

В показатели микробиологической безопасности включают показатели в соответствии рекомендаций международных организаций и законодательства международных сообществ (ЕС, ТС), а при необходимости и стран торговых партнеров (к примеру, во Франции дополнительно введен контроль клостридий в молоке и молочных продуктах, которого нет в законодательстве ЕС).

Количество проб для лабораторного контроля показателей химической безопасности должно определяться в зависимости от объемов производства продовольственного сырья, а отбор проб проводится в сроки, определяемые компетентным органом, независимо от производителей (пример: - Директива Совета 96/23/ЕС от 29 апреля 1996 г. по мерам по контролю за определенными веществами и их остатками в животных и продуктах животного происхождения).

Порядок и периодичность контроля микробиологических показателей продовольственного сырья и пищевых продуктов целесообразно проводить по Регламенту Комиссии (ЕС) № 2073/2005 от 15 ноября 2005 года «О микробиологических показателях для пищевых продуктов», с учетом национальных и производственных особенностей.

2.1. Для реализации программы должны быть определены соответствующие испытательные лаборатории Минсельхозпрода и Минздрава, аккредитованные на право проведения лабораторных испытаний.

3. В стране необходимо принятие НПА по системе государственного лабораторного контроля, которым будет оптимизирована лабораторная деятельность, определены полномочия и порядок действий испытательных лабораторий Минсельхозпрода и Минздрава, порядок осуществления референтных функций в системе ветеринарных и санитарно-эпидемиологических лабораторий.

3.1. Ветеринарные лаборатории должны осуществлять лабораторный контроль условий выращивания животных, состояния здоровья животных, производства безопасных продовольственного сырья и пищевых продуктов животного происхождения.

3.2. Лаборатории санитарно-эпидемиологической службы должны осуществлять лабораторный контроль санитарно-эпидемиологических показателей условий производства безопасных продовольственного сырья и пищевых продуктов животного происхождения, а также в случае необходимости – показателей безопасности пищевых продуктов.

Причем деятельность лабораторий обоих ведомств не должна дублироваться, т.е. их полномочия и направления деятельности должны быть разграничены требованиями НПА.

4. Необходимо:

- пересмотреть и определить методологию проведения сличительных исследований испытательных лабораторий на национальном и наднациональном уровне;

- проведение консультативно-методической работы центральными лабораториями с лабораториями нижестоящего уровня;

- создание системы мониторинга, научного обеспечения и подготовки кадров для испытательных лабораторий;

- обеспечить современное методическое, техническое оснащение испытательных лабораторий.

5. Первоначальным является создание рабочей группы из числа специалистов заинтересованных ведомств по изучению действующей в стране системы лабораторного контроля безопасности продовольствия с целью разработки конкретного комплекса мероприятий по его совершенствованию в соответствии с общепринятой международной практикой.

Литература. 1. Мелешня, А.В. Закономерности развития отечественного и мирового рынков молока в условиях расширения международных торгово-экономических связей. Выбор стратегии укрепления позиции молочной индустрии Республики Беларусь / А.В. Мелешня, М.Л. Климова. - Минск. - 2012. - С. 5–14. 2. Закон Республики Беларусь «О ветеринарной деятельности» от 2 июля 2010 г. № 161-З. 3. Закон Республики Беларусь «О качестве и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов для жизни и здоровья человека» от 4 января 2014 г. № 130-З. 4. Закон Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации» (от 5 января 2004 г. № 262-З). 5. Закон «Об оценке соответствия требованиям технических нормативных правовых актов в области технического нормирования и стандартизации» от 5 января 2004 г. № 269-З. 6. Регламент (ЕС) № 882/2004 Европейского Парламента и Совета от 29 апреля 2004 года об официальном контроле, осуществляемом для гарантии соответствия продукции продовольственному праву и правилам хорошего содержания животных. 7. Регламента (ЕС) (ЕС) № 852/2004 Европейского Парламента и Совета от 29 апреля 2004 года о гигиене пищевых продуктов. 8. Русинович, А.А. Проблемы контроля безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов животного происхождения / А.А. Русинович // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья: сборник научных трудов, РУП «Институт мясо-молочной промышленности. – Вып. № 7. – Минск. – 2013. - С. 24–37.

Статья передана в печать 08.04.2015 г.

УДК 619:616.995.122.21:636

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ФАСЦИОЛЕЗА ДОЙНЫХ КОРОВ

Ятусевич А.И., Дубина И.Н., Братушкина Е.Л., Захарченко И.П., Вербицкая Л.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Проведены исследования по оценке эффективности ИФА сыворотки крови и молока при диагностике фасциоза крупного рогатого скота. Чувствительность метода составляет 100 %, при использовании традиционных методов (последовательных промываний, Вишняускаса) – 70-88 %. Рекомендуются широкое использование ИФА в практике, что значительно облегчит труд специалистов.

Conducted research to assess the effectiveness of ELISA of serum and milk in the diagnosis of human fasciolosis in cattle. The method sensitivity is 100 %, when using traditional methods (sequential washes, Vishnjauskas) - 70-88 %. It is recommended that the widespread use of ELISA in practice that will greatly facilitate the work of specialists.

Ключевые слова: фасциолез, крупный рогатый скот, фекалии, иммуноферментный анализ, диагностическая система, животные, иммунные реакции, иммуноглобулины, антитела, серологические методы диагностики.

Keywords: fasciolosis, cattle, feces, ELISA, diagnostic system, animals, immune response, immunoglobulins, antibodies, serological methods of diagnosis.

Введение. Животноводство является ведущей отраслью сельскохозяйственного производства Республики Беларусь. От использования его производственных потенциалов во многом зависит экономика сельского хозяйства и государства в целом. Производимое животноводством продовольствие – это важнейший фактор жизнеобеспечения, без которого невозможна нормальная жизнедеятельность каждого человека, а значит общества и государства. Одним из резервов повышения продуктивности животных является своевременное выявление и лечение инвазионных заболеваний.

По данным многолетних мониторинговых исследований, на территории Республики Беларусь у крупного рогатого скота установлено паразитирование 36 видов гельминтов, при этом в паразитарной системе одно из основных мест занимает фасциолез. По данным отечественных исследователей, интенсивность фасциолезной инвазии в среднем по республике составляет 54,2% [3]. Анализ инвазированности крупного рогатого скота в различных регионах республики свидетельствует, что наибольшую проблему фасциолез представляет среди взрослого скота, у которого экстенсивность инвазии доходит до 55,2% [1, 4].

Гидрография территории Республики Беларусь характеризуется густой системой рек, крупных и мелких озер, болот, что вместе с большим количеством выпадающих осадков, обеспечивающих обильное увлажнение почвы, и способствует образованию низменных, увлажненных лугов, пойменных пастбищ с хорошим произрастанием кормовых трав. Эти же условия способствуют широкому распространению промежуточного хозяина *Fasciola hepatica* – моллюсков семейства *Limnaeidae*. Тем самым, на территории республики созданы условия для активного развития биологического цикла фасциолы. Однако клинической формы фасциолеза в отчетах ветеринарной службы республики не фигурирует, что мы связываем с несовершенством системы диагностики, широко применяемой в республике.

Интенсификации современного животноводства, беспривязное содержания животных в секциях по 20-50 голов, использование для доения молочных запов, внедрение роботизированных систем получения молока затрудняют отбор диагностического материала. Пробы фекалий практически невозможно идентифицировать, проводить отбор фекалий из прямой кишки, также как и процедура взятия крови, требует прогона животных через санитарные станки, что создает стрессовую ситуацию и требует большой затраты времени. Возникает потребность в совершенствовании диагностических мероприятий, в том числе и диагностике гельминтозов.

Повышение требований к качеству получаемой животноводческой продукции требует разработки современных подходов в лечении и профилактики гельминтозов животных. Поголовная обработка лактирующих коров в настоящее время является неприемлемой, поскольку используемые препараты не только способствуют гибели паразитов, но в большинстве своем достаточно длительно выводятся с молоком, что в период ожидания делает невозможным использование молока для изготовления продуктов питания.

Также необходимо учитывать и экономическую целесообразность поголовной обработки животных. Высокая стоимость антгельминтиков в условиях высокой концентрации поголовья, для поголовной обработки животных требует больших финансовых затрат. Экономически целесообразнее проводить обследование поголовья, выявлять конкретных инвазированных животных и осуществлять индивидуальную дачу лекарственных препаратов.

Таким образом, современные условия ведения животноводства требуют разработки и внедрения высокоэффективных методов диагностики гельминтозов, не требующих больших затрат физического труда, способствующих выполнению высоких экологических и санитарных требований при проведении анализов.

Целью настоящей работы являлась оценка чувствительности, специфичности и воспроизводимости методом иммуноферментного анализа (ИФА) диагностики фасциолеза у крупного рогатого скота по исследованию молока.

Материалы и методы исследований. Одно из хозяйств Витебской области, традиционно неблагополучное по фасциолезу, было выбрано нами в качестве опытной базы для проведения гельминтологической диспансеризации дойного поголовья коров.

От всех коров были отобраны фекалии. Отбор фекалий осуществляли из прямой кишки животного, или сразу после дефекации из разных участков в объеме около 50 г. Фекалии помещали в чистую, сухую, пластмассовую посуду с крышкой. На пробах проставляли номера животных, дату и время отбора материала.

Фекалии доставлялись в лабораторию кафедры паразитологии и инвазионных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», где выполнялось исследование в день отбора.

Исследование проб фекалий осуществляли методом последовательных промываний и методом Вишняускаса.

Проведенная диспансеризация позволила сформировать группу животных, заведомо инвазированных фасциолезом, и группу условно здоровых животных. Также была сформирована группа из коров, подвергнутых дегельминтизации за 60 дней до проведения исследований. В каждую группу вошло по 50 животных.

От трех групп животных были отобраны пробы молока и подвергнуты исследованию методом иммуноферментного анализа с целью обнаружения антител к возбудителю фасциолеза – *Fasciola hepatica*.

Иммуноферментный анализ осуществляли с помощью диагностической системы IDEXX.

Постановка иммуноферментного анализа проводилась в лаборатории ИФА и ПЦР- исследования отдела научно-исследовательских экспертиз научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО ВГАВМ. Отдел научно-исследовательских экспертиз научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии аккредитован в соответствии с СТБ ИСО/МЭК 17025, регистрационный номер: ВУ/122 02. 1.0.0870.

Все используемое оборудование являлось поверенным в государственных органах по стандартизации и метрологии.

Пробы молока отбирали от животных трижды, в разное время доения и подвергали иммуноферментному анализу на фасциозез.

Полученные результаты исследований методом ИФА сопоставлялись между группами, а также с результатами гельминтологического исследования.

Была подобрана группа из 10 голов животных, предназначенных для сдачи на мясокомбинат по причине технологической выбраковки. Животные были подвергнуты параллельному гельминтологическому обследованию методом ИФА молока и исследованию фекалий методом последовательных промываний. Во время убоя группы животных был проведен гельминтологический осмотр.

Результаты исследований. Поскольку фасциолы в организме хозяина проходят сложный и довольно продолжительный путь развития, то вопрос о том, на каких стадиях развития фасциолы стимулируют у хозяина формирование иммунных реакций, является актуальным. Исходя из активности иммунной системы, можно предположить, на какой из стадий развития процесса были бы эффективны серологические методы диагностики.

Анализ имеющегося по данному вопросу большого числа экспериментальных данных показал, что в большинстве случаев при спонтанных инвазиях напряженность иммунитета выше в период паразитирования юных форм [2].

В результате воздействия тех или иных антигенов гельминта, в организме хозяина происходит синтез антител, являющихся, в основном, γ -глобулинами и относящихся к иммуноглобулинам разных классов. В настоящее время известно 5 основных классов иммуноглобулинов – IgM, IgG, IgA, IgE и IgD, отличающихся друг от друга строением тяжелых цепей и свойствами [4].

Проведенное нами исследование овец, инвазированных фасциолами, позволило выявить четкую динамику изменения как концентрации отдельных иммуноглобулинов, так и изменения их соотношения между классами (таблица 1).

Таблица 1 – Динамика изменения содержания иммуноглобулинов по классам в крови овец, инвазированных фасциолами в процессе развития инвазии, mg/dl

Класс иммуноглобулинов	Дни исследования			
	5	7	15	30
G	5,534	6,082	14,537	21,645
A	15,279	11,316	9,065	1,058
M	29,124	65,442	30,855	5,499

Анализ полученных данных показывает, что в начале инвазии (5, 7 дни) преобладают иммуноглобулины класса М и А, то уже на 15 день наблюдения концентрация иммуноглобулинов класса G возросла более чем в 2 раза по отношению к 7 дню, уровень иммуноглобулинов класса А снизился на 18,2%, а класса М – на 52,8%. Спустя 30 дней после инвазирования четко видно значительное преобладание иммуноглобулинов класса G по отношению ко всем остальным классам иммуноглобулинов. Таким образом, использование иммунологических реакций в процессе диагностики фасциозеза представляется нам достаточно перспективным. Начиная с первых дней инвазии, отмечается четкая динамика развития иммунной реакции, проявляющаяся значительным ростом иммуноглобулинов класса G, однако встает вопрос, как длительно сохраняются активность иммунной системы и можно ли использовать серологические методы диагностики при переходе патологического процесса в хроническую стадию? Для ответа на поставленный вопрос мы оценили наличие антител к *Fasciola hepatica* в сыворотке крови инвазированных овец на протяжении 200 дней. На 7, 14, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 200 дни после заражения у овец отбиралась кровь и в реакции РГА определяли титр антител к *Fasciola hepatica* (рисунок 1).

Полученные результаты показывают, что достаточно быстро после заражения уровень антител выходит на диагностически достоверный и с 14 дня инвазии сохраняется на высоком уровне. При переходе патологического процесса в хроническую стадию уровень антител сохраняется на уровне 2,0-3,5 log I/n. Следовательно, разработка серологических методов диагностики фасциозеза является перспективным направлением вне зависимости от стадии развития патологического процесса.

В связи с развитием клеточных технологий, молекулярной биологии, генетики, физики, химии и ряда других высокотехнологичных наук, в повседневную практику внедряются новые высокоточные и высокотехнологичные методы, в том числе метод иммуноферментного анализа (ИФА). Основной отличительной чертой ИФА является то, что в качестве индикаторной молекулы, которая позволяет следить за иммунным комплексом, используется молекула фермента. В связи с тем, что фермент обладает уникальным свойством модифицировать не одну, как в обычных химических реакциях, а большое число молекул субстрата, т.е. обладает своего рода усиливающим свойством, чувствительность иммуноферментных методик может

быть очень высока. В некоторых случаях, как показывают многочисленные сравнительные исследования, она выше чувствительности иммунофлуоресцентных и радиоиммунологических методов.

Различают два принципиально различных типа ИФА – гомогенный и гетерогенный (твердофазный) иммуноферментный анализ.

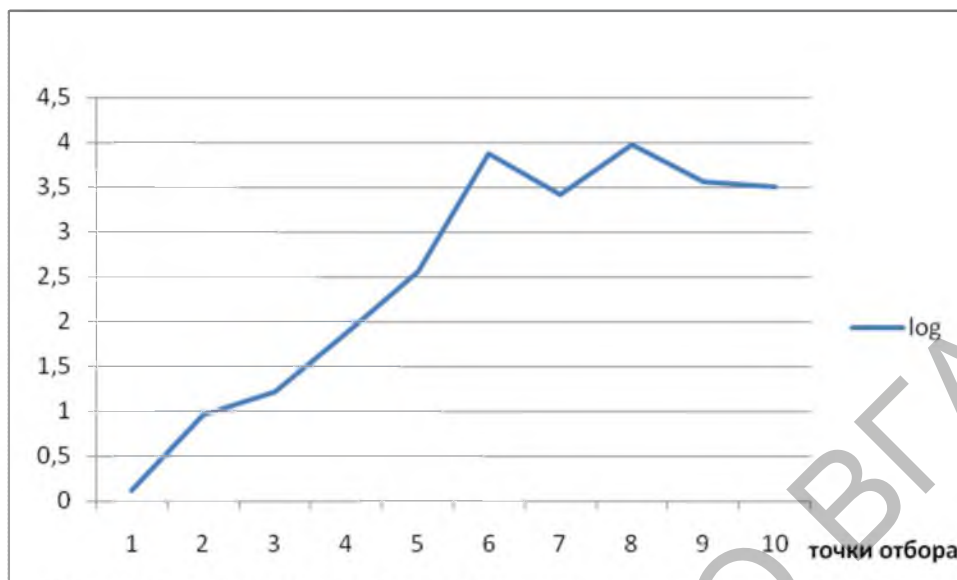


Рисунок 1 – Динамика выработки гемагглютинирующих антител к *Fasciola hepatica*.

Гомогенный иммуноферментный анализ (ГИФА) – наиболее простой в методическом отношении вид ИФА. При его постановке один из участников иммунной реакции (обычно это низкомолекулярный антиген) метится ферментом и за ходом формирования комплекса антиген-антитело следят, регистрируя изменение активности фермента. Такое нарушение ферментативной активности может возникать либо за счет пространственного разобщения фермента и субстрата, либо за счет конформационных изменений в молекуле фермента, сопровождающих формирование иммунного комплекса. Однако у метода ГИФА имеется один крайне существенный недостаток – на его основе можно создавать диагностические тест-системы только для низкомолекулярных антигенов. Только в этом случае антитело, взаимодействуя с антигеном, может эффективно экранировать или модифицировать связанную с этим антигеном молекулу фермента. Именно в связи с этим, несмотря на кажущуюся простоту и очевидные преимущества перед другими методами, на основе ГИФА были созданы диагностические тест-системы для выявления только гормонов, пептидов, лекарственных и наркотических веществ и некоторых низкомолекулярных белков.

Гетерогенный (твердофазный) иммуноферментный анализ (ТФИФА или ELISA) в последние годы особенно широко используется в биологии и медицине. Как и для других твердофазных методов анализа, характерной особенностью ТФИФА является то, что в процессе проведения анализа один из участников реакции антиген-антитело иммобилизуется на твердом носителе. Эту фиксацию антигена или антител можно осуществлять либо путем их ковалентной «пришивки» к полимерной или стеклянной матрице, либо путем их физической адсорбции на твердом носителе за счет достаточно прочных сил электростатического и ван-дер-ваальсового взаимодействия. Идея иммобилизации иммунного комплекса важна для анализа многокомпонентных смесей макромолекул, когда в системе должны оставаться только те компоненты смеси, которые обладают нужными иммунохимическими свойствами. Именно твердофазные методики позволяют избавиться от балластных, не вошедших в иммунный комплекс антигенов простой промывкой.

Ранее при разработке иммунологических реакций на фасциолез использовался неочищенный экстракт *Fasciola hepatica*, который не давал необходимого уровня достоверности. В последнее время разработана технология получения очищенного «f2» антигена позволяющего значительно повысить специфичность серологической диагностики фасциолеза. Антиген «f2» обладает высокой иммуногенностью и специфичностью в отношении *Fasciola hepatica*.

В связи с вышеуказанным, нами была проведена оценка эффективности применения ИФА диагностики при фасциолезе крупного рогатого скота, разработанная на основе реакции с использованием «f2» антигена.

На первом этапе нами выполнена оценка специфичности ИФА метода по исследованию сыворотки крови.

Отобрав 10 проб крови и 10 проб фекалий от заведомо больных животных, мы провели исследования и сопоставили полученный результат (таблица 2).

Полученные результаты показали, что ИФА диагностика фасциолеза при исследовании сыворотки крови животных, основанная на выявлении антител, специфичных к «f2» антигену *Fasciola hepatica*, обладает высокой степенью как чувствительности, так и воспроизводимости.

Таблица 2 – Сравнительная оценка эффективности ИФА исследования сыворотки крови и копроскопических методов диагностики фасциолеза у дойных коров

Показатели	Методы диагностики		
	ИФА крови	Метод последовательных промываний	Метод Вишняускаса
Выявлено положительных проб	10	7	8
Чувствительность, %	100	70	80
Воспроизводимость, %	100	60-90	70-100
Ложно положительных проб	0	0	0

При современных технологиях промышленного выращивания крупного рогатого скота все большее количество комплексов переходят на беспривязные способы содержания животных, что затрудняет процедуру отбора крови и делает ИФА исследование фасциолеза по исследованию сыворотки крови громоздким.

На втором этапе исследования мы приступили к оценке эффективности использования ИФА диагностики фасциолеза у крупного рогатого скота при исследовании молока.

В результате проведенной нами работы было установлено, что в группе, сформированной из заведомо больных животных, положительную реакцию по методу ИФА дали 100% проб исследованного молока. Двукратное повторное исследование проб молока также показало 100% воспроизводимость исследования (таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительная оценка эффективности ИФА исследования молока и копроскопических методов диагностики фасциолеза у дойных коров

Показатели	Методы диагностики		
	ИФА молока	Метод последовательных промываний	Метод Вишняускаса
Чувствительность, %	100	55-76	71-88
Воспроизводимость, %	100	60-90	70-96
Ложноположительных проб	0	0	0

В группе с условно здоровыми животными были выявлены 12 проб молока из 50, дающих положительную реакцию на фасциолез при исследовании методом ИФА. Следовательно, 24% проб, исследованных методом последовательных промываний, дали ложноотрицательный результат. При этом исследование молока методом иммуноферментного анализа на наличие антител к возбудителю фасциолеза позволило обнаружить животных, больных фасциолезом, но считавшихся здоровыми по результатам исследования фекалий.

В группе коров, подвергавшихся дегельминтизации за 60 дней до исследования, ни одна проба молока не дала положительной реакции на фасциолез методом ИФА.

Одновременное обследование 200 животных на наличие фасциолеза методом последовательных промываний фекалий и исследование молока методом ИФА позволило выявить 52 положительных пробы молока (26%), и только 28 проб фекалий, положительных по фасциолезу (14%). Повторное исследование фекалий методом последовательных промываний обнаружило 35 положительных на фасциолез проб (17,5%). Таким образом, расхождение между методами составляет 8,5-12%.

Исследование группы коров, предназначенных для технологической выбраковки, позволило выявить 7 животных, дающих положительную реакцию на фасциолез при исследовании молока методом ИФА, при этом гельминтологическим исследованием фекалий фасциолез был установлен только в 3 пробах. Убой животных и последующий осмотр внутренних органов позволил подтвердить 100% специфичность и достоверность ИФА исследования молока с целью выявления наличия антител к *Fasciola hepatica*.

Заключение. У животных, инвазированных *Fasciola hepatica*, развивается комплекс иммунных реакций, изменяющийся уровень иммуноглобулинов и их соотношение по классам. С первых дней инвазии значительно увеличивается концентрация иммуноглобулинов класса G, достигающая к 15 дню 14,537 mg/dl, что в 2,6 раза выше, чем на 5-й день наблюдения. Уровень антител, достигнув диагностически достоверного содержания к 14-му дню, сохраняется на протяжении всего периода наблюдения на уровне 2,0-3,5 log I/n. Высокая активность иммунной системы у животных, инвазированных *Fasciola hepatica*, позволяет рекомендовать разработку и использование современных серологических методов диагностики заболевания.

Оценка твердофазного иммуноферментного метода анализа (ИФА) с использованием диагностической тест-системы IDEX при диагностике фасциолеза у крупного рогатого скота по исследованию молока показала высокую специфичность, воспроизводимость и чувствительность, что позволяет рекомендовать широкое внедрение данного метода в работу ветеринарной службы республики.

Литература. 1. Жариков, И.С. Гельминтозы жвачных животных / И.С. Жариков, Ю.Г. Егоров. – Минск: Ураджай, 1977. – 174 с. 2. Щурова, Н.Ю. Особенности иммунитета и химиотерапия фасциолеза крупного рогатого скота: автореф. дис...канд. вет. наук: 03.00.19 / Н.Ю. Щурова. – Минск, 2008. 3. Ятусевич, А. И. Гельминтозы крупного рогатого скота и меры борьбы с ними в условиях экологического прессинга: монография / А.И. Ятусевич, Р.Н. Протасовицкая. – Витебск: ВГАВМ, 2010. – 160 с. 4. Ятусевич, А. И. О *Fasciola hepatica* L., 1758 в функционирующей паразитарной системе жвачных животных в Республике Беларусь (эволюция проблем) / А.И. Ятусевич, Е.Л. Братушкина, И.А. Ятусевич, М.В. Скуловец, Л.А. Вербицкая, Р.Н. Протасовицкая // Ученые записки учреждения образования "Витебская государственная академия ветеринарной медицины". - Витебск, 2014. - Т. 50, вып. 1. - С. 71-81.

Статья передана в печать 17.03.2015г.