

ДИАГНОСТИКА ПАРАЗИТАРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА РАННИХ СТАДИЯХ

Е.А. Степанова, кандидат ветеринарных наук

И.А. Трус, кандидат ветеринарных наук

М.В. Якубовский, доктор ветеринарных наук, профессор

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», Беларусь

тел. 8 (017) 508-83-53, bjev.m.parasitology@tut.by

Ключевые слова: гиподерматоз, подкожный овод, антиген, иммуноферментный анализ, эпизоотология, иммунитет.

В статье приведены данные по разработке способа получения антигена для диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота и способа диагностики, позволяющей выявлять заболевание на начальных этапах развития гиподерматоза.

Введение. Ощутимый экономический ущерб хозяйствам нашей республики наносят паразитарные заболевания, и не последнее место в этом ряду занимает гиподерматоз крупного рогатого скота [1, 2, 3, 4]. Гиподерматоз является повсеместно распространенной инвазией. В Республики Беларусь при сравнении динамики инвазирования крупного рогатого скота личинками подкожного овода в 2003-2010 гг. по данным обследования на мясокомбинатах, в населенных пунктах и хозяйствах следует отметить, что в различные годы средняя инвазированность животных личинками *H. bovis* колебалась незначительно и составила $1,54 \pm 0,27\%$, с максимальным заражением в мае-июле – $3,96 \pm 1,06$ - $5,36 \pm 1,22\%$. У не обработанных животных зараженность личинками подкожного овода в 3-10 раз выше. Однако объемы обработок животных остаются достаточно высокими, так как приходится обрабатывать всех животных неблагополучных стад, в противном случае может произойти массовое заражение животных подкожным оводом.

Потери продуктивности при гиподерматозе составляют: привесов – до 15%, молока – до 20%, качество шкур снижается в среднем на 10%, а нередко на 50% и более (М.В. Якубовский и соавт., 1998, 2000, 2001). Следует учитывать также и то, что гиподерматоз крупного рогатого скота является зоонозом.

Болезнь протекает хронически и характеризуется воспалительными явлениями в местах обитания личинок оводов, общей интоксикацией организма и снижением молочной и мясной продуктивности животных.

Особенностью протекания гиподерматоза является то, что на первых этапах заражения трудно диагностировать болезнь, так как личинки подкожного овода находятся в организме животного в течение 7-9 месяцев (после откладывания оводом яиц на шерсть животного) и они могут быть выявлены визуальным осмотром только в последние 1-2 месяца своего цикла развития. На протяжении всего этого продолжительного периода, когда животные уже инвазированы личинками подкожного овода, но им еще не поставлен диагноз (в связи с отсутствием клинических признаков). В связи с тем, что невозможно выявить больных животных на ранних стадиях заболевания, приходится применять лечебно-профилактические обработки ко всем животным, что увеличивает себестоимость сельскохозяйственной продукции.

Более перспективными считаются работы, направленные на создание метода выявления животных на начальных стадиях развития личинок подкожного овода с применением различных методов лабораторных исследований.

Сотрудниками отдела паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в 2000-2005 гг. был разработан аллерген из личинок подкожного овода для ранней аллергической диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота, который обладает эффек-

тивностью 95-98%. Утверждена нормативная документация на «Аллерген из личинок подкожного овода для ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота» (ТУ ВУ 600049853.086-2006). Однако для изготовления данного аллергена необходимо большое количество личинок подкожного овода, что усложняет и ограничивает его производство.

В 2006-2010 гг. нами были проведены работы по разработке очищенного антигена для ранней иммунодиагностики гиподерматоза (ИФА) с эффективностью не ниже 98,5%.

Материалы и методы исследований. Для решения проблемы ранней диагностики гиподерматоза на основе биомассы *H. bovis* нами были получены антигены из личинок подкожного овода. В основу антигенов был положен ультразвуковой дезинтеграат личинок с минимальным содержанием тканевых антигенов крупного рогатого скота. Приготовленные соматические антигены испытали в реакции иммуноферментного анализа.

Результаты исследований и их обсуждение.

Нами были получен ряд антигенов двух видов (соматический и экскреторный) из личинок *Hypoderma bovis*. Исходный материал собрали при убое больных гиподерматозом животных на мясокомбинате.

На первом этапе провели испытание приготовленных серий антигенов с сыворотками крови и молоком животных при клиническом проявлении гиподерматоза крупного рогатого скота.

Результаты исследований:

Таблица 1 – Испытание приготовленных 5 серий антигенов с сыворотками крови и молоком животных при клиническом проявлении гиподерматоза крупного рогатого скота

Используемая серия антигена	Среднее превышение оптической плотности положительной пробы над отрицательной		Стандартное отклонение среднего превышения оптической плотности	
	сыворотки крови	молока	сыворотки крови	молока
Экскреторный антиген	1,08	0,97	0,41	0,26
1 серия соматического антиген	1,52	1,57	0,11	0,13
2 серия соматического антиген	1,23	1,11	0,29	0,36
3 серия соматического антиген	1,12	0,90	0,37	0,29
4 серия соматического антиген	1,41	1,20	0,42	0,37

Таким образом, 2 серия соматического антигена показала наиболее приемлемые результаты для дальнейшей его использования (наибольшее значение среднего превышения оптической плотности положительной пробы над отрицательной) с последующей оптимизацией параметров способа диагностики для увеличения его диагностической значимости.

На следующем этапе была проведена работа по оптимизации параметров способа диагностики для увеличения его диагностической эффективности.

Были проведены испытания использования различных составов буферных растворов. Наиболее высокие показатели среднего превышения оптической плотности положительной пробы над отрицательной (в 2 раза и более) были получены при сочетании следующих буферов: 0,15 М КББ (рН 9,8); 0,1 М ФСБТ (фосфатный буфер на бидистиллированной воде с 0,05% твин-20, рН 7,4).

Провели испытания различного времени закрепления белка на планшете. Установлено, что при инкубировании планшета с антигеном в течение 5-7 часов результаты исследований резко снижались (превышение оптической плотности положительной пробы над отрицательной было в 1,2-1,3 раза), тогда как при более длительной инкубации 14-24 часа наблюдались схожие результаты (превышение оптической плотности положительной над отрицательной сывороткой было в 2 раза и более).

Наиболее приемлемые результаты были достигнуты при инкубировании планшета с антигеном в течение 8-12 часов (превышение оптической плотности положительной над отрицательной сывороткой было в 2 раза и более).

Таким образом, были подобраны этапы и компоненты для приготовления антигена из личинок

подкожного овода, предназначенного для выявления животных, инвазированных личинками *Hypoderma bovis* на ранних стадиях развития заболевания по исследованию в сыворотки крови или молока обследуемых животных.

На втором этапе изучили динамику выявления антител к личинкам *H. bovis* на различных стадиях заболевания гиподерматозом крупного рогатого скота. В РУСПП ППР «Правда» Минского района подобрали 2 группы животных (2-3 летнего возраста): 14 голов инвазированных личинками подкожного овода и 12 голов – неинвазированных личинками подкожного овода животных. Формирование животных в группы провели на основании результатов аллергической диагностики с использованием аллергена из личинок подкожного овода для ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота.

Первое исследование крови животных в обеих группах провели в феврале с целью изучения динамики выявления животных в ИФА при субклинической форме гиподерматоза; второе в мае с целью изучения динамики выявления антител к личинкам *H. bovis* в ИФА при клинической форме гиподерматоза (наличие желваков); третье в июле с целью изучения динамики выявления антител к личинкам *H. bovis* в ИФА при постклинической форме гиподерматоза; четвертое и пятое с целью изучения динамики выявления антител к личинкам *H. bovis* в ИФА после переболевания гиподерматозом крупного рогатого скота в сентябре и октябре.

Антиген (1,2-1,3 мг/мл) разводили 1:100, сыворотки крови разводили 1:25, 1:50, 1:100. В опыте использовали 5 сывороток крови здоровых коров, 6 сывороток молодняка крупного рогатого скота гипериммунизированного гиподерматозным антигеном и 26 сывороток крови коров, спонтанно инвазированных личинками подкожного овода. Наиболее достоверные данные были получены при разведении исследуемых сывороток 1:25.

При обобщении полученных данных установили, что диагностически значимый уровень выявления в ИФА сывороточных антител к личинкам подкожного овода появляется не ранее 30-42 дней после заражения, достигает своего максимума к 259-280 дню (февраль-май) и снижается ниже диагностически значимого уровня на 45-67 день после выпадения личинок, что позволяет начинать раннюю диагностику гиподерматоза (ИФА) с 5-10 октября без риска ошибочного выявления переболевших животных.

На следующем этапе изучили диагностическую эффективность иммуноферментного анализа для выявления спонтанно инвазированного личинками подкожного овода крупного рогатого скота. Для чего подбирали группы животных спонтанно инвазированных личинками подкожного овода. Формирование животных в группы проводили на основании результатов аллергической диагностики гиподерматоза с использованием аллергена из личинок подкожного овода (ТУ 600049853.086-2006). У животных опытных групп проводили отбор проб сывороток крови, которые проверяли на наличие антител с помощью набора. Для подтверждения результатов иммуноферментного анализа и установления его диагностической эффективности (чувствительность и специфичность) в апреле-августе проводили обследование животных на наличие клинических признаков заболевания гиподерматозом и сравнили их с данными, полученными при постановке иммуноферментного анализа

В *первом опыте* в РУСПП ППР «Правда» и СПК «Щомыслица» Минского района подобрали 2 группы животных в количестве 24 и 52 голов предварительно не обработанных с профилактической целью противооводовыми препаратами. В опыте использовали 76 сывороток крови от опытных групп животных, в качестве контроля использовали 5 сывороток крови здоровых коров, 3 сыворотки молодняка крупного рогатого скота гипериммунизированного гиподерматозным антигеном и эмбриональную сыворотку крови крупного рогатого скота. Установлено, что при исследовании крови животных спонтанно инвазированных личинками подкожного овода в ИФА было выявлено 18 сывороток крови с превышением оптической плотности в 1,49-2,53 раза (больные животные) по сравнению с нормальной сывороткой. У 58 образцов превышение оптической плотности по сравнению с нормальной сывороткой составило в 1,09-1,41 раза (здоровые животные).

При обследовании животных на наличие клинических признаков заболевания гиподерматозом и сравнении их с данными, полученными при постановке иммуноферментного анализа установлено,

что у всех животных, отрицательно реагировавших в ИФА, клинические признаки гиподерматоза выявлены не были (58 голов), и у всех животных (17 голов), положительно реагировавших в ИФА, при визуальном осмотре были обнаружены гиподерматозные желваки, с интенсивностью инвазии 1-8 личинки на животном.

Таким образом, установлено, что специфичность и чувствительность экспериментального образца антигена для выявления спонтанно инвазированного личинками подкожного овода крупного рогатого скота в ИФА при гиподерматозе крупного рогатого скота составила 100%.

Во *втором опыте* подобрали группу животных в РУСПП ППР «Правда» (121 животное), а также принадлежащих населению в ООО «Торговый Дом «Ждановичи-АГРО» Минского района (23 головы). В опыте использовали 144 сыворотки крови от опытных групп животных, в качестве контроля использовали 5 сывороток крови здоровых коров, 3 сыворотки молодняка крупного рогатого скота гипериммунизированного гиподерматозным антигеном и эмбриональную сыворотку крови крупного рогатого скота. Установлено, что из 121 проб отобранных на РУСПП ППР «Правда» МТФ Тресковщина в ИФА было выявлено 19 сывороток крови с превышением оптической плотности в 1,5-2,92 раза по сравнению с нормальной сывороткой (больные животные). У 104 образцов превышение оптической плотности по сравнению с нормальной сывороткой составило в 1,02-1,48 раза (здоровые животные). Из 23 проб отобранных у животных принадлежащих населению в ООО «Торговый Дом «Ждановичи-АГРО» в ИФА было выявлено 10 сывороток крови с превышением оптической плотности в 1,5-2,67 раза по сравнению с нормальной сывороткой (больные животные), тогда как, у 13 образцов превышение оптической плотности по сравнению с нормальной сывороткой составило в 1,08-1,49 раза (здоровые животные).

При обследовании животных на наличие клинических признаков заболевания гиподерматозом и сравнении их с данными, полученными при постановке иммуноферментного анализа, установлено, что у всех животных, отрицательно реагировавших в ИФА, клинические признаки гиподерматоза выявлены не были (115 голов). При обследовании животных положительно реагировавших в ИФА (29 голов) у 28 животных были выявлены гиподерматозные желваки с интенсивностью инвазии 1-8 личинки на голову, тогда как у одного животного (принадлежащего РУСПП ППР «Правда») клинических признаков гиподерматоза на протяжении всего периода наблюдения выявлено не было.

Таким образом, специфичность во втором опыте составляет 99,13%, чувствительность 96,55% (приложение А).

В *третьем опыте* подобрали группу из 129 животных на РУСПП ППР «Правда» МТФ «Дуличи» Минского района. Установлено, что при исследовании крови животных спонтанно инвазированных личинками подкожного овода в ИФА было выявлено 11 сывороток крови с превышением оптической плотности в 1,5-2,38 раза по сравнению с нормальной сывороткой (больные животные). У 118 образцов превышение оптической плотности по сравнению с нормальной сывороткой составило в 0,60-1,47 раза (здоровые животные).

При обследовании животных на наличие клинических признаков заболевания гиподерматозом и сравнении их с данными, полученными при постановке иммуноферментного анализа установлено, что у 10 коров (из 11 положительно реагировавших в ИФА) при визуальном осмотре были обнаружены гиподерматозные желваки, с интенсивностью инвазии 1-2 личинки на животном, у остальных 119 животных клинические признаки гиподерматоза выявлены не были (118 голов отрицательно реагировавших в ИФА и 1 положительно). Специфичность ИФА при гиподерматозе крупного рогатого скота составляет 99,15%, чувствительность 90,0%.

Анализируя полученные данные по определению диагностической эффективности иммуноферментного анализа для выявления спонтанно инвазированного личинками подкожного овода крупного рогатого скота, установлено, что специфичность ИФА составляет $99,43 \pm 0,29\%$, чувствительность $95,52 \pm 2,93\%$.

Заключение.

Специфичность разработанного «Набора для раннего выявления антител к антигенам подкожных оводов *Hypoderma bovis* и *Hypoderma lineatum* у крупного рогатого скота методом иммунофермент-

ного анализа «ИФА-гиподерма» составляет $99,43 \pm 0,29\%$, чувствительность $95,52 \pm 2,93\%$.

На основании результатов исследований подготовлены и утверждены технические условия, инструкция по применению, технологический регламент на «Набор для раннего выявления антител к антигенам подкожных оводов *Hypoderma bovis* и *Hypoderma lineatum* у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА-гиподерма» (ТУ ВУ 600049853.061-2010). Получен патент Республики Беларусь № 14385 на изобретение «Способ получения антигена для диагностики гиподерматоза и способ диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота» заяв. №а20080300 от 14.03.2008 г.

Библиографический список:

1. Антигены из личинок *Hypoderma lineatum* для иммуноферментного анализа / Н.А. Маврин [и др.] // Ветеринария. - 2007. - №9. - С.12.
2. Грунин, К.Я. Подкожный овод (*Hypodermatidae*). Фауна СССР / К.Я. Грунин - М., 1962.- 237 с.
3. Непоклонов, А.А. Оздоровление стад крупного рогатого скота от гиподерматоза / А.А. Непоклонов // Ветеринария. - 2002. - №10. - С.3-6.
4. Особенности эпизоотической ситуации и сравнительная эффективность препаратов при гиподерматозе крупного рогатого скота/ Е.А. Степанова [и др.] // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2006. - №3. – С.17-23.

УДК 619:616.995

ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ АЛЛЕРГЕНА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЭХИНОКОККОЗА ОВЕЦ

Сулейменов М.Ж. кандидат ветеринарных наук, доцент

Аманжол Р.А. кандидат ветеринарных наук

Тулеханов А. кандидат биологических наук

Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт

Ключевые слова: эхинококк, овцы, аллерген, гельминт.

В статье приведены результаты разработки способа получения аллергена для диагностики эхинококкоза овец и результаты его испытаний.

Введение. Ларвальные цестодозы овец наносят большой экономический ущерб и принадлежат к числу гельминтозов с высокой социальной и экономической значимостью для здравоохранения и животноводства.

Эхинококкоз (*Echinococcus granulosus*) - гельминтозное заболевание, личиночная стадия которого поражает печень, легкие, мозг и другие органы млекопитающих и человека. Ленточная стадия паразитирует в тонком отделе кишечника собак и других плотоядных, в основном в ее средней части - тощей кишке. Стробила достигает 2,7 - 5,4 мм и состоит из 3-4 члеников. В одном зрелом членике содержится до 50 тысяч яиц. Яйца эхинококка высоко устойчивы в окружающей среде: они выдерживают высушивание до 12 дней, на почве в тени при 10-26°С сохраняют инвазионность около месяца, при температуре от -1° до +1 °С - до 4 мес; в 70 % спирте и 10 % растворе формалина теряют инвазионность через 10 сут, в 5 % растворе едкого калия - через 24 ч.

Одна собака, зараженная эхинококками, ежедневно выделяет во внешнюю среду до 5-8 половозрелых члеников. В кишечнике собаки могут паразитировать десятки и сотни тысяч эхинококков. Для достижения эхинококком половой зрелости и отделения зрелых члеников необходимо от 64 до 97