



Діагностика трихінельозу

Артеменко Л.П., доцент БНАУ
Мартиненко Д.Л., кандидат біологічних наук
Небещук О.Д., кандидат ветеринарних наук

Діагностику трихінельозу проводять, використовуючи прямі і непрямі методи. Прямими методами виявляють личинки трихінел першої стадії у м'язовій тканині, непрямими – антитіла, антигени у крові та інших тканинах макроорганізму чи інші зміни, характерні для трихінельозу.

Прямі та непрямі методи виявляють трихінельозну інвазію на рівні роду. Для встановлення виду чи генотипу трихінел необхідна подальша діагностика, яку проводять, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). До прямих методів належать компенсаторна трихінелоскопія м'язових зрізів та метод перетравлювання проб м'язів у штучному шлунковому соку.

Традиційним методом діагностики трихінельозу є компресорна трихінелоскопія. Цей метод використовують для дослідження свинини ще з 1863 року. У нашій країні компресорна трихінелоскопія свинини введена з 1936 року, і з часу її впровадження методика і техніка майже не змінилися.

Суть цього методу полягає в дослідженні за допомогою мікроскопа роздавлених під компресорієм зразків м'язів розміром з вівсяне зерно. Перевагами методу є простота його виконання і низькі технічні вимоги до лабораторій, де проводиться трихінелоскопія. Недоліками методу є те, що: по-перше, процедура експертизи займає багато часу та вимагає значного навантаження на спеціаліста-трихінелоскопіста; по-друге, чутливість компресорної трихінелоскопії залежить від зразка м'язової тканини (розміром місця відбору), якості цього зразка (наприклад, нативний чи заморожений), тривалості інвазії, виду трихінел, компетентності аналітика, який проводить аналіз тощо.

Багатолітній досвід показує, що рідше безпомилкові дослідження на трихінельоз бувають у тих випадках, коли трихінелоскопісти проглядають за одну годину готові м'язові зрізи не більше ніж від 10–12 туш свиней під світловим мікроскопом та 12–15 – з використанням проєкційного трихінелоскопу.

Однак в умовах м'ясокомбінатів та м'ясопереробних підприємств вказані вище норми навантаження не дозволяють трихінелоскопістам закінчувати дослідження проб синхронно з процесом технологічної переробки туш. Виникає потреба в прискоренні процесу дослідження. Це, у свою чергу, призводить до збільшення норм навантаження на спеціаліста-трихінелоскопіста, що перевищує фізичні можливості людини та зумовлює погіршення якості трихінелоскопії.

Чутливість методу компресорної трихінелоскопії напряму залежить від розміру зразка, який становить 0,5 г

згідно з директивами ЄС і 48 зрізів розміром з просяне зерно від туш свиней та 120 зрізів від туш коней згідно з «Інструкцією з діагностики, профілактики та ліквідації трихінельозу тварин» і «Правилами передзабійного огляду тварин і ветеринарно-санітарної експертизи м'яса та м'ясних продуктів» в Україні.

Існують відмінності в інструкціях різних країн щодо кількості досліджуваних зрізів. Так, наприклад, у Німеччині методом компресорної трихінелоскопії досліджують 56 зрізів проб м'язів від туш свиней, а в Фінляндії – лише 14.

Одним з основних недоліків методу компресорної трихінелоскопії є його низька чутливість та складність виявлення трихінел неінкапсулюючих видів типу *Tr. pseudospiralis*. У Швеції під час проведення тестувань у лабораторіях огляду м'яса 22 із 26 спеціалістів-трихінелоскопістів не здатні були виявити личинки *Tr. pseudospiralis* у м'язах за середньої інтенсивності інвазії 4 личинки на 1 г м'язової тканини. Метод недостатньо ефективний при виявленні трихінел інкапсулюючих видів на ранній стадії інвазії, коли навколо личинок ще не утворились капсули. Чутливість методу підвищується за використання проєкційних мікроскопів.

Система ветеринарно-санітарного контролю з року в рік упродовж десятиліть дозволяє виявляти компресорним методом переважно інтенсивну та помірну інвазію свиней личинками трихінел, а туші зі слабкою інвазією часто надходять до споживача і є джерелом зараження людини й тварини. За слабого зараження (1–2 личинки на 1 г м'язів) ефективність методу становить близько 50%, а за ще нижчої інтенсивності інвазії виявлення личинок трихінел вважається випадковим. Отже, отримані результати вказують на те, що цей метод дослідження на трихінельоз не може вважатися надійним.

Метод компресорної трихінелоскопії більше не застосовується в країнах ЄС. Його припинили використовувати для огляду туш тварин після кількох спалахів трихінельозу в Італії та Франції за участі виду *Tr. pseudospiralis*. Більш надійним методом діагностики трихінельозу є метод перетравлювання проб м'язів у штучному шлунковому соку (ШШС). Суть цього методу, у різних його варіантах, полягає у тому, що подрібнені зразки м'язової тканини перетравлюють у

штучному шлунковому соку, який містить приблизно 1% пепсину та 1% соляної кислоти. Перетравлювання проводять за температури 42–45° С, постійно перемішуючи протягом 30 хв. і більше. Після перетравлювання та відстоювання осад досліджують під світловим чи проєкційним мікроскопом на наявність декансульованих личинок трихітел.

Цей метод виявлення личинок трихітел використовував Thognbury ще в 1897 році, коли зразки м'язів були перетравлені в розчині пепсину та соляної кислоти протягом 36 год. за температури 37,5° С.

Метод штучного перетравлювання м'язів у наступні роки знайшов широке використання, а сама методика постійно вдосконалювалась. Залежно від якості пепсину та соляної кислоти, а також бажання дослідників прискорити процес перетравлювання м'язів, змінювалися співвідношення складових частин штучного шлункового соку, температура та час інкубації. Дослідженнями з удосконалення методу перетравлювання м'язів у штучному шлунковому соку для діагностики трихінельозу займалися в США В. Schwartz, І. F. Frank and О. E. Wood, в Польщі – Z. Kozar and M. Kozar, в Німеччині – G. Koehler and G. Peiffer, у Голландії – E. I. Ruitenberg and E. A. KampeImacher та ін.

У колишньому Радянському Союзі метод штучного перетравлювання проб м'язів для виявлення личинок трихітел використовувався ще в 30-х роках минулого століття А. З. Ковшом та В. П. Коряжновим, однак з діагностичною метою даний метод почали використовувати лише з 50-х років минулого століття.

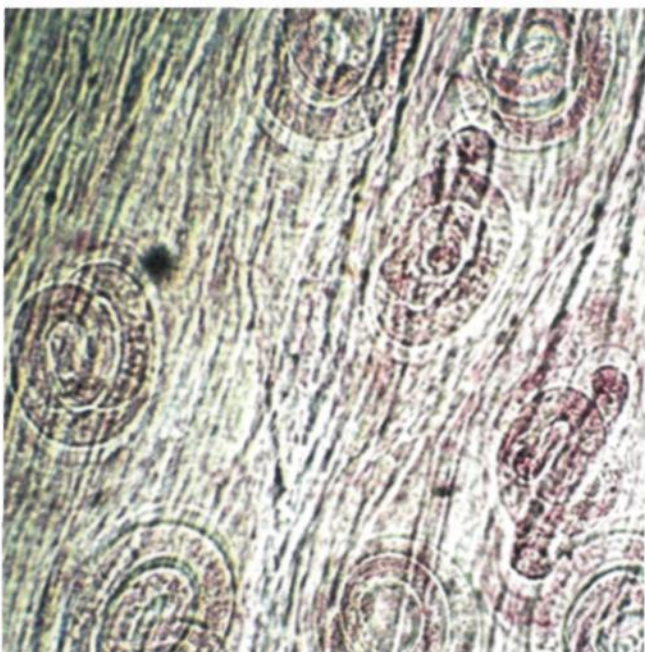
Методику прискореного перетравлювання м'язів, яка дозволяла отримувати результат дослідження через 3,5–4,5 год., розробила П. А. Владимірова. Вона подрібнювала 10 г досліджуваних м'язів на м'ясорубці, вносила фарш у колбу і заливала 15–20-кратною (до маси фаршу) кількістю ШПШС, виготовленого з розрахунку 1 % соляної кис-

лоти та 3% пепсину. Перетравлювання проводила в термостаті за температури 42–47° С. По завершенні інкубації осад зливала в чашки Петрі та досліджувала під мікроскопом. За її даними, метод перетравлювання виявився удвічі ефективнішим ніж метод компресорної трихінельоскопії. Так, у процесі дослідження цим методом 4 762 туш свиней на Московському, Мінському та Бобруйському м'ясокомбінатах було виявлено личинки трихітел у 16 тушах. За паралельного проведення компресорної трихінельоскопії – лише у 9.

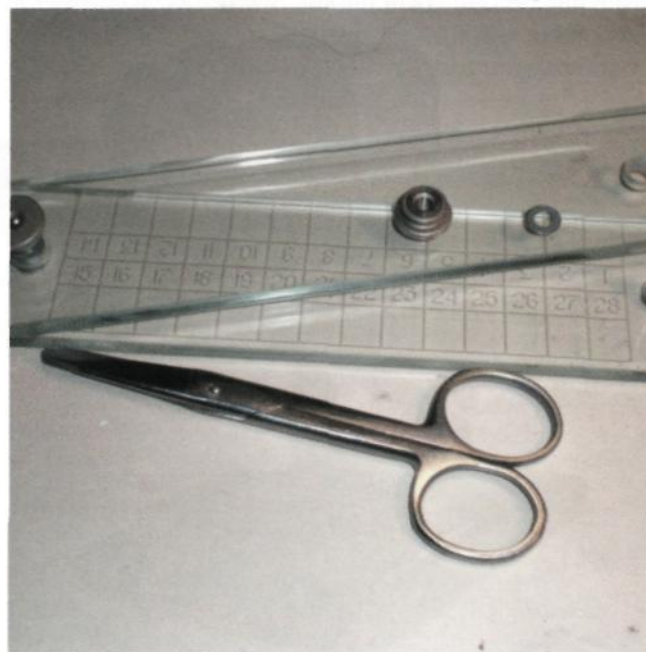
Зазвичай для дослідження методом перетравлювання у ШПШС відбирають об'єднану пробу м'язів вагою 50 – 100 г від декількох туш тварин (50–100 туш). Від кожної туші свиней відбирають проби не менше 1 г (бажано 5 г). Від туш коней Міжнародна комісія з трихінельозу рекомендує відбирати проби м'язів вагою не менше 5 г (бажано 10 г). Якщо в груповій пробі було виявлено личинки трихітел – повторно досліджують всі туші об'єднаної проби окремо або в меншій кількості до виявлення інвазованої туші.

У країнах ЄС визнано 6 методик, за якими дозволено проводити перетравлювання проб м'язів у ШПШС:

- 1) звичайне перетравлювання зразка м'язів від однієї тварини без механічного перемішування рідини або з перемішуванням вручну;
- 2) звичайне перетравлювання зразка групової проби м'язів без механічного перемішування рідини або з перемішуванням вручну;
- 3) механічне перетравлювання об'єднаних зразків за допомогою апарату «Stomacher blender» з подальшою седиментацією;
- 4) механічне перетравлювання об'єднаних зразків за допомогою апарату «Stomacher blender» з подальшою фільтрацією;
- 5) механічне перетравлювання об'єднаних зразків за допомогою магнітної мішалки;



Trichinella spiralis



Компресорій



6) механічне перетравлювання об'єднаних зразків за допомогою апарату «Trichomatic-35».

Багато типів серологічних реакцій були використані та використовуються для діагностики трихінельозної інвазії у тварини та людини. Так, для діагностики трихінельозу тварин, використовують реакцію імунофлуоресценції (РІФ), імуногістохімічні методи, імуноелектротрансфер-блот або вестерн-блот, метод імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA).

Для діагностики трихінельозу людей найчастіше використовують реакцію гемаглютинації, реакцію утворення грудочок бентоніту, РІФ, реакцію латекс-аглоїтинації та ELISA. Останній метод є найбільш чутливим.

У ході випробування реакції преципітації, реакції утворення грудочок бентоніту та реакції гемаглютинації останній метод виявився більш чутливим. Коли було порівняно методи РІФ та ELISA за діагностики трихінельозу у людей, більш чутливим виявився останній. Надійніші результати під час діагностики трихінельозу у людей були отримані за використання комбінації методів ELISA та РІФ.

Надійні результати було отримано під час використання вестерн-блоту для аналізу сироваток крові, які дали перехресну реакцію з іншими гельмінтами в РІФ, тому цей метод застосовують для діагностики трихінельозу як підтверджувальний тест.

У минулому для прижиттєвої діагностики трихінельозу також використовувалися внутрішньошкірні алергічні реакції, проте вони не виявляли навіть тварин з клінічним перебігом захворювання.

Тести для виявлення протитрихінельозних антитіл ефективні з 12-ї доби після зараження. Реакцію імунофлуоресценції та ELISA використовують для виявлення імуноглобулінів класу G (IgG). Імуноглобуліни класу IgE з'являються в першу чергу після зараження і є типовими для гострої стадії інвазії. Але їх виявлення не на-

було практичного значення через швидку елімінацію. Імуноглобуліни IgM, IgG та IgA з'являються в сироватці крові тварин на другий тиждень після зараження. Антитіла класу IgG можуть зберігатися у крові протягом кількох років.

Метод імуноферментного аналізу (ІФА) здебільшого використовується для діагностики трихінельозу тварин і людини, тому що він економічно вигідний, надійний, стандартизований і забезпечує бажаний баланс чутливості та специфічності. Це єдиний метод, який рекомендований МЕБ для діагностики трихінельозу свиней.

Згідно з нещодавніми рекомендаціями, серед серологічних тестів, ELISA – є найбільш чутливим і може використовуватись для діагностики трихінельозу як первинний тест.

ELISA традиційно використовується для виявлення антитіл у зразках сироватки крові тварин. Однак є повідомлення про дослідження наявності антитіл у міжм'язовій рідині тварин. Використання міжм'язової рідини може мати практичне значення за відсутності можливості отримання сироватки крові. Надійні результати з використанням міжм'язової рідини були отримані під час діагностики трихінельозу у свиней.

Метод ELISA відносно простий і може бути автоматизований при діагностиці трихінельозу. Крім того, він має достатню чутливість, щоб діагностувати інвазію низького рівня. Проте ELISA не може повністю замінити прямих методів виявлення личинок у м'язах. Його рекомендують використовувати для програм спостереження за стадами, а також проведення моніторингу трихінельозної інвазії.

Western blot (Вестерн-блот) – інший серологічний метод, який часто використовують для діагностики трихінельозу. ELISA та вестерн-блот використовують для виявлення протитрихінельозних IgG у коней, хоча результати досліджень деяких авторів свідчать про ненадійність серологічних методів у діагностиці трихінельозу у тварин цього виду та нездатність виявляти інвазію старше 22–30 тижнів. Вони вважають, що серологія у коней за трихінельозної інвазії відрізняється від такої у інших тварин, наприклад, свиней. Однак ELISA та Western blot здатні виявляти антитіла до трихінел у коней за низького та помірною рівня інвазії.

Неконкурентну непряму реакцію dot-ELISA, яка ґрунтується на виявленні антитіл до трихінел у сироватці крові та міжм'язовій рідині використовують у імунодіагностиці трихінельозу. Так, dot-ELISA на нітроцелюлозних мембранах для діагностики трихінельозу свиней використовували Su and Prestwood, Figueroa et al., Написанова та ін., коней – Yepes-Mulia et al., людини – Chan and Ko, причому чутливість та специфічність цього тесту за трихінельозної інвазії майже не відрізнялись від стандартного ELISA і складала від 95 до 100 %.

Наведені дані свідчать про можливість широкого використання методу dot-ELISA для оцінки імунної відповіді організму на інфекції та інвазії, а також виявлення відповідних антигенів у пробах хворих людей та тварин. Цей метод можна використовувати як для аналізу сиро-



Трихінелоскоп ПТ-80

ватки крові однієї тварини, так і для об'ємного скринінгу проб крові у польових умовах без використання цінного обладнання.

Значні можливості dot-ELISA та простота використання робить цей метод перспективним для використання у практиці ветеринарної медицини з метою діагностики інфекційних та паразитарних захворювань тварин, у тому числі трихінельозу.

На специфічність серологічних тестів впливає якість антигенів, які використовуються в реакції. Так, використання грубих соматичних антигенів із личинок трихінел може призвести до виникнення перехресних реакцій з антигенами інших нематод. На специфічність та чутливість тестів впливає також якість зразків сироватки крові. Використання зразків зі значним гемолізом, а також бактеріальним забрудненням може призвести до зниження чутливості та специфічності реакції. Під час проведення серологічних реакцій враховують: індивідуальну імунну відповідь, наявність материнських антитіл і синдром імунодефіциту. Слід також враховувати зміну сероконверсії залежно від інвазійної дози, виду збудника, а також виду господаря.

Методи, які використовуються для діагностики трихінельозу мають різні межі чутливості. За допомогою РІФ трихінельозну інвазію можна виявити з рівнем зараження 1 личинка в 10 г, ELISA – 1 личинка в 100 г, ПЛР – 1 личинка в 1000 г м'язів.

Отже, прижиттєва діагностика трихінельозу методами ІФА дозволяє виявити хворих тварин, визначити епізоотичну ситуацію з трихінельозу у процесі масових серологічних досліджень, а також якість проведених оздоровчих заходів в неблагополучних пунктах.

В Україні згідно з вимогами «Інструкції з діагностики, профілактики та ліквідації трихінельозу тварин» для прижиттєвої діагностики використовують метод ІФА, тест система для якого розроблена та виготовляється за участі авторів даного повідомлення. Посмертну (післязабійну) діагностику здійснюють методом пепсинізації з використанням модифікованого пепсину (в капсулах), що значно спрощує виготовлення ШШС та знімає пи-

тання використання в лабораторіях прекурсору – соляної кислоти.

Сучасні методи прижиттєвої діагностики трихінельозу мають високу діагностичну чутливість: тест ELISA (ІФА) – одна личинка в 100 г м'язів вже на 2–3 тиждень після зараження тварини. ПЛР – 1 личинка у 100 г м'язів.

Прижиттєва діагностика трихінельозу методами імунологічного аналізу дозволяє виявити хворих тварин, з'ясувати епізоотичну ситуацію з трихінельозу за масових серологічних досліджень та якість проведених оздоровчих заходів у неблагополучних пунктах.

Висновки:

1. У світі відома післязабійна та прижиттєва діагностика трихінельозу. Післязабійну діагностику здійснюють методами компресорної трихінелоскопії та перетравлюванням проб м'язів у ШШС, прижиттєву – імунологічними методами (ELISA, dot-ELISA). У світі не розроблена тест-система на основі ELISA для діагностики трихінельозу одночасно у тварин різних видів.
2. Якщо в більшості цивілізованих країн світу, у тому числі країн Європи, згідно із законодавствами післязабійна діагностика здійснюється методом перетравлювання проб м'язів у ШШС, а прижиттєва – імунологічними методами, то в Україні поки що основною залишається післязабійна діагностика.
3. Чутливість методу компресорної трихінелоскопії під час діагностики трихінельозу складає 3 – 4 личинки на 1 г м'язів, методу пепсинізації – 1 личинка на 1г м'язів, а чутливість ELISA – 0,01 личинки на 1 г м'язів.
4. Зважаючи на вимоги Міжнародного епізоотичного бюро, Міжнародної комісії з трихінельозу і на те, що територія нашої держави є ендемічною з трихінельозної інвазії, першочерговим завданням є розробка та впровадження у практику ветеринарної медицини України новітніх методів для прижиттєвої діагностики трихінельозу у тварин, сприйнятливих до інвазії.

Список літератури

1. Detection of Trichinella infection in food animals / [K. Nuckler, E. Pozio, W.P. Voigt et al.] / Vet. Parasitol. – 2000. – Vol. 93. – P. 335–350.
2. Артеменко Ю.Г. Трихинеллез и эхинококкоз животных в Украинской ССР. Эпизоотология и меры борьбы: дисс. д-ра вет. наук. – М., 1987. – 512 с.
3. EEC (European Economic Communities). Commission Directive 64/433/EEC // Official Journal of European Communities. – 1977. – Vol. 26. – P. 67–77.
4. Владимірова П.А. Ускоренный метод диагностики трихинеллеза // Ветеринария. – 1965. – № 10. – С. 95–96.
5. Бессонов А.С. Сравнительная эффективность различных методов диагностики трихинеллеза // Ветеринария. – 1964. – № 4. – 61 с.
6. Schwartz B. Meat – inspection aspects of trichinellosis // J. Amer. Vet. Med. Assoc – 1941. – Vol. 98. – P. 458–461.
7. Ruitenbergh E.J., Kampelmacher E.A. Diagnostische Methoden zur Feststellung der Invasion mit T. Spiralis // Fleischwirtschaft. – 1970. – Vol. 50. – P. 42–44.
8. Gamble H.R. Trichinellosis. // Office International des Epizooties. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. List A and B diseases of mammals, birds and bees. Fourth edition – Paris, France, 2000. – P. 322–327.
9. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis / J. Dupouy-Camet, W. Kocieska, F. Bruschi et al. // Expert Opinion on Pharmacotherapy. – 2002. – Vol. 3. – P. 1117–1130.
10. International Commission on Trichinellosis recommendation on the use of serological tests for the detection of Trichinella infection in animals and man / H.R. Gamble, E. Pozio, F. Bruschi et al. // Parasite. – 2004. – Vol. 11. – P. 3–13.
11. Detection of Trichinella infection in slaughter horses by ELISA and western blot analysis / L. Yopez-Mulia, C. Arriaga, N. Viveros et al. // Vet. Parasitol. – 1999. – Vol. 81. – P. 57–68.
12. Использование dot-ELISA в диагностике гельминтозов / Л.А. Написанова, Т.Н. Сивкова, В.К. Бережко // Труды Всерос. ин-та гельминтологии им. Скрыбина – М., 2002. – Т. 38. – С. 206–221.