мясной сок, полученный из ножек диафрагмы и сыворотку от свиней клинически здоровых и вакцинированных антигенами трихинелл и инвазированных животных методами ИФА, дот ИФА и кристаллографией. ИФА ставили по классическому варианту для определения антител к трихинеллам, дот-ИФА позволяет определять как антигены, так и антитела, кристаллографический анализ основан на модуляции биосред при дегидратации и на алгоритме оценки реакции. Исследования подтверждали методами посмертной диагностики: методом компрессорной трихинеллоскопии (КТ) и методом пептолиза (переваривания в искусственном желудочном соке). Искусственный желудочный сок (ИЖС) готовили по рецептуре согласно МУК 4.2.2747-10 и «Методическим указаниям по лабораторной диагностике трихинеллеза животных». По методике, предложенной П. А. Владимировой (1965) ИЖС состоит из 1 % соляной кислоты, 3 % пепсина на 100 мл воды. Свежеприготовленный ИЖС заливали в стеклянную колбу с фаршем, содержащим личинки трихинелл (мясо, пропущено через мясорубку с диаметром отверстий 3–4 мм). Соотноше-

ние сока к массе фарша брали 25:1 и выдерживали в термостате при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$, затем проводили фильтрацию «перевара» и определяли массу непереваренного остатка мышечной ткани. Результаты пептолиза оценивали по разнице навески мясного фарша до постановки биохимической реакции и после, а также учитывали выход мышечных личинок трихинелл из мышечной ткани.

Для иммунологических реакций проводили определение оптимальных параметров для постановки реакции: оптимальную концентрацию антигена и минимальный диагностический титр. В результате установлено, что минимальный расход антигена при сохранении высокой чувствительности (100 %) и специфичности, составил 15 мг/мл для дот-ИФА при работе на нитроцеллюлозной мембране, что в несколько раз меньше, чем для постановки реакции по классическому образцу. Минимальный диагностический титр для мясного сока составил 1:5, в то время как для классического варианта ИФА применили 1:200, при этом 100 % специфичность установлена только среди клинически здоровых животных, а у вакцинированных свиней появлялись ложноположительные реакции, поэтому итоговая специфичность дот-ИФА и ИФА были несколько ниже. Установлено, что дот-ИФА имеет важное преимущество перед классической ИФА (а также кристаллоскопией и трихинеллоскопией) так как образцы сока можно получить и из замороженной мышечной ткани для уточнения диагноза. Так, например, в ряде случаев, при сомнительных результатах, мясо, подозрительное в отношении трихинеллеза, можно замораживать до подтверждения окончательного диагноза и далее следовать инструкциям Сан ПиН. Причем возможность появления ложно-положительных реакций в случае вакцинаций или перекрестного реагирования с другими антигенами не позволяет полностью исключить классическую трихинеллоскопию в производственном процессе. Второй особенностью данного метода является возможность длительного хранения (более 10 лет) первичного материала в темных контейнерах без изменения окраски нитроцеллюлозной мембраны. В настоящее время работники ветеринарной службы предприятий руководствуются Техническими регламентами Таможенного Союза. Контроль за выполнением требований ветеринарного законодательства осуществляется ветспециалистами, как за поступающими на перерабатывающее предприятие животными, так и за качеством готовой продукции. Учитывая вышесказанное, с целью оптимизации рабочего времени возможно использование дополнительных современных высокоэффективных методов исследования, в

частности, ИФА и дот-ИФА, которые позволяют в оперативном порядке, до выявления трихинелл в мясе принять срочные меры по изоляции и обезвреживанию туши. При сравнительной характеристике всех микрокапельных методов (дот-ИФА, ИФА и кристаллографических методов) отметили превосходство дот –ИФА (табл. 1).

Сравнительная характеристика дот-ИФА, ИФА и кристаллографических методов

Показатели, характеристики	дот-ИФА	ИФА	Кристаллография
Продолжительность	2 ч.	3–6 ч.	12 ч.
Число этапов постановки	4–5	4–5	5–6
Специальная подготовка персонала	нет	да	Да
Применяемость в полевых условиях	да	нет	Да
Необходимость фотометра	нет	да	Нет
Возможность непрерывной регистрации	да	нет	Да

Однако и дот-ИФА постоянно совершенствуется : если вначале его использования применяли 96 луночные микропланшеты, в дно лунок которых вплавлены пористые нитроцеллюлозные мембраны, то в дальнейшем для удобства и экономии материалов исследования начали применять полоски нитроцеллюлозных мембран на пластиковой подложке (дипстики). Их было намного удобнее использовать в полевых условиях. Однако данные полоски ломались и нитроцеллюлоидный материал после нанесения антигена начали наклеивать на гибкие пластиковые полоски.

Наиболее оптимальный вариант дот-ИФА для экспресс-диагностики предусматривает нанесение антигена на непрозрачные пластиковые карточки в виде точек, расположенных также, как и на обычном микротитровальном планшете. Эту карточку можно обрезать, если использовано небольшое количество проб. Результаты дот-ИФА на карточках полностью согласуются с результатами анализа при использовании классических методов и могут храниться в непрозрачных контейнерах на протяжении нескольких лет (рисунок).

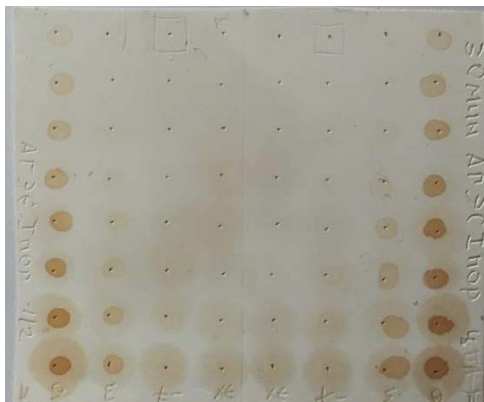


Рис. Результаты дот-ИФА на карточках с нитроцеллюлоидным материалом

Закключение. Несмотря на то, что в настоящее время в системе ветеринарно-санитарных мероприятий на этапе диагностики мясного сырья на трихинеллез ведущее место занимает трихинеллоскопический контроль, становятся крайне актуальными разработки для оптимизации ветеринарной экспертизы. Одним из перспективных методов может стать исследование мясного сока с последующей уточняющей трихинеллоскопией. Основным преимуществом дот-ИФА является возможность его использования в различных условиях и для различных количеств исследуемых образцов. Все модификации этого метода отличаются экономичным расходом реагентов, не требуют холодильников, дорогостоящих приборов, и электропитания. Диагностические наборы для дот-ИФА компактны, легко помещаются в переносные контейнеры. Учитывая вышесказанное, считаем, что в ближайшее время этот метод найдет широкое применение на перерабатывающих предприятиях и в ветеринарных лабораториях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Распространенность *T. spiralis* и некоторые особенности профилактики трихинеллеза в Кировской области / О. Б. Жданова [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. 2017. – № 1 (286). – С. 46–49.
2. Успенский, А. В. Метод ветеринарно-санитарной экспертизы мяса промысловых животных при паразитарных зоонозах / А. В. Успенский, Ф. А. Скворцова // Российский паразитологический журнал. – 2014. – №3 – С. 151–157.
3. Cui J., Wang Z.Q. An epidemiological overview of swine trichinellosis in China // Vet. J., 2011, V.190 (3), P.323–328.
4. Мартусевич, А. К. Исследование зависимости кристаллогенной активности биосреды от интенсивности инвазии *Trichinella spiralis* / А. К. Мартусевич, О. Б. Жданова // Российский паразитологический журнал. – 2013. – №2. – С. 64–71.

5. Применение dot-ELISA и биокристаллоскопии для прижизненной диагностики трихинеллеза / А. К. Мартусевич [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7, №2–3. – С. 187.
6. Анализ физико-химических свойств антигенов некоторых гельминтов как технология паразитологической метаболомики / А. К. Мартусевич [и др.] //Фундаментальные исследования. 2014. – № 12-7. – С. 1437–1441.
7. Написанова Л. А. Диагностическая эффективность иммуноферментных тест-систем (ИФР и дот-ИФА) при трихинеллезе свиней: дисс. ... канд. биол. наук / Л. А. Написанова. – Москва, 2004.
8. Трихинеллез: некоторые аспекты его мониторинга и профилактики / Л. А. Написанова [и др.] // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2016. – № 17. – С. 280–282.
9. Zhdanova O. B., Haidarova A. A., Napisanova L. A., Rossodin D., Lozhenicina O. The possibility of using *Trichinella spiralis* as an experimental model in the field of high dilutions. International Journal of High Dilution Research. 2015. – Т. 14. – № 2. – С. 60–61.