Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

**НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**НЕБЕЩУК ОЛЕКСАНДР ДМИТРОВИЧ**

УДК 619:616.995.132.6-074/-076

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ**

**ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТРИХІНЕЛЬОЗУ ТВАРИН**

**16.00.11 – паразитологія, гельмінтологія**

**Автореферат**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата ветеринарних наук**

**Київ – 2008**

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Білоцерківському національному аграрному університеті

**Науковий керівник:** доктор ветеринарних наук, професор

**Артеменко Юрій Григорович,**

Білоцерківський національний аграрний університет, професор кафедри паразитології та фармакології

кандидат ветеринарних наук, доцент

**Артеменко Людмила Павлівна**

Білоцерківський національний аграрний університет, доцент кафедри паразитології та фармакології

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор

**Дахно Іван Степанович,**

Сумський національний аграрний університет, професор, завідувач кафедри паразитології та токсикології

доктор ветеринарних наук, доцент

**Стибель Володимир Володимирович**

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Ґжицького, доцент, завідувач кафедри паразитології та іхтіопатології

Захист відбудеться „\_\_\_“ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2008 р. о \_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.14 у Національному аграрному університеті за адресою: 03041, м. Київ-41, вул. Героїв Оборони, 15, навч. корпус № 3, ауд. 65

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного аграрного університету: 03041, м. Київ-41, вул. Героїв Оборони, 13, навч. корпус № 4, кімн. 28

Автореферат розісланий „\_\_\_“ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2008 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради М.П. Прус

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

***Актуальність теми.*** Трихінельоз – гельмінтозне зоонозне захворювання з гострим або хронічним перебігом та яскраво вираженим алергічним проявом, викликане нематодами з роду *Trichinella*. Паразити мають широкий діапазон господарів, переважно ссавців. Статевозрілі гельмінти паразитують у тонкому кишечнику тварин і людини, а їх личинки – у поперечносмугастій м’язовій тканині. Характерною особливістю збудника є те, що він не розвивається у зовнішньому середовищі. Це робить паразита незалежним від умов клімато-географічної зони і водночас гальмує його поширення. Він живе виключно в макроорганізмі і тому надовго залишається в біологічному куті, аж до загибелі чи забою тварини. Зараження людей трихінелами відбувається аліментарно, головним чином під час вживання в їжу інвазованого личинками трихінел м’яса свиней, кабанів, борсуків, ведмедів чи промислових тварин інших видів, не перевіреного на наявність личинок трихінел. Останнім часом у Європі зафіксовані випадки зараження трихінелами людей, які вживали конину, заражену личинками паразита (Pozio E. та ін, 1988; Ancelle T.J. та ін., 1988; Dupouy-Camet J. та ін, 1994).

Нині у світі існує дві системи профілактики трихінельозу. В основі першої – індивідуальне дослідження туш тварин (методами компресорної трихінелоскопії та перетравлювання проб м’язів у штучному шлунковому соці) з наступною утилізацією заражених, другої – знезараження методом глибокого замороження всіх туш свиней. Обидві системи профілактики трихінельозу не забезпечують надійного попередження зараження людини личинками трихінел через складність контролю подвірного забою свиней, вживання м’яса диких тварин тощо (Бессонов А.С., 2003).

Для своєчасного виявлення заражених трихінелами тварин, у тому числі м’ясоїдних та коней, ще до їх забою і вилучення заражених личинками туш, окрім зазначених вище методів, особливо актуальною стає зажиттєва діагностика трихінельозу (Артеменко Ю.Г., Артеменко Л.П., 2000).

Зажиттєву діагностику здійснюють шляхом серологічних досліджень поголів’я тварин. Такі дослідження проводять лише з використанням методу імуноферментного аналізу, оскільки він є більш чутливим і специфічним порівняно з іншими серологічними та алергічними методами і єдиним серед зазначених методів, рекомендованих Міжнародним епізоотичним бюро для діагностики трихінельозу (OIE, 2004).

Отже, актуальною є розробка і впровадження у практику ветеринарної медицини України сучасних ефективних методів зажиттєвої діагностики трихінельозу у тварин різних видів, зокрема свиней, коней та м’ясоїдних.

***Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.*** Тема дисертаційної роботи є одним з напрямів науково-дослідної роботи кафедри паразитології та фармакології факультету ветеринарної медицини Білоцерківського національного аграрного університету з теми „Розробити і впровадити у практику ветеринарної медицини комплексну програму боротьби з трихінельозом та цистицеркозами сільськогосподарських тварин“ (номер державної реєстрації 0198U005146).

***Мета роботи*** полягала в експериментальному обґрунтуванні імуноферментної діагностики трихінельозу тварин, розробці та впровадженні у практику ветеринарної медицини України тест-системи для зажиттєвої діагностики цієї інвазії у тварин різних видів.

Для досягнення мети були поставлені наступні ***завдання***:

* провести експериментальне зараження личинками *T. spiralis* свиней, собак та коней з метою отримання позитивних сироваток і підтвердження можливості зараження збудником коней;
* виготовити специфічний антиген з личинок *T. spiralis*;
* підібрати імуноферментний кон’югат, специфічний для імуноглобулінів тварин різних видів;
* розробити тест-систему на основі імуноферментного аналізу для діагностики трихінельозу свиней, коней та м’ясоїдних тварин;
* розробити спрощену тест-систему на основі ІФА для діагностики трихінельозу, яка дасть змогу проводити аналіз без додаткового обладнання;
* впровадити у практику ветеринарної медицини розроблені діагностичні набори;
* провести за допомогою розробленої тест-системи епізоотологічний моніторинг трихінельозної інвазії в Україні.

***Об’єкт дослідження:*** трихінельоз тварин.

***Предмет дослідження:***експериментальне обґрунтування імуно-ферментної діагностики трихінельозу тварин.

***Методи дослідження:*** компресорна трихінелоскопія, пепсинізація, *ІФА*, dot-ІФА, імуноблот, електрофорез у поліакріламідному гелі.

***Наукова новизна одержаних результатів.*** Використання рекомбінант-них білків мікроорганізмів для виготовлення імуноферментного кон’югату дало можливість створити тест-систему для виявлення протитрихінельозних антитіл у сироватці крові тварин різних видів. Запропонована діагностична імуноферментна тест-система „Trichineliso test AB“ та її модифікація дот-ІФА для виявлення антитіл проти антигенів *Т. spiralis* у сироватці крові свиней, коней і м’ясоїдних (ТУУ 24.4–23524007–729:2005).

Вперше в Україні проведено експериментальне зараження личинками *Тrichinella spiralis* коней. Вивчена динаміка протитрихінельозних антитіл у крові коней за цієї інвазії.

Впроваджені науково обґрунтовані заходи боротьби та профілактики трихінельозу в Україні з використанням новітніх методів діагностичних досліджень.

***Практичне значення одержаних результатів.*** Розроблена тест-система на основі ІФА використовується для проведення зажиттєвої діагностики трихінельозу у тварин різних видів. Модифікована тест-система на основі дот-ІФА дозволяє діагностувати трихінельоз без використання додаткового обладнання, практично в польових умовах.

За результатами досліджень, разом із співробітниками кафедри паразитології та фармакології Білоцерківського національного аграрного університету, спеціалістами Державного комітету ветеринарної медицини України і Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, розроблено і впроваджено у практику „Програму моніторингових досліджень на трихінельоз в Україні на 2005–2006 роки“, „Інструкцію з діагностики, профілактики та ліквідації трихінельозу тварин“ (2007), Тест-систему діагностичну імуноферментну „Trichineliso test AB“ та її модифікацію дот-ІФА для виявлення антитіл до *Т. spiralis* у сироватці крові свиней, коней, м’ясоїдних (2005), „Методичні рекомендації з діагностики трихінельозу тварин“ (2006), Методичні вказівки „Трихінельоз тварин та сучасна діагностика тканевих гельмінтозів“ (2007).

Результати досліджень використовуються у навчальному процесі під час викладання дисципліни „Паразитологія та інвазійні хвороби тварин“ студентам факультету ветеринарної медицини Білоцерківського національного аграрного університету і слухачам Інституту та факультетів післядипломного навчання.

***Особистий внесок здобувача.*** Автором самостійно проведено аналіз наукової літератури з напряму досліджень, викладених у дисертації. Розроблено методи та схеми досліджень. Виконано, проаналізовано та узагальнено весь обсяг експериментальних досліджень, сформульовано висновки і практичні пропозиції виробництву.

Частину експериментальних і виробничих досліджень проведено разом із доцентом кафедри паразитології та фармакології Білоцерківського національного аграрного університету Л.П. Артеменко, науковими співробітниками кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Національного аграрного університету (проф. Чумаком Р.М., проф. Скибіцьким В.Г., доц. Мартиненком Д.Л., аспірантами Рибальченком Д.Ю. та Королем Д.М.), а також завідувачем паразитологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи О.П. Литвиненком, які є співавторами опублікованих за матеріалами дисертації наукових праць, інструкції, методичних рекомендацій, плакатів, включених до списку робіт.

***Апробація результатів дисертації.*** Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: ІІІ Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини України (м. Київ, 3–7 жовтня 2005 р.), Міжнародній науково-практичній конференції “Наукові та практичні аспекти ветеринарної медицини в Україні“ (м. Біла Церква, 27–28 вересня 2006 р.), VI з’їзді паразитоценологів України з міжнародною участю (м. Харків, 11–13 жовтня 2006 р.), Науково-практичній конференції з міжнародною участю „Актуальні проблеми молекулярної діагностики у ветеринарній медицині та біології“ (м. Феодосія, 22–25 травня 2007 р.), IV державній науково-практичній конференції аспірантів і докторантів “Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті” (м. Біла Церква, 19 травня 2005 р.), V державній науково-практичній конференції аспірантів і докторантів “Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті” (м. Біла Церква, 16–19 травня 2006 р.), VІ державній науково-практичній конференції аспірантів і докторантів “Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті” (м. Біла Церква, 16–17 травня 2007 р.), VI Державній науково-практичній конференції „Аграрна наука – виробництву: сучасні проблеми ветеринарної медицини“ (м. Біла Церква, 14–15 листопада 2007 р.), Науково-практичній конференції “Новітні методи досліджень біологічних об’єктів” (м. Біла Церква, 11 листопада 2004 р.), Науково-практичному семінарі “Актуальні питання боротьби і профілактики паразитарних захворювань в Україні” (м. Харків, 10–12 жовтня 2006 р.).

**Публікації.**Основний зміст дисертації викладений у шести наукових статтях, п’ять із яких опубліковані у фахових наукових виданнях, згідно з переліком ВАК України (одна написана одноосібно), одна стаття опублікована в закордонному збірнику праць (Трудах Всероссийского института гельминтологии им. К.И. Скрябина). Крім того, видано методичні рекомендації, методичні вказівки, інструкцію, ТУ та чотири плакати.

***Обсяг і структура роботи.*** Дисертаційну роботу викладено на 117 сторінках комп’ютерного тексту, який ілюстровано 16 таблицями та 17 рисунками. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, вибору напрямів досліджень, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків та пропозицій виробництву, додатків і списку використаних джерел. Список літератури включає 305 джерел, у тому числі 220 іноземних.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

***Матеріали і методи досліджень.*** Експериментальнучастину роботи, апробацію та виробничу перевірку результатів досліджень проводили упродовж 2003–2007 років у науковій лабораторії кафедри паразитології та фармакології Білоцерківського національного аграрного університету, кафедри вірусології, мікробіології та біотехнології Національного аграрного університету, у відділі паразитології Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, а також у відділах паразитології державних лабораторій ветеринарної медицини ряду областей України (Київської, Миколаївської, Полтавської, Івано-Франківської, Хмельницької).

Матеріалом для досліджень були: штам *Тrichinella spiralis*; зразки м’язової тканини та сироватки крові, отримані від експериментально заражених трихінелами свиней, собак, коней; сироватки крові тварин із господарств ряду областей України (Київської, Миколаївської, Полтавської, Івано-Франківської, Хмельницької); позитивні й негативні на трихінельоз референс-сироватки Міжнародного епізоотичного бюро, екскреторно-секреторний антиген із личинок *Т. spiralis*, а також кон’югати імуноферментні на основі рекомбінантних білка А золотистого стафілокока та стрептококового білка G, кон’югованих з пероксидазою хрону. Рекомбінантні білки А та G люб’язно надані нам Рибальченком Д.Ю., аспірантом кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Національного аграрного університету.

Експериментальне зараження трьох свиней, двох коней та трьох собак здійснювали личинками *Т. spiralis*. Тварин заражали аліментарно фаршем з м’язів щурів, що містили личинки трихінел. Інвазійна доза складала – для свиней №1, №2 та №3 відповідно 30000, 10000 та 5000 екз. лич. на тварину; для коней №1 та №2 – 70000 та 40000 відповідно, для собак №1, №2 та №3 – по 30000 екз. лич. *Т. spiralis.*

Від дослідних тварин відбирали зразки сироваток крові на 7, 14, 21, 28, 35 та 42-у добу після зараження. Після закінчення експерименту проводили еутаназію тварин, а від їх туш відбирали зразки м’язової тканини діафрагми, масетерів, кореня язика. Кількість личинок трихінел у пробах м’язової тканини підраховували у 48 зрізах методом компресорної трихінелоскопії та в 1 г м’язової тканини після перетравлювання у штучному шлунковому соці (метод пепсинізації). Сироватки крові від експериментально заражених тварин досліджували в ІФА з використанням розробленої нами тест-системи.

У ході розробки тест-системи для діагностики трихінельозу тварин виготовляли специфічні антигени, підбирали імуноферментний кон’югат, хромоген, оптимальні розчини для розведення сироваток крові та кон’югату, а також визначали оптимальне розведення антигену, сироваток крові й кон’югату для проведення реакції. Випробували два типи антигенів: соматичний та екскреторно-секреторний. Соматичний антиген готували з екстракту личинок T. spiralis першої стадії за методикою L.R. Melcher (1943) у нашій модифікації. Екскреторно-сектеторний антиген отримували культивуванням личинок *T. spiralis* першої стадії *in vitro* на живильному середовищі (Gamble H.R., 2000).

Білковий склад отриманих антигенів визначали шляхом проведення електрофорезу в поліакриламідному гелі за методом U.K. Laemmlі (1970), специфічність – постановкою імуноблоту з позитивними і негативними сироватками крові тварин за методикою, описаною H. Towbin та ін. (1979).

Для постановки імуноблоту і твердофазного імуноферментного аналізу готували імуноферментний кон’югат на основі рекомбінантних білка G *Streptococcus spp.* та білка А *Staphylococcus aureus*, які кон’югували з пероксидазою хрону перйодатним методом за P. K. Nakane та A. Kawaoi (1974). Специфічність отриманих кон’югатів перевіряли в ІФА.

Розчинами для розведення сироваток крові під час постановки ІФА слугували фосфатно-сольові буфери, що містили 0,05% Твіну 20 та 3% БСА або 0,5% желатини, чи 5% сухого знежиреного молока. Оптимальне розведення антигену, сироваток крові та імуноферментного кон’югату для проведення ІФА визначали шляхом титрування.

На завершальному етапі розробки тест-системи здійснювали її випробування на внутрішньовиробничій панелі позитивних і негативних сироваток крові тварин та панелі сироваток Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ). Після цього розраховували чутливість та специфічність розробленого діагностикуму.

У ході розробки модифікованої тест системи для діагностики трихінельозу тварин на основі дот-ІФА як імуносорбент використовували полістиролові гребінці (мікропориста мембрана) з 9–12 зубцями. Кожен зубець сенсибілізували екскреторно-секреторним антигеном *T. spiralis* у попередньо підібраній титруванням концентрації.

Для інкубації з сироватками крові, кон’югатом, розчином хромогену, а також для промивання зубців гребінця як ванночки використовували стандартні бактеріологічні мікротитрувальні планшети на 96 луночок. У лунки ряду А ванночки для інкубації вносили зразки сироваток крові в розчині для розведення, у лунки ряду С – робочий розчин імуноферментного кон’югату (білка G, кон’югованого з пероксидазою хрону). Оптимальне розведення сироваток крові та імуноферментного кон’югату визначали титруванням. У лунки рядів В, D, E вносили розчин для промивання зубців гребінця, ряду F – розчин хромогену – аміноетилкарбазолу (АЕК) або тетраметилбензидину преципітувального (ТМВ-Precip).

Для проведення аналізу гребінець по черзі вставляли у ряд А–F з інкубацією на кожному етапі протягом певного часу та за певної температури. Час та температуру інкубації гребінця на кожному етапі підбирали емпірично. Для зупинки реакції гребінець переносили у ряд Е. Облік реакції проводили візуально. Зразки сироваток крові тварин вважали позитивними у разі появи забарвлення на відповідному зубці, негативними – за відсутності такого забарвлення.

Моніторингові дослідження на трихінельоз тварин в Україні проводили згідно з рекомендаціями Міжнародного епізоотичного бюро (OIE, 2004). З цією метою була розроблена „Програма моніторингових досліджень на трихінельоз на 2005–2006 роки“, відповідно до якої у 2006 р. досліджено 166443 свині, 716 коней, 484 кабанів, 55 собак, 75 котів, 1377 лисиць, 39 вовків, 5 борсуків. Дослідження проводили за допомогою розробленої нами тест-системи „Trichineliso test AB“ (ТУУ 24.4-23524007-729:2005) та „Набору діагностичного для ідентифікації личинок *Trichinellа spiralis* методом перетравлення проб м’язів“(ТУУ 24.4-23524007-058:2005).

Цифрові матеріали результатів досліджень обробляли статистичними методами з використання табличного процесора Microsoft Excel for Windows.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ**

**Експериментальне зараження тварин личинками трихінел**

Аналіз результатів компресорної трихінелоскопії та перетравлювання проб м’язової тканини від експериментально заражених личинками трихінел тварин показав, що найбільш ураженими у свиней були ніжки діафрагми, які містили відповідно у особин №1, №2 та №3 – 341,3±12,7, 295,7±6,4 та 17,7±2,1 лич. в 1 г м’язової тканини, менш ураженою була м’язова тканина язика – 228,6±7,9, 248,5±14,9, 9,5±1,1 та масетерів – 210,5±6,7, 162,4±10,1, 7,1±0,7. Слід відмітити, що кількість личинок у м’язовій тканині експериментально заражених свиней залежала від дози інвазійного матеріалу, отриманого тваринами.

Вперше в Україні було експериментально відтворено трихінельозну інвазію у 2-х коней. Після еутаназії від обох коней було виділено личинки трихінел методами компресорної трихінелоскопії та перетравлюванням проб м’язової тканини у штучному шлунковому соці. За компресорної трихінелоскопії личинки були згорнуті у спіраль та мали добре сформовану капсулу.

На відміну від свиней, у експериментально заражених коней інтенсивність інвазії личинками трихінел масетерів та м’язової тканини язика була вищою, ніж діафрагми. Так, у коня № 1 було 38,4±1,7 лич. в 1 г м’язової тканини масетерів та 30,8±1,8 – в 1 г м’язової тканини язика, у коня № 2, відповідно, 5,6±0,4 та 7,5±0,9 лич. в 1 г. Інтенсивність інвазії м’язової тканини діафрагми у коня № 1 становила 22,6±1,6, у коня № 2 – 5,1±0,6 лич. в 1 г.

Отримані дані підтверджують необхідність виконання вимог міжнародного законодавства щодо дослідження туш коней на трихінельоз.

У експериментально заражених личинками *T. spiralis* собак, як і свиней, інтенсивність інвазії діафрагми була вищою, ніж масетерів та язика, і складала у собаки № 1 – 3,4, у собаки № 2 – 31,7 екз. лич. в 1 г. Личинок трихінел не виявлено у м’язовій тканині собаки №3 під час компресорної трихінелоскопії та пепсинізації проб м’язів.

Діагностичні титри антитіл (1:20) у сироватках крові експериментально заражених свиней при дослідженні в ІФА з’являлися на 14–28-у добу. Титри антитіл протягом експерименту зростали і на 35-у добу (завершення експерименту) досягали 1:100–1:800. Антитіла до трихінел у обох експериментально заражених коней виявляли на 14-у добу після зараження (рис. 1). Максимальний рівень антитіл у титрі 1:400 у коня № 1 спостерігали на 28-у добу, у коня № 2 – на 21-у добу. У експериментально заражених собак антитіла в крові виявляли на 14–21-у добу, їх титри на 35-у добу після зараження сягали 1:100–1:400.

Слід зазначити, що у собаки №3, в якої не було виявлено личинок трихінел прямими методами, антитіла виявляли уже на 14-у добу після зараження в титрі 1:20, а на 35-у добу інвазії – 1:200. Відсутність личинок у м’язовій тканині цієї тварини при дослідженні прямими методами і водночас наявність у неї протитрихінельозних антитіл пояснюємо значно вищою чутливістю методу ІФА порівняно з компресорною трихінелоскопією та методом пепсинізації.



Рис. 1. Динаміка утворення антитіл проти *Т. spiralis* в крові коней.

Отже, при експериментальному зараженні трихінелами свиней, коней та собак у всіх тварин на 2–4-й тижні після зараження виявляли антитіла класу IgG. До кінця експерименту (на 35-у добу у свиней, собак та на 42-у – у коней) їх рівень був досить високий, що свідчить про ефективність імуноферментної діагностики трихінельозу тварин.

**Розробка тест-системи для діагностики трихінельозу тварин**

Чутливість та специфічність антигену для будь-якого серологічного тесту, у тому числі для ІФА, має надзвичайно важливе значення. Тому одним із основних етапів нашої роботи було отримання специфічного антигену. У процесі розробки тест-системи ми виготовили та випробували два типи антигенів личинок *T. spiralis* – соматичний та екскреторно-секреторний.

Розділенням білків соматичного антигену за молекулярною масою в ПААГ було визначено, що до його складу входить близько 15 білкових компонентів молекулярною масою від 27 до 120 kDa, 5 з яких були мажорними і мали молекулярну масу 38, 40, 47, 60 та 70 kDa.

Під час проведення імуноблоту з використанням соматичного антигену імунореактивним виявився цілий ряд протеїнів з молекулярною масою від 38 до 110 kDa, однак білки з молекулярною масою 57, 60, 80 та 85 kDa реагували з антитілами сироватки крові вільних від трихінел тварин. Очевидно, ці компоненти антигену є неспецифічними і тому, можливо, виникають перехресні реакції з антитілами, виробленими проти антигенів інших гельмінтів (чи мікроорганізмів).

Екскреторно-секреторний антиген, отриманий шляхом культивування личинок *in vitro* протягом 18 год, складався із протеїнів, що мали молекулярну масу 43, 49, 55 та 110 kDa. Мажорним був білок з молекулярною масою 43 kDa (рис. 2).

 1 2 3 4

  

Рис. 2. Результати електрофорезу трихінельозних антигенів у ПААГ: 1 – повний екстракт личинок *Т. spiralis*; 2 – соматичний антиген; 3 – екскреторно-секреторний антиген; 4 – маркер молекулярної маси білків.

В імуноблоті усі зазначені білкові компоненти отриманого нами екскреторно-секреторного антигену специфічно розпізнавались антитілами позитивних сироваток крові, хоча більшу імунореактивність відмічали у протеїнів, що мали молекулярну масу 43 kDa. Будь-яких перехресних реакцій під час проведення імуноблоту з екскреторно-секреторним антигеном не спостерігали.

У ході перевірки на чутливість і специфічність соматичного та екскреторно-секреторного антигенів в ІФА з використанням внутрішньо-виробничої панелі позитивних і негативних щодо трихінельозу сироваток крові свиней було встановлено, що антигени мають однакову (100%) чутливість, проте специфічність соматичного антигену була нижчою і складала 98,8%, тоді як екскреторно-секреторного – 100%. Соматичний антиген неспецифічно взаємодіяв з сироваткою крові, отриманою від тварини, зараженої ехінококами. Тому для виготовлення тест-системи ми використовували екскреторно-секреторний антиген.

Одним із основних компонентів імуноферментних тест-систем є кон’югат. Для того, щоб проводити дослідження в ІФА сироваток крові від тварин кількох видів, як імуноферментний кон’югат ми використали рекомбінантні білки А *Staphylococcus aureus* та G *Streptococcus spр*., здатні взаємодіяти з IgG тварин різних видів.

Аналіз проведених випробувань отриманих кон’югатів показав, що кон’югати на основі білків А та G зв’язуються з IgG сироваток крові свиней, собак, лисиць, кролів, людини. Однак білок А, на відміну від білка G, не взаємодіяв з антитілами сироватки крові коней. Тому для виготовлення тест системи, яка дасть змогу виявляти антитіла до трихінел у сироватці крові тварин різних видів, у тому числі коней, був використаний кон’югат на основі рекомбінантного білка G *Streptococcus spp*., кон’югований з пероксидазою хрону.

Порівнюючи розчини для розведення досліджуваних зразків, що містили 3% БСА, 0,5 % желатини та 5% сухого знежиреного молока, встановили, що кращий розчин, який усуває неспецифічну взаємодію антитіл з антигеном, а також з активною поверхнею луночок планшетів, є фосфатно-сольовий буфер з умістом 0,05% неіонного детергента Твіну 20 та 5% сухого знежиреного молока.

У результаті проведених випробувань на внутрішньовиробничій панелі позитивних сироваток крові від експериментально заражених личинками *T. spiralis* свиней, собак та коней, сироваток крові від тварин вільних від кишкових гельмінтів, тварин заражених іншими гельмінтами, а також позитивних та негативних референс-сироваток МЕБ, було визначено, що чутливість та специфічність розробленої тест-системи складає 100%. Результати проведення контрольних випробувань тест-системи на панелі сироваток крові ДНКІБШМ підтвердили 100% чутливість та специфічність тест-системи.

Зажиттєва діагностика трихінельозу методами імуноферментного аналізу дозволяє виявити хворих тварин, визначити епізоотичну ситуацію з трихінельозу у процесі масових серологічних досліджень, а також якість проведених оздоровчих заходів у неблагополучних пунктах. Однак, на сьогодні такі дослідження можна провести лише у спеціально обладнаних лабораторіях. Тому виникла необхідність створення спрощеної тест-системи на основі дот-ІФА, яка дозволяла б проводити діагностику трихінельозу в умовах, де нема змоги провести дослідження з використанням стандартного ІФА.

Нами була адаптована тест-система на основі ІФА для проведення аналізу без використання автоматичного промивача та спектрофотометра. Як імуносорбент замість планшетів були використані полістиролові гребінці, на зубцях яких сорбували ексреторно-секреторний антиген у кількості 1,5 мкг на зубець. Його наносили краплями по 3 мкл. Ванночками для інкубації слугували стандартні мікротитрувальні планшети на 96 лунок. Для розведення сироваток крові, кон’югату та промивання зубців гребінця використовували буферні розчини стандартного ІФА; імуноферментний кон’югат – білок G, кон’югований з пероксидазою хрону. Спрощену тест-систему було відтитровано так, щоб проведення аналізу виконувати за кімнатної температури (18–22оС). Отже, дослідження можна виконувати без термостата.

Порівняння чутливості та специфічності стандартної тест-системи та тест-системи на основі дот-ІФА показало, що в експерименті остання за чутливістю та специфічністю не відрізнялася від стандартної ІФА і становила 100 %.

Ми вважаємо, що розроблена тест-система буде використовуватись у лабораторіях ветеринарної медицини, де відсутнє обладнання для постановки стандартного ІФА, у господарствах та польових умовах.

**Результати моніторингових досліджень на трихінельоз в Україні**

Аналіз результатів моніторингових досліджень, проведених у 2006 р., засвідчив, що антитіла до личинок трихінел були виявлені у сироватках крові 5 свиней з Миколаївської області, що становить 0,003% від кількості досліджених тварин. Після забою у тушах усіх серологічно позитивних тварин знайдені личинки трихінел методом пепсинізації.

У процесі дослідження сироваток крові від 716 коней з різних регіонів України в жодної тварини протитрихінельозних антитіл не виявлено.

Серологічному дослідженню на трихінельоз піддано 55 собак та 75 котів з АР Крим, Вінницької, Кіровоградської, Одеської та Харківської областей. Сироватки крові цих тварин не мали протитрихінельозних антитіл. Інвазію також не було виявлено у 484 досліджених кабанів.

Під час дослідження 1377 лисиць позитивними виявилися 30 тварин (9 із 181 досліджених в АР Крим (4,97%), 12 із 140 – у Закарпатті (8,57%), 1 із 227 – у Полтавській (0,44%) та 8 із 236 – у Харківській областях (3,39%)), що складало в середньому 2,17%.

Із 39 досліджених вовків трихінельозну інвазію виявили у 18 (17 з 20 досліджених в Закарпатській та 1 з 2 – у Миколаївській областях), що становило 46,15%.

Отже, трихінельозна інвазія поширена у продуктивних тварин (виявлена у 0,003% свиней). Крім того, її реєстрували у диких тварин (2,17 % лисиць та 46,15 % вовків), які є резервуаром збудника трихінельозу, а, отже, джерелом інвазії для домашніх тварин.

**ВИСНОВКИ**

1. У дисертації теоретично і експериментально обґрунтовані методи імуноферментної діагностики трихінельозу тварин (свиней, коней, м’ясоїдних) та розроблено і впроваджено у практику ветеринарної медицини тест-системи на основі ІФА, дот-ІФА та ТУ до них, що є новим і перспективним вирішенням проблеми діагностики трихінельозу в Україні.

2. Доведено, що високоспецифічним антигеном при імуноферментній діагностиці трихінельозу тварин є екскреторно-секреторний (порівнянно з соматичним), виготовлений шляхом культивування личинок *Trichinella spiralis* *in vitro* на модифікованому живильному середовищі DMEM. Основним компонентом екскреторно-секреторного антигену є протеїн з молекулярною масою 43 kDa.

4. Встановлено, що кращим імуноферментним кон’югатом для виготовлення тест-системи, який специфічний для імуноглобулінів класу G свиней, коней та м’ясоїдних, є рекомбінантний білок G *Streptococcus spp*., кон’югований з пероксидазою хрону.

5. У процесі експериментального відтворення трихінельозної інвазії у тварин, в тому числі коней, специфічні антитіла (Ig G) з’являються у крові на 14–28-у добу після зараження, максимальні їх титри (1:400–1:800) спостерігаються на 21–28-у добу, що дозволяє встановити діагноз за допомогою ІФА на 3–4-й тижні після зараження тварин.

6. Розроблена тест-система „Trichineliso test AB“ за чутливістю та специфічністю не поступається тест-системам виробництва Російської Федерації (ВІГІС, ЗАО „Вектор-бест“) і Німеччини (Федеральний інститут охорони здоров’я та ветеринарної медицини, Берлін) і становить 100%.

7. Розроблена модифікація стандартної тест-системи „Trichineliso test AB“ на основі дот-ІФА дає змогу проводити і оцінювати реакцію візуально без використання спеціального обладнання (автоматичного промивача, автоматичного спектрофотометра, термостата). Чутливість та специфічність її не поступається стандартній тест-системі.

8. Результати моніторингових досліджень на трихінельоз, проведених в Україні у 2006 р. з використанням розробленої тест-системи, свідчать про поширення трихінельозу серед свійських (свиней – 0,003%) і диких (лисиць – 2,17, вовків – 46,15%) тварин.

**ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

1. Для зажиттєвого виявлення збудника трихінельозу у тварин (свиней, коней, м’ясоїдних) та визначення епізоотичної ситуації щодо даної інвазії в Україні пропонуємо:

1.1 „Інструкцію з діагностики, профілактики та ліквідації трихінельозу тварин“, зареєстровану Міністерством юстиції України 17 серпня 2007 р.

1.2 „Методичні рекомендації з діагностики трихінельозу тварин“, затверджені Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства АПК України 3 липня 2006 р.

1.3 Розроблену тест-систему діагностичну імуноферментну „Ttichineliso test AB“ ТУУ 24.4–23524007-729:2005, затверджену Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства АПК України 22 березня 2005 р.

1.4 У господарствах та лабораторіях ветеринарної медицини, де відсутні умови для проведення стандартного ІФА, використовувати модифіковану тест-систему „Ttichineliso test AB“ дот-ІФА.

2. Результати досліджень використовувати у навчальному процесі під час викладання дисципліни „Паразитологія та інвазійні хвороби тварин“ студентам і магістрантам факультетів ветеринарної медицини вищих навчальних закладів, а також слухачам Інституту післядипломного навчання керівників та спеціалістів ветеринарної медицини.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

**Методичні рекомендації**

1. Методичні рекомендації з діагностики трихінельозу тварин / В.М. Горжеєв, О.М. Вержиховський, Р.М. Чумак, Ю.Г. Артеменко, Л.П. Артеменко, **О.Д. Небещук**, Д.Л. Мартиненко, А.В. Абрамов, О.П. Литвиненко. – К, 2006. – 31 с. *(Дисертант брав участь у аналізі літературних джерел, підготовці розділу „Методи прижиттєвої діагностики трихінельозу“, графічному забезпеченні методичних рекомендацій)*.
2. Трихінельоз тварин та сучасна діагностика тканевих гельмінтозів: Методичні рекомендації для фахівців ветеринарної медицини, слухачів інституту післядипломного навчання, керівників та спеціалістів ветеринарної медицини і студентів факультетів ветеринарної медицини / Ю.Г. Артеменко, Л.П. Артеменко, С.І. Пономар, **О.Д. Небещук**, А.В. Абрамов, О.П. Литвиненко. – Біла Церква, 2007. – 77 с. *(Дисертант брав участь у аналізі літературних джерел, графічному забезпеченні рекомендацій, підготував розділ, присвячений діагностиці трихінельозу)*.

**Статті, видані у фахових виданнях**

1. Небещук О.Д. Удосконалення серологічної діагностики трихі-нельозу // Аграрні вісті. – 2005. – № 2. – С. 21 – 23.
2. Артеменко Ю.Г., **Небещук О.Д.** Діагностика трихінельозу в коней // Вет. медицина України. – 2006. – № 5. – С. 14 – 15. *(Дисертант брав участь у розробці діагностичної тест-системи, проводив відбір сироваток крові, досліджував їх в ІФА, брав участь в обробці та аналізі одержаних результатів, підготував матеріали до друку).*
3. Артеменко Ю.Г., **Небещук А.Д.** Экспериментальный трихинеллёз лошадей // Труды Всерос. ин-та гельминтол. им. К.И. Скрябина. – М., 2006. – Т. 43. – С. 9 – 14. *(Дисертант проводив експериментальне зараження тварин, відбирав зразки крові та м’язів, проводив дослідження сироватки крові в ІФА, підраховував кількість личинок трихінел у різних групах м’язів, обробив та узагальнив одержані результати, підготував роботу до друку).*
4. Артеменко Ю.Г., Артеменко Л.П., **Небещук О.Д.** Основні напрями боротьби з трихінельозом в Україні на сучасному етапі // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2006. – Вип. 39. – С. 51 – 56. *(Дисертант брав участь у розробці імуноферментної тест-системи для діагностики трихінельозу тварин, підготував матеріали до друку).*
5. Моніторингові дослідження на трихінельоз в Україні / Ю.Г. Артеменко, Л.П. Артеменко, **О.Д. Небещук**, О.П. Литвиненко // Вет. медицина. – Харків, 2007. – Вип. 88. – С. 156 – 158. *(Дисертант брав участь у розробці програми моніторингових досліджень на трихінельоз в Україні, у обробці та аналізі одержаних результатів, підготував матеріали до друку).*
6. Отримання стандартних сироваток для тест-систем ІФА при трихінельозній інвазії / А.М. Головко, Я.А. Древаль, Ю.Г. Артеменко, Л.П. Артеменко, **О.Д. Небещук**, Д.Ю. Рибальченко, Д.М. Король // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2004. – Вип. 29. – С. 64 – 70. *(Дисертант проводив експериментальне зараження тварин, відбирав зразки сироваток крові, досліджував в ІФА, брав участь у обробці та аналізі одержаних результатів).*

**Нормативні документи**

1. Інструкція з діагностики, профілактики та ліквідації трихінельозу тварин / В.М. Горжеєв, А.В. Абрамов, Ю.Г. Артеменко, Л.П. Артеменко, О.П. Литвиненко, **О.Д. Небещук**. – К., 2007. *(Дисертант брав участь у підготовці розділу інструкції „Діагностика“)*.
2. Програма моніторингових досліджень на трихінельоз в Україні на 2005–2006 роки / В.М. Горжеєв, А.В. Абрамов, Л.П. Артеменко, О.П. Литвиненко, **О.Д. Небещук**. – К., 2005. *(Дисертант брав участь у розробці програми, для її виконання використана розроблена тест-система)*.

**Розробки**

1. Тест-система діагностична імуноферментна „Trichineliso test AB“. Технічні умови / Л.П. Артеменко, В.Г. Скибіцький, Р.М. Чумак, С.Д. Мельничук, М.Д. Мельничук, Д.Л. Мартиненко, Л.В. Ніколайчук, Д.Ю. Рибальченко, В.Г. Спірідонов, Д.М. Король, **О.Д. Небещук**. – К., 2005. *(Дисертант брав участь у розробці, випробуванні та впровадженні у практику тест-системи)*.
2. Набір діагностичний для ідентифікації личинок *Trichinella spiralis* методом перетравлення проб м’язів. Технічні умови / Ю.Г. Артеменко, Л.П. Артеменко, Д.Ю. Рибальченко, **О.Д. Небещук**, О.П. Литвиненко, Д.М. Король. – К., 2005. *(Дисертант брав участь у розробці, випробуванні та впровадженні у практику набору)*.

**Плакати**

1. Схема розвитку личинок трихінел / А.В. Абрамов, О.П. Литвиненко, Л.П. Артеменко, **О.Д. Небещук**, С.І. Пономар. – К., 2006*.*
2. Післязабійна (посмертна) діагностика тканевих паразитозів / А.В. Абрамов, О.П. Литвиненко, Л.П. Артеменко, **О.Д. Небещук**, С.І. Пономар. – К., 2006.
3. Методи посмертної діагностики трихінельозу тварин / А.В. Абрамов, О.П. Литвиненко, Л.П.Артеменко, **О.Д. Небещук**, С.І. Пономар. – К., 2006.
4. Схема діагностики трихінельозу тварин методом ІФА DOT-ELISA / А.В. Абрамов, О.П. Литвиненко, Л.П. Артеменко, **О.Д. Небещук**, С.І. Пономар. – К., 2006.

**Небещук О.Д. Експериментальне обґрунтування імуноферментної діагностики трихінельозу тварин.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.11 – паразитологія, гельмінтологія. – Національний аграрний університет, Київ, 2008.

У дисертації викладено дані експериментального зараження личинками *Trichinella spiralis* свиней, собак та коней. Визначено інтенсивність інвазії окремих груп м’язів у експериментально заражених тварин. Встановлено, що у коней інтенсивність інвазії масетерів та м’язів язика вища, ніж м’язів діафрагми. Вивчено динаміку утворення антитіл у тварин за експериментальної інвазії. Діагностичні титри антитіл (IgG) за допомогою ІФА виявлено в сироватці крові тварин на 2–4-й тижні після зараження.

Вперше розроблено та впроваджено у практику ветеринарної медицини тест-систему діагностичну імуноферментну „Trichineliso test AB“ для виявлення антитіл до *Trichinella spiralis* у сироватці крові свиней, коней і м’ясоїдних тварин. Розроблено модифікацію тест-системи „Trichineliso test AB“ на основі дот-ІФА, яка дозволяє проводити діагностику трихінельозу без використання спеціального обладнання.

Проведено моніторингові дослідження на трихінельоз в Україні у 2006 р. Трихінельозну інвазію виявлено у 0,003% свиней, 2,17 – лисиць та 46,15 % вовків. Запропоновано фахівцям ветеринарної медицини науково обґрунтовані заходи боротьби та профілактики трихінельозу.

**Ключові слова:** трихінельоз, Trichinella spiralis, личинки трихінел, діагностика, ІФА, дот-ІФА, антитіла.

**Небещук А.Д. Экспериментальное обоснование иммунофермент-ной диагностики трихинеллёза животных.** – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности: 16.00.11 – паразитология, гельминтология. – Национальный аграрный университет, Киев, 2008.

В диссертации изложены данные по экспериментальной инвазии личинками *Trichinella spiralis* свиней, собак и лошадей. Определена интенсивность инвазии отдельных групп мышц у экспериментально зараженных животных. Установлено, что у лошадей массетеры и мышцы языка более интенсивно заражены личинками трихинелл, чем мышцы диафрагмы. Изучено динамику образования антител у животных при экспериментальной инвазии. Диагностические титры антител (IgG) против трихинелл с помощью ІФА выявлены в сыворотке крови животных на 2–4-ю неделю после заражения. Титры антител на 35-й день инвазии у свиней составляли 1:100–1:800, лошадей – 1:400, собак – 1:100–1400.

Получены соматический и экскреторно-секреторный антигены из личинок *Trichinella spiralis*. Определено, что в состав соматического антигена входит 15 белков с молекулярным весом от 27 до 120 kDa, экскреторно-секреторного – 4 с молекулярным весом 43, 49, 55 и 110 kDa. Основным компонентом экскреторно-секреторного антигена был белок с молекулярным весом 43 kDa. Специфичность соматического антигена составляла 98,8 %, экскреторно-секреторного – 100, чувствительность полученных антигенов составила 100 %.

Впервые разработана и внедрена в практику ветеринарной медицины тест-система диагностическая иммуноферментная „Trichineliso test AB“ для выявления антител против *Trichinella spiralis* в сыворотке крови свиней, лошадей и плотоядных животных. В тест-системе использован экскреторно-секреторный антиген личинок *Trichinella spiralis*, в качестве иммуноферментного конъюгата – рекомбинантный белок G *Streptococcus spр*., конъюгированный с пероксидазой хрена.

Разработана модификация тест-системы „Trichineliso test AB“ на основе дот-ИФА, где в качестве иммуносорбента использованы полистироловые гребёнки, зубцы которых сорбированы трихинеллёзным антигеном. Тест-система оттитрована для проведения анализа при комнатной температуре без использования специального оборудования.

Проведён мониторинг трихинеллёзной инвазии в Украине в 2006 г. Разработана и выполнена „Программа мониторинговых исследований на трихинеллёз на 2005–2006 гг.“, согласно которой исследовано 166443 голов свиней, 716 – лошадей, 484 – кабанов, 55 – собак, 75 – котов, 1377 – лисиц, 39 – волков, 5 – борсуков. Инвазия обнаружена в 0,003 % свиней, 2,17 – лисиц и 46,15 % волков.

Специалистам ветеринарной медицины предложены научно обоснованные мероприятия по борьбе и профилактике трихинеллеза.

**Ключевые слова:** трихинеллёз, Trichinella spiralis, личинки трихинелл, диагностика, ИФА, дот-ИФА, антитела.

**Nebeschuk A.** **Experimental substantiation of immune enzymatic diagnostics of trichinellosis in animals.** – Manuscript.

The dissertation for obtaining the scientific degree of veterinary sciences in speciality 16.00.11 – parasitology, helmintology. – National Agrarian University, Kyiv, 2008.

Data of experimental contamination of pigs, dogs and horses by larvae Trichnella spiralis was stated in the dissertation. Intensity of invasion some groups of muscles in experimentally contaminated animals was determined. It was ascertained that in horses intensity of invasion of tongue muscles is higher than diaphragm muscles. Dynamics of antibodies formation in animals at experimental invasion was studied. Diagnostic titres of antibodies (IgG) with the help of ELISA in the blood serum of animals at 2-d and 4-th week after contamination were found.

Diagnostic ELISA test system “Trichineliso test AB” to define antibodies in the blood serum in pigs, horses and flesh eating animals was worked out and employed into practice. Test system “Trichineliso AB” on the basis of dot-ELISA, which allows to conduct diagnosis trichinellosis without special equipment was worked out.

Monitoring research on trichinellosis in Ukraine in 2006 was conducted. Trichinella invasion was found in 0,003 % of pigs, 2,17% - foxes and 46,15 % - wolves. Scientific grounded means of combating and prophylaxis trichinellosis was proposed to veterinary doctors.

**Key words:** trichinellosis, Trichinella spiralis, Trichinella larvae, diagnostics, ELISA, dot-ELISA, antibodies.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>