

7. Субботин, В.В. Сидоров М.А. Профилактика желудочно-кишечных болезней новорожденных с симптомокомплексом диареи /В.В. Субботин, М.А. Сидоров //Ветеринария. – 2001. – № 4. – С. 3-7.
8. Ткачев, Е.З. Пищеварительные, обменные процессы и резистентность организма у поросят при использовании биологически активных веществ /Е.З. Ткачев, Т.Е. Банкина //Бюл. науч. работ. – ВИЖ, 1989. – Т. 93. – С. 79-81.

УДК 619:616.995.121.21

## ИММУНОДИАГНОСТИКА ФАСЦИОЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**Е.А. Степанова, М.В. Якубовский**

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии  
им. С.Н. Вышелеского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 29.06.2013 г.)

**Аннотация.** В статье представлены данные по разработке современных иммунологических методов диагностики фасциолеза крупного рогатого скота. Иммунологические методы обеспечивают раннюю диагностику фасциолеза по сравнению с копрологическими методами. Это позволяет обрабатывать животных в более ранних сроках, предупреждая возможные экономические потери, причиняемые фасциолезом. Разработанный набор для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА – фасциола» обладает специфичностью 93,75% и чувствительностью 100%.

**Summary.** The article presents data on the development of modern immunological methods for diagnosis of fascioliasis in cattle. Immunological methods provide earlier diagnostics of fascioliasis, than coprological ones. This allows to process animals in earlier terms, warning possible economic losses provided by fascioliasis. The developed set «ELISA test kit for early detection of antibodies to fasciola (*Fasciola hepatica*) cattle antigens «ELISA - fasciola» possesses specificity of 93,75 % and sensitivity of 100 %.

**Введение.** Фасциолез – трематодозная болезнь многих видов животных и человека [2, 12]. В Беларуси фасциолез встречается во всех областях страны. Заражение крупного рогатого скота *F. hepatica* ведет к снижению привесов, удоев молока, ухудшению качества животноводческой продукции, снижению уровня иммунитета, в т.ч. поставочного. По данным отдела паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», при обследовании крупного рогатого скота в хозяйствах и на мясоперерабатывающих предприятиях республики экстенсивность инвазированности крупного

рогатого скота в 2012 г. составила около 1,64-3,03%, причем у коров инвазированность была выше и достигала 1,12-5,57% [10].

Для успешного оздоровления поголовья крупного рогатого скота следует проводить комплекс мер, включающих раннюю диагностику и эффективную дегельминтизацию животных. В этом комплексе важным звеном является современная и достоверная диагностика.

При диагностике фасциолеза в лабораторных условиях чаще всего применяют метод последовательных промываний. Взятие проб у животных при постановке диагноза осуществляют выборочно от 10% поголовья, но не менее чем 30 проб. Обнаружение яиц фасциол в любой из них ведет к вынужденной обработке всего поголовья противотрематодозными препаратами [4].

Однако по данным ряда авторов, метод последовательных промываний при диагностике фасциолеза позволяет обнаружить лишь около 45-50% зараженных фасциолами животных. В то же время отрицательный результат копрологической диагностики не обозначает отсутствие паразита, что не позволяет объективно оценивать эпизоотическую ситуацию [3, 8, 11, 13].

В связи с тем что эффективность копрологических методов низкая, для диагностики фасциолеза следует использовать иммунный ответ на вторжение паразитарного организма [3, 6, 7, 8, 14, 15].

Основное преимущество иммунологической диагностики заключается в возможности распознавать гельминтоз в ранней стадии болезни, когда возбудители ещё не достигли половой зрелости и копрологические методы использовать нельзя.

Впервые иммунологическую диагностику фасциолеза применил Серванти в 1921 году, используя в качестве антигена алкогольный экстракт из половозрелых фасциол. По данным исследователей реакция на антиген проявлялась в форме периваскулярной эозинофильной инфильтрации. Метод позволил выявить 17 из 25 больных фасциолезом овец [1].

При исследовании применения различных антигенов для внутрикожной аллергической пробы Н.В. Демидов обнаружил наибольшую эффективность при использовании полного соматического антигена фасциол и указал, что наибольшей перспективой использования из всех иммунологических методов диагностики обладают аллергические [5].

В 2005-2009 гг. сотрудниками отдела паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» разработан аллерген для диагностики фасциолеза крупного рогатого скота с использованием внутрикожной аллергической пробы (ТУ 600049853.134-2009). Аллерген зарегистрирован в Главном управ-

лении ветеринарии с Государственной ветеринарной инспекцией Министерства сельского хозяйства и продовольствия и разрешен к применению (регистрационное свидетельство № 2856-10-09 БДААТ от 13.07.2009 г.) [9].

**Цель работы** – разработать набор на основе иммуноферментного анализа для ранней диагностики фасциоза крупного рогатого скота.

**Материалы и методика исследований.** Исходный материал (имаго трематоды *F. hepatica*) собирали из желчных протоков печени спонтанно инвазированного фасциолами крупного рогатого скота при убое на мясокомбинатах Минска, Витебска.

Во всех случаях, используя морфометрический анализ, был определен вид *F. hepatica*.

Полученные трематоды 5-6 раз отмывали в физиологическом растворе. Далее получали антиген из фасциол гомогенизацией, с последующим центрифугированием и пятикратной ультразвуковой дезинтеграцией.

Содержание белка в полученных образцах определяли методом осаждения ТХУ и спектрофотометрии на спектрофотометре «Metertech UV/VIS Spectrophotometer SP-8001» при 540 нм.

Полноценность антигена испытали на сыворотках крови 3 иммунизированных кроликах при 3 контрольных. Сыворотки крови в различных разведениях проверили в РИД по общепринятой методике.

На следующем этапе провели комплектацию опытных образцов набора.

Для определения диагностической эффективности (чувствительность и специфичность) применили реакцию иммуноферментного анализа, взяв за основу методику в модификации Э.Х. Даугалиевой и соавт. (1990). С учетом ранее полученных данных разработали параметры проведения иммуноферментного анализа с антигеном, полученным из фасциол.

Определение диагностической эффективности ИФА для ранней диагностики фасциоза провели на МТФ «Соломоречье» СПК «Вишневка 2010» Минского района на 40 животных спонтанно инвазированных фасциолами. При обследовании крупного рогатого скота (методом последовательных промываний) был выявлен фасциоз с экстенсивностью инвазированности 37,5%. У инвазированных фасциолами коров провели отбор проб крови, которые проверили на наличие антител с помощью сконструированного «Набора для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА-фасциола». В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки крови,

отобранные от 12 голов крупного рогатого скота не инвазированных фасциолами МТФ «Дуличи» КСУП «ППЗ «Белорусский» отделение Чачково» Минского района.

Для учета результатов использовали показатели SP, SN.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для изготовления набора для ранней иммунодиагностики фасциоза крупного рогатого скота на первом этапе был наработан антиген из имаго фасциол, отобранных на мясокомбинатах республики. Всего было получено 100 мл антигена с концентрацией белков *F. hepatica* равной 4,12 мг/мл.

При определении полноценности полученного антигена установлено (при постановке реакции иммунодиффузии (рид) с гипериммунными кроличьими сыворотками), что полученный антиген является полноценным.

На следующем этапе провели комплектацию опытных образцов набора. Каждый набор состоит из 9 компонентов и инструкции по применению, рассчитан на проведение 96 исследований, включая контроли.

Состав набора: № 1 Антиген - 1 флакон; № 2 Планшет для иммуноферментного анализа – 1 планшет; № 3 ФСБ-Т – концентрат фосфатно-солевого твинсодержащего буферного раствора – 1 флакон; № 4 ПК – положительный контроль – 1 флакон; № 5 ОК – отрицательный контроль – 1 флакон; № 6 Конъюгат – 1 флакон; № 7 СБР – субстратный буферный раствор – 1 флакон; № 8 ОФД – ортофенилендиамин – 1 флакон; № 9 КББ – карбонат-бикарбонатный буферный раствор – 1 флакон.

Компоненты «Набора для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА- фасциола» по своим органолептическим, физико-химическим и биологическим показателям соответствуют требованиям проекта технических условий.

наименование показателя	характеристика и норма показателя
1	2
внешний вид антигена	опалесцирующая жидкость желтоватого цвета, допускается осадок серого цвета с различными оттенками, который разбивается при встряхивании.
внешний вид планшета для иммуноферментного анализа полистиролового 96-луночного	плоскодонный планшет из полистирола с лунками, лунки без царапин, деформаций и загрязнений дна.
внешний вид концентрата фосфатно-солевого твинсодержащего буферного раствора (фсб-т)	слегка опалесцирующая бесцветная жидкость. пенится при встряхивании. допускается выпадение солей в осадок.
внешний вид положительного контроля (пк)	желтоватая или с розоватым оттенком жидкость без посторонних примесей.

Продолжение таблицы

1	2
внешний вид отрицательного контроля (ок)	желтоватая или с розоватым оттенком жидкость без посторонних примесей.
внешний вид антивидового пероксидазного коньюгата	тягучая бесцветная или с розоватым оттенком жидкость.
внешний вид субстратного буферного раствора (сбр)	прозрачная бесцветная жидкость.
внешний вид ортофенилендиамина (офд)	таблетки желтоватого цвета или порошок розоватого цвета.
внешний вид карбонат-бикарбонатного буферного раствора (кбб)	прозрачная бесцветная жидкость.
показатель концентрации водородных ионов фсб-т, единицы рН	5,9 – 6,9
показатель концентрации водородных ионов сбр, единицы рН	4,5-5,5
показатель концентрации водородных ионов кбб, единицы рН	9,3-10,3
активность антигена, ок, пк и коньюгата	оптическая плотность положительного контроля (пк) должна в 1,50 и более раз превышать оптическую плотность отрицательного контроля (ок).

Определение диагностической эффективности «Набора для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА- фасциола» провели на МТФ «Соломоречье» СПК «Вишневка 2010» Минского района на 40 животных спонтанно инвазированных фасциолами. При обследовании крупного рогатого скота (методом последовательных промываний) был выявлен фасциолез с ЭИ 37,5%. У инвазированных фасциолами коров провели отбор проб крови, которые проверили на наличие антител с помощью «Набора для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА- фасциола». В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки крови, отобранные от 12 голов крупного рогатого скота не инвазированных фасциолами МТФ «Дуличи» КСУП «ППЗ «Белорусский» отделение Чачково» Минского района.

Было установлено, что из 52 проб сывороток крови исследованных в ИФА было выявлено 36 проб с превышением оптической плотности в  $2,49 \pm 0,12$  раза по сравнению с нормальной сывороткой (больные животные). В 16 пробах от животных не инвазированных фасциолами превышение оптической плотности по сравнению с нормальной сывороткой составило в  $1,28 \pm 0,04$  раза (здоровые животные), тогда как у одного животного превышение оптической составило 1,6 раза по сравнению с нормальной сывороткой.

Таким образом, установлена возможность применения ИФА с помощью разработанного набора для диагностики фасциолеза крупного рогатого скота.

**Заключение.** Изготовлен набор для ранней иммунодиагностики фасциолеза крупного рогатого скота.

Специфичность сконструированного «Набора для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА-фасциола» составляет 93,75%, чувствительность 100%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бабьянскас, М.А. Иммунологическая диагностика фасциолеза и разработка методов оздоровления сельскохозяйственных животных от этой инвазии в условиях Литовской ССР: дис. ... док. вет. наук. / М.А. Бабьянскас. – Кайшядорис, 1965. – 619 с.
2. Бекиш, О.-Я.Л. Основы медицинской паразитологии / О. - Я.Л. Бекиш, В.Я. Бекиш. – Минск.: Университетское, 2001. – 224 с.
3. Бережко, В.К. Иммунологические методы диагностики гельминтозов животных (краткий обзор) / В.К. Бережко // Труды Всесоюзного института гельминтологии им. академика К.И. Скрябина. – М., 2000. – Том 36. – С. 10-26.
4. Ветеринарно-санитарные правила по выполнению паразитологических методов лабораторной диагностики гельминтозов, протозоозов и арахноэнтомозов: утв. ГУВ МСХиП РБ 21.07.2007 г. / И.Н. Дубина [и др.]. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 52 с.
5. Демидов, Н.В. Иммунобиологическая диагностика фасциолеза (общие замечания) / Н.В. Демидов // Труды Всесоюзного института гельминтологии им. академика К.И. Скрябина. – М., 1968. – Том 13. – С. 278-294.
6. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля, пер. с нем. А.П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
7. Клименко, В.В. Иммунохимический анализ антигенов гельминтов, способы их получения и перспективы практического использования / В.В. Клименко // Труды Всесоюзного института гельминтологии им. академика К.И. Скрябина. – М., 2002. – Том 38. – С. 78-130.
8. Онуфриенко, М.Э. Фасциолез крупного рогатого скота в северо-западном регионе России: дис. ... док. вет. наук: 03.00.19, 16.00.04 / М.Э. Онуфриенко. – СПб, 2004. – 339 с.
9. Трус, И.А. Иммунологическая диагностика фасциоз крупного рогатого скота (разработка иммунореагентов, иммунологических тестов, сравнительная эффективность и показания к применению): дис. ... канд. вет. наук: 03.00.19 / И.А. Трус. – Минск, 2008. – 131 с.
10. Якубовский, М.В. Диагностика, терапия и профилактика паразитарных болезней животных / М.В. Якубовский, Н.Ф. Карасев. – Минск: Хата, 2001. – 384 с.
11. Fascioliasis / J. Richter [et al.] // Current Treatment Options in Inf. Dis. – 2002. – Vol. 4. – P.313-317.
12. Fasciolosis / ed. J. P. Dalton– Wallingford: CABI Publishing. – 1999. – 544 p.
13. Muller, R. Worms and human disease / R. Muller, D. Wakelin. – 2 ed. – CABI Publishing, 2002. – 300 p.
14. Noemi, S. Antibody profiles of EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica* / S. Noemi, G.V. Hillyer // J. Parasitol. – 1988. – Vol. 74, № 5. – P. 810-818.
15. Tiggele, L. J. van. Serological diagnosis of fascioliasis / L. J. van Tiggele, H. J. Over // J. Vet. Parasitol. – 1976. – Vol. 3, № 1. – P. 239-248.