

АКАДЕМИЯ АГРАРНЫХ НАУК РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ им. С.Н. ВУШЕВСКОГО

На правах рукописи

Д И К
Замба Николаевна

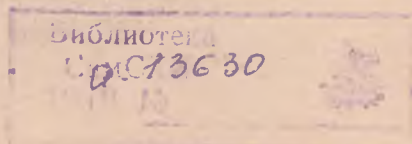
УДК 576.8.095.1.616.993.193

РАСПРОСТРАНЕНИЕ САРКОЦИСТОЗА ОВЕЦ В РЕСПУБЛИКЕ
МОДЕВА И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ЕГО ПРИКЛЮЖЕННОЙ
ДИАГНОСТИКИ

Специальность: 03.00.19 - паразитология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Минск - 1992



Работа выполнена в Институте генетики Академии наук
и кооперативах Республики Молдова

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
профессор М.В.ЯКОВСКИЙ

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук,
профессор А.И.Нтусебкч
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
А.Е.Антоненко

Будущее учреждение: Всероссийский институт
экспериментальной ветеринарии

Защита диссертации состоится "19" декабря 1992 года
в "14" часов на заседании специализированного совета
К 122.14.01 при Белорусском научно-исследовательском институте
экспериментальной ветеринарии им. С.Е.Шмалеского
(223020, Минский район, п/о Купцевщина, БелНИИЭВ).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан "5" ноября 1992 года

Ученый секретарь
специализированного совета,
доктор ветеринарных наук,
профессор

Б.А.ЛИНИК

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

А к т у а л ь н о с т ь т е м ы. Одной из причин снижения продуктивности сельскохозяйственных животных, а также ухудшения качества получаемой от них продукции являются многие паразитарные заболевания, вызываемые паразитическими простейшими, в том числе различными видами рода *Sarcocystis*.

В этой связи изучение ряда аспектов распространения саркоцистозной инвазии среди сельскохозяйственных животных и разработка методов ее прижизненной диагностики является весьма актуальной и необходимой задачей при осуществлении научно обоснованных методов профилактики и ликвидации указанного заболевания.

Продолжение научных исследований по научно-технической программе "Высокоэффективные процессы производства продовольствия" в рамках Стран Независимых Государств (СНГ), предусматривает выполнение задания "Теоретически обосновать и разработать высокоэффективные средства и методы диагностики, профилактики и терапии болезней животных (в т.ч. зооантропозов)", реализация которого предусматривает поэтапные научные исследования по разработке интегрированной защиты животных на основе создания экологически чистых препаратов с использованием методов молекулярной биологии и современной биотехнологии, обеспечивающих ветеринарное благополучие.

При этом особое место уделяется разработке высокоэффективных средств и методов диагностики, терапии и профилактики инфекционных и инвазионных заболеваний на основе современной биотехнологии, генной и клеточной инженерии, компьютеризации, обеспечивающие стойкое ветеринарное благополучие и высокое санитарное качество продуктов животноводства.

Важнейшим условием успешного выполнения предусмотренных указанной научно-технической программой научных исследований является проведение многолетних селекционно-племенных работ со здоровыми животными, что на сегодняшний день не так просто обеспечить из-за массового их поражения хроническими инфекционными, паразитарными и незаразными заболеваниями.

Так, например, как можно начинать многолетнюю работу на крупном рогатом скоте или овцах, если они во многих регионах СНГ и других странах земного шара до 100 процентов поражены пролиферативной формой саркоцистозной инвазии, а ее интенсивность, к примеру, в условиях Республики Молдова достигает от 10 до 5000 саркоцист в 24 срезах мышечной ткани (вес 200 мг), исследуемой методом саркоцистоскопии.

По многочисленным данным ряда отечественных и зарубежных исследователей, саркоцистозная инвазия причиняет большой экономический ущерб животноводству в результате нередкого летального исхода заболевания, задержки роста и развития молодняка, нарушения репродуктивных функций, снижения мясной и молочной продуктивности, а также ухудшения биохимических, физико-химических и пищевых качеств мяса, являющегося в таких случаях всемогущим источником инвазии и массовых пищевых отравлений людей (В.И.Коновов, 1925; А.Г.Ос-ташевокий, 1940; А.С.Степоян, 1950; А.С.Лубянецкий, 1956; Г.В.Коновенко, 1967; О.Г.Рыбалтовский, 1971; Д.А.Лапасик, и др., 1971; Д.Н.Засухин, 1972; З.И.Кислякова, 1972; А.А.Попов, 1972; М.А.Боробьев и др., 1980; А.Г.Какуринна, 1976, 1978; М.К.Горбов, 1977; И.И.Вершинин и др., 1982; В. Babudieri, 1932; В. Baticic, 1965; Н. Thornthor, 1972; и др.).

Принимая во внимание, что саркоцистозная инвазия имеет широкое распространение среди теплокровных животных, птиц, рептилий и

людей на всех континентах земного шара и не является безобидным заболеванием, Всемирная Организация Здравоохранения включила ее в перечень важнейших проблем, требующих научного изучения.

В Республике Молдова саркоцистоз впервые был зарегистрирован ветеринарной службой республики в 1968 году у крупного рогатого скота. В дальнейшем научные исследования по этому заболеванию проводились в Молдавском НИИ животноводства и ветеринарии, институте зоологии и физиологии и Институте генетики Академии наук Республики Молдова.

Организация лечебно-профилактических мер борьбы с саркоцистозной инвазией овец осложнена отсутствием эффективных лечебных препаратов, низким уровнем ветеринарно-санитарных требований по предотвращению окармливания пораженного саркоцистами мяса собакам, кошкам и другим плотоядным, являющимся окончательными хозяевами в биологическом цикле развития паразита. Осложняется также разработка традиционных методов борьбы с паразитарными заболеваниями, предусматривающих разрыв биологической цепи в развитии паразита, так как в биологическом цикле развития некоторых видов возбудителей саркоцистоза человек выступает в роли окончательного хозяина, а его, как известно, невозможно изолировать от животных.

Целью настоящей работы было изучение некоторых аспектов краевой эпизоотологии саркоцистозной инвазии овец в условиях Республики Молдова, возможности культивирования пролиферативных цистных стадий развития возбудителей саркоцистоза на искусственных полусинтетических питательных средах с целью получения биомассы для изготовления биологических препаратов (антигенов, вакцин) и совершенствования методов прижизненной диагностики этой инвазии у овец, собак и кошек.

З а д а ч и и с с л е д о в а н и я :

- изучить экстенсивность саркоцистозной инвазии овец на территории Республики Молдова в зависимости от возраста, пола, сезона года, природно-экономической зоны их размещения, а также выявить пораженность этой инвазией окончательных хозяев - собак и кошек;
- изучить возможность культивирования чистых стадий *Sarcocystis ovis* и *Sarcocystis ovifelis* (*S. tenella*) на искусственных полусинтетических питательных средах с целью получения биомассы для изготовления биопрепаратов (антигена);
- разработать методы прижизненной диагностики саркоцистозной инвазии у овец, собак и кошек.

Н а у ч н а я н о в и з н а р а б о т ы .

Впервые в Республике Молдова проведены исследования по изучению экстенсивности саркоцистозной инвазии овец в зависимости от возраста, пола, сезона года, природно-экономической зоны размещения, а также собак и кошек, как окончательных хозяев *S. ovis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*). Доказана возможность культивирования чистых стадий развития *S. ovis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*) на искусственных полусинтетических питательных средах и разработан "Способ получения саркоцистозного антигена" (авт. свид. 1543610) из их биомассы. Разработан метод прижизненной диагностики саркоцистозной инвазии у овец, собак и кошек с помощью серологической реакции агглютинации (РА).

П р а к т и ч е с к а я з н а ч и м о с т ь д и с с е р т а ц и и определяется изучением ряда аспектов краевой эпизоотологии саркоцистозной инвазии овец в условиях Республики Молдова, представляющих практический интерес при организации профилактических мероприятий по борьбе с этим заболеванием. Предложенный нами

саркоцистозный антиген может широко использоваться для прижизненной диагностики саркоцистозной инвазии у овец, собак и кошек с помощью серологической реакции агглютинации (РА), а также дифференциальной диагностики токсоплазмоза, кокцидиоза и других протозойных заболеваний. Доказана возможность культивирования цистных стадий *S. oviscapis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*) на искусственных полусинтетических питательных средах с целью накопления биомассы для изготовления биопрепаратов (антигенов, вакцин). Результаты исследований использованы в сценарии научно-популярного кинофильма "Саркоцистоз", созданного на базе овцеводческих ферм Республики Молдова и лаборатории иммуногенных препаратов Института генетики Академии наук Республики Молдова.

П о л о ж е н и я , в н о с и м ы е н а з а щ и т у:

1. Некоторые аспекты краевой эпизоотологии саркоцистозной инвазии овец на территории Республики Молдова.
2. Культивирование цистных стадий развития возбудителей саркоцистозной инвазии у овец (*S. oviscapis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*)) и изготовление из полученной биомассы саркоцистозного антигена.
3. Метод прижизненной диагностики саркоцистозной инвазии у овец, собак и кошек.

А ч р о б а ц и я р а б о т ы. Результаты исследований ежегодно докладывались и обсуждались на Ученом совете, Института генетики Академии наук Республики Молдова (1988-1992 гг.), а также на макузювской конференции Одесского сельхозинститута (1989 г.) и на VI съезде Общества генетиков и селекционеров Республики Молдова (1992 г.).

П у б л и к а ц и и. По материалам исследований опубликовано 5 научных работ.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 119 страницах текста, иллюстрирована 15 таблицами и 14 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, трех глав и пяти разделов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений и приложений. Библиографический указатель содержит 180 работ, из которых 101 отечественных и 79 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнялась в лаборатории экологии простейших (с 1991 года млекопитающих препаратов) Института генетики Академии наук Республики Молдова в комплексе с Молдавским научно-исследовательским институтом животноводства и ветеринарии и Институтом зоолог. и физиологии Академии наук Республики Молдова с 1987 по 1991 гг.

Материалом для изучения распространения саркоцистозной инвазии овец на территории республики одичали пробы тканей и органов, отобранных от туш различных половозрастных групп и пород убитых в разные периоды года овец.

Материал отбирался на мясоперерабатывающих предприятиях республики (Кишиневский, Балыцкий, Чадыр-Лунгокий и Унгенский мясокомбинаты, Чимшилийский, Леовский, Ново-Аненский и другие убойные пункты, а также на районных мясомолочных и пищевых контрольных станциях республики). При отборе проб использовался наиболее полный материал от каждой туши, которым служил прежде всего мышечный слой пищевода, мышцы ножек диафрагмы, сердечная мышца, язык, брюшные и ягодичные мышцы.

Исследования проводили с обязательным органолептическим осмотром пищеводов на наличие макросаркоцист. Все другие мышцы подвергали исследованию методом обычной трихинеллоскопии (саркоцисто-скопия) под световым микроскопом при увеличении $\times 100$. Всего исследовано 2463 головы. При подготовке срезов глазными ножницами от каждой пробы (24 среза) делали их толщиной 2-3 мм, так как в более толстых срезах плохо просматриваются саркоцисты в мышечных волокнах - важное отличие от обычной трихинеллоскопии. Срезы сразу наносили на нижнюю пластинку компрессорiums, расщипывали их между пластинками, затем снимали верхнюю пластинку и окрашивали метиленовой синькой в разведении 1:1000 в течение 3-5 минут. Раствор метиленовой синьки использовали только свежеприготовленным, который наносили пастеровской пилеткой по 2-3 капли на каждый срез. Саркоцисты в этих условиях окрашивались в темно-синий цвет, а мышечные волокна - в светло-голубой. Интенсивность саркоцистозной инвазии определяли подсчетом количества саркоцист в 24 срезах мышечных волокон. Для микроскопического обнаружения трофозоитов (макрозоиты, зоиты, брадизоиты) саркоцист пользовались методикой Козелкина П.М. (1928), предусматривающей проведение соскоба скальпелем или бритвой из глубокого разреза кусочков мышц размером 3х3 см, нанесение его тонким слоем на чистое предметное стекло, высушивание на воздухе, фиксацию несколькими каплями этилового спирта и выдерживанием до полного высушивания. Окраску таких мазков проводили по Романовскому-Гимза.

Для прижизненной диагностики саркоцистозной инвазии у окончательных хозяев - прифермских и принадлежащих индивидуальным владельцам собак и кошек использовали пробы кала, ооцистоскопию которого осуществляли по общепринятой методике флотации по Филлеборну, а также постановку серологической реакции агглютинации (РА)

с использованием сыворотки крови и саркоцистозного антигена. Всего было обследовано 72 собаки и 28 кошек.

Материалом для культивирования содержимого саркоцист служили макро- и микросаркоцисты, из которых извлекались метроститы, промежуточные клетки и мерозоиты, а также шизонты, мерозоиты и метроститы, полученные из различных органов и тканей овец. Посевы на искусственные полусинтетические питательные среды производили по общепринятым методикам бактериологических исследований (Розанов Н.И. Микробиологическая диагностика заболеваний сельскохозяйственных животных. Москва, 1952. С. 77). Работа проводилась в стерильных боксах.

Для культивирования чистых стадий развития *S. ovisalis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*) использовали различные известные и новые искусственные полусинтетические питательные среды. Инкубирование осуществлялось в термостате при температуре 37°C, а также при комнатной температуре. Время инкубирования посевов определяли по интенсивности их титрования биомассы и стойкому проявлению культурально-морфологических свойств метроститов. Читку выросших культур, нативных мазков и других материалов проводили органолептически и микроскопически под иммерсией. Окраску культур проводили по методу Романовского-Гимария и метиленовой синькой в разведении 1:1000. Учет интенсивности роста колоний при культивировании чистых стадий *S. ovisalis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*) на твердых и в жидких полусинтетических питательных средах проводили после пересева через 1-4-5-24 и 72 часа.

Для более полной и точной характеристики энцефалитической ситуации параллельно с саркоцистоскопией широко использовался метод бактериологических исследований по общепринятой методике на наличие инвазионного начала саркоцистозной инвазии, который позволял

при отрицательных результатах саркоцистоскопии определять наличие в органах и тканях животных начальных стадий развития паразита - мерозоитов. Указанный метод на 10-15 процентов повышал показатели экстенсивности саркоцистозной инвазии в сравнении с обычной саркоцистоскопией.

Материалом для постановки серологических реакций с целью приближенной диагностики саркоцистозной инвазии, служила сыворотка крови овец, собак и кошек, а также саркоцистозный антиген, изготовленный по предложенному нами способу (авт. свид. 1543610). Реакция агглютинации (РА) ставилась по методике, изложенной Н.И. Розановым (1952). Математическую обработку полученных цифровых данных проводили по общепринятой методике на БМ ЭС-1045.

ЭКСТЕНСИВНОСТЬ САРКОЦИСТОЗНОЙ ИНВАЗИИ ОВЕЦ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА

Для получения более объективных и достоверных представлений об экстенсивности саркоцистозной инвазии среди овец проводили обследование животных из различных категорий хозяйств и природно-экономических зон республики. Для этой цели использовались практически все мясоперерабатывающие предприятия республики, многие убойные пункты районов и хозяйств, а также мясомолочные и пищевые контрольные станции рынков ряде районов.

Всего было исследовано 2463 туши и их внутренние органы. Результаты исследований по изучению экстенсивности саркоцистозной инвазии овец свидетельствуют о том, что инвазированность ягнят составляет всего $59,2 \pm 5,1$, в т.ч. пораженность макросаркоцистами $28,3 \pm 6,2\%$, в то время как взрослые овцы заражены этими паразитами до $99,2 \pm 0,3\%$ (в т.ч. макросаркоцистами - $43,8 \pm 2,0\%$), а бараны-производители старше 3 лет - 100% ($P < 0,05$). Пораженность овец макро- и

микросаркоцистами подтверждает инвазированность овец в условиях Молдовы двумя видами рода *Sarcosyatis* - *S. ovicanis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*), окончательными хозяевами которых, как известно, являются, соответственно, собаки и кошки.

В целях выяснения источников такой высокой экстенсивности саркоцистозной инвазии среди овец, проведены копрологические и серологические обследования 16 прифермских кошек и 40 стожковых и пастушьих собак, а также 3х собак и 12 кошек индивидуальных владельцев на пораженность их половой стадией саркоцистозной инвазии. Полученные результаты обследований показали, что взрослые прифермские кошки, сторожевые и пастушьи собаки практически поголовно поражены половой стадией саркоцистозной инвазии и выделяют в окружающую среду инвазионное начало - спорулированные социсты. Согласно анамнестическим данным установлено, что все эти собаки и кошки систематически при вынужденных убоях овец получают в пищу продукты убойных отходов и безусловно пораженную саркоцистами мышечную ткань, являющуюся в таких случаях инвазионным началом для окончательных хозяев. Что касается щенят до 1-месячного возраста, то они не получали еще в пищу мяса и не были поражены саркоцистозом. Собаки и кошки, принадлежащие индивидуальным владельцам, менее (в нашем случае соответственно $15,6 \pm 12,8\%$ и $16,6 \pm 21,4\%$ от обследованных) поражены саркоцистозом, так как они не имели такого свободного доступа к пораженной саркоцистами баранине, как прифермские собаки и кошки.

Исследование сыворотки крови собак и кошек, принадлежащих индивидуальным владельцам, реакцией агглютинации с использованием саркоцистозного антигена нашего производства обеспечило более высокое выявление пораженных саркоцистозом собак ($21,4 \pm 21,9\%$), чем при копрологических исследованиях ($15,6 \pm 12,8\%$), а также кошек

соответственно $25,0 \pm 25,0\%$ и $16,6 \pm 21,4\%$. Такая ситуация, по нашему мнению, является следствием наличия в организме лобак и кошек инвазионного начала в препатентный период, выявляемого РА с использованием саркоцистозного антигена, тогда как копрологические исследования выявляют спорулированные ооцисты только в патентный период.

Полученные нами данные при изучении экстенсивности саркоцистозной инвазии овец в зависимости от пола свидетельствуют о наличии определенной тенденции в условиях Молдовы к более высокой экстенсивности саркоцистозной инвазии среди взрослых овцематок в сравнении с баранами-кастратами в пределах соответственно $99,9 \pm 0,1\%$ и $97,9 \pm 1,0\%$. Такое положение, по нашему мнению, возникает в результате более интенсивной в условиях республики эксплуатации овцематок смужковой направленности (получение 2-3 и даже 4 голов приплода, доение), которая безусловно в напряженные физиологические периоды (беременность) и стрессовые возбуждения (двухкратное доение) ослабляет общую резистентность организма и снижает его сопротивляемость к инвазионному началу саркоцистозной инвазии.

Определенная закономерность выявлена нами также при анализе экстенсивности саркоцистозной инвазии овец в зависимости от природно-экономической зоны их размещения в Республике Молдова.

Наиболее высокая экстенсивность саркоцистозной инвазии ($94,4 \pm 1,3\%$) регистрировалась среди овец в Южной зоне республики, а наиболее низкая ($91,9 \pm 2,8\%$) в Северной зоне. В Кодровой и Приднестровской зонах экстенсивность саркоцистозной инвазии овец была одинаковой в пределах $92,7 \pm 1,7\%$.

Наличие, хотя и весьма незначительной разницы в экстенсивности саркоцистозной инвазии среди овец в зависимости от размещения их в различных природно-экономических зонах Республики Молдова,

по нашему мнению, можно объяснить различными экологическими условиями, существующими в указанных зонах республики, в которых протекает процесс инвазирования и развития саркоцистозной инвазии.

При проведении исследований по изучению экстенсивности саркоцистозной инвазии среди овец в течение ряда лет была получена возможность провести анализ сезонной динамики поражения овец этой инвазией. Однако установить какую-либо достоверную закономерность поражения овец саркоцистозом по периодам года не удалось.

Нами установлено, что в январе и декабре экстенсивность инвазии была более высокая ($96,0 \pm 5,5\%$); в феврале, марте и апреле экстенсивность удерживалась примерно на одинаковом уровне ($92,5 \pm 5,4 - 92,8 \pm 9,7$). Некоторое снижение экстенсивности инвазии ($90,0 - 90,2 \pm 3,2\%$) отмечено в сентябре и октябре.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о широком распространении на территории Республики Молдова саркоцистозной инвазии среди овец, а также собак и кошек, выступающих в роли окончательных хозяев в цикле развития *S. ovisanis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*). Экстенсивность саркоцистозной инвазии овец в условиях Республики Молдова повышается с возрастом животных и достигает в отдельных районах 100 процентов и незначительно варьирует в зависимости от пола и природно-климатических зон размещения овец. Экстенсивность саркоцистозной инвазии у окончательных хозяев — пастушьих собак и кошек, а также собак и кошек, принадлежащих индивидуальным владельцам, варьирует в зависимости от частоты скармливания им непроваренных продуктов убоя овец, пораженных саркоцистами. Обнаружение у 978 из 2463 обследованных туш баранины наряду с микро-саркоцистами макросаркоцист в мышечном слое пищевода свидетельствует о поражении овец двумя видами рода *Sarcocystis* — *S. ovisanis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СОДЕРЖИМОГО МАКРО- и МИКРОСАРКОЦИСТ ОВЕЦ НА ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Учитывая, что имеющиеся сведения по культивированию различных видов рода *Sarcocystis* в культуре клеток ряда органов и тканей животных с целью дальнейшего использования полученных культур или нативного материала содержимого макросаркоцист для получения антигена или проведения исследований по изучению иммуногенности у различных видов сельскохозяйственных при их применении, по нашему мнению, являются работами весьма трудоемкими и не обеспечивающими накопления большого количества биомассы для изготовления биопрепаратов, мы изучили возможность культивирования упомянутых простейших в вегетативной стадии развития на искусственных питательных средах с целью накопления биомассы и использования ее для изготовления биопрепаратов.

В начале этих исследований мы использовали такие известные искусственные питательные среды как мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), питательную среду I99 и их смеси (среда I99+МПА). Колонии культур оценивались органолептически и микроскопически по интенсивности роста и проявлению культурально-морфологических особенностей.

Полученные результаты показали, что рост колоний вегетативных стадий развития простейших рода *Sarcocystis*, полученных из содержимого макро- и микросаркоцист овец (*S. oviscanis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*)) на известных искусственных питательных средах (МПБ, МПА, среда I99) и их смесях (I99+МПА) не характеризовался хорошо видимым и интенсивным ростом колоний. Заметный рост колоний как микроскопически, так и органолептически отмечался только через 72 часа на питательной среде I99 и через 24 и 72 часа на смешанных питательных средах I99 (10%) и МПА (90%). При этом культурально-

морфологические признаки колоний не отличались ярко выраженной зернистостью, свойственной при интенсивном росте микробов. В целом, полученные результаты свидетельствуют о малой эффективности указанных питательных сред для культивирования вегетативных стадий развития простейших рода *Sarcocystis*, полученных из содержимого макро- и микросаркоцист овец.

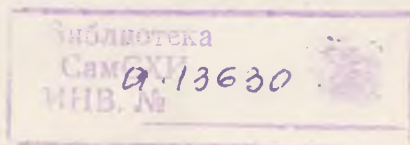
В продолжение исследований по изучению возможности культивирования содержимого макро- и микросаркоцист овец мы провели работу по культивированию указанных простейших на новых искусственных полусинтетических питательных средах. В качестве первоначальной основы была взята питательная среда 199, к которой был добавлен 1 процент 40% раствора глюкозы. В дальнейшем основой явился агар, приготовленный на мясной воде сердечной мышцы крупного рогатого скота, к которому добавляли: питательную среду 199, 40% раствор глюкозы, пенициллин, стрептомицин. При окончательной доработке состава новой питательной среды, что было связано с интенсивностью роста культур и проявлением специфических культурально-морфологических свойств клеток и их колоний, к среде был добавлен 0,02% раствор версена. Таким образом, была создана новая питательная среда со следующим соотношением компонентов (%): агар, приготовленный на мясной воде сердечной мышцы крупного рогатого скота - 75-85; среда 199 - 7-10; 40% раствор глюкозы - 5-10; 0,02% раствор версена - 3-6; пенициллин - 500 Ед/мл; стрептомицин - 500 мкг/мл.

Для посева использовали 0,2-0,5 мл мясной жидкости, полученной после механического (в электрическом гомогенизаторе) измельчения и обработки раствором Хенкса или физиологическим раствором хлористого натрия ткани мышц пораженных саркоцистами овец. Учет выросших колоний эндоцистов проводили после 3-4-кратного клонирования с целью очистки культуры от исторической микрофлоры.

Полученные результаты по культивированию содержащего макро- и микросаркоцист овец, представляющего массу метрощитов, промежуточных клеток и мерозоитов, на указанной среде показали, что интенсивный рост колоний метрощитов хорошо просматривался как при микроскопическом, так и при органолептическом просмотре, через 24 часа на твердой полусинтетической питательной среде № 3, которая в дальнейшем использовалась для накопления необходимого количества биомассы метрощитов для изготовления саркоцистозного антигена.

При интенсивном росте колонии просматривались в виде круглых точек, кремовато-белого цвета маслянистой консистенции. При просмотре таких колоний под микроскопом отмечалась хорошо выраженная их зернистость. В нативных мазках из этих колоний при просмотре под микроскопом клетки представляли собой, как правило, набор различной величины и конфигурации, круглой или овальной формы. Заметной была подвижность зернистости в ядрах и внутри цитоплазмы. Все клеточные структуры имели хорошо выраженную оболочку в виде кольца, которая просматривалась в темном поле микроскопа, при этом также четко просматривались ядра, ядерные гранулы и другие зернистые образования, вакуоли как внутри клеток, так и в межклеточных пространствах. Культура метрощитов : твердой питательной среде хорошо смыывается и после суточного отстаивания оседает на дно емкости, надосадочная жидкость становится прозрачной, что нами учитывалось как положительный факт при проведении работ по приготовлению антигена и повышению в нем концентрации клеток.

При разработке способа получения саркоцистозного антигена использовалась питательная среда следующего состава: мясная вода, полученная в соотношении 1 кг фарша из сердечной мышцы и 2 литров воды, прокипяченная, профильтрованная и простерилизованная; агар - 2%; среда 199 - 5 мл; 0,02% раствор вербена - 2,5 мл; 40% раствор



глюкозы - 5 мл; антибиотики (пенициллин 500 Ед/мл, стрептомицин 500 мкг/мл), рН 7,2 (слабо щелочная). Указанная среда (авт. овид. I091546) использовалась для культивирования и клонирования эндогенной стадии развития простейших рода *Sarcocystis*, полученных из содержимого макро- и микросаркоцист овец. Полученные колонии паразита смывали 1%-ным раствором формалина и индерживали при температуре 4°C 12-15 часов. Затем культуру очищали 5-6-кратным промыванием стерильным физраствором хлористого натрия и центрифугировали при 1,5 тыс. об/мин, в течение 5 минут. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок в качестве антигена с различной концентрацией клеток (30-40 тыс. в 1 мл) использовали для прижизненной диагностики саркоцистозной инвазии. Предложенный "Способ получения саркоцистозного антигена" стал предметом изобретения (авт. свид. I543610 от 15 октября 1989 г.). Активность полученного антигена проверяли путем постановки реакции агглютинации (РА) с сывороткой крови овец, собак и кошек, пораженных саркоцистозом в естественных условиях, в различных ее разведениях.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ САРКОЦИСТОЗНОЙ ИНВАЗИИ У ОВЕЦ

В связи с отсутствием узаконенных методов прижизненной диагностики, на основании которых можно было бы с уверенностью судить о поражении саркоцистозной инвазией овец в условиях производства, возникают существенные трудности при организации и проведении общих и специальных ветеринарно-санитарных мероприятий по профилактике и ликвидации этого заболевания.

В этой связи была поставлена задача определить диагностическую ценность реакции агглютинации (РА) при саркоцистозе овец с использованием саркоцистозного антигена, полученного по способу,

предложенному лабораторией иммуногенных препаратов Института генетики Академии наук Республики Молдова (авт. свид. 1543610).

Для постановки реакции использовали свежую сыворотку крови овец разного возраста, принадлежащих колхозам и совхозам ряда районов Республики Молдова. Постановку реакции агглютинации и учет результатов проводили по общепринятой методике. Пробки сыворотки крови овец, давшие положительную РА, дополнительно исследовали в различных разведениях с целью выявления специфичности и активности используемого для реакции агглютинации саркоцистозного антигена.

Для опытов использовали макрометод агглютинации на плаксти-глассовых пластинках с лунками. В каждую лунку с разведенными сыворотками добавляли 0,25 мл антигена, предварительно разведенного физиологическим раствором хлористого натрия в соотношения 1:250 и 1:350 (количество клеток в 1 мл составляло соответственно 26 и 18 тысяч). Пластинку с лунками встряхивали и помещали в термостат при температуре 37,5°C на три часа. Параллельно ставили контрольные опыты с испытуемыми сыворотками на возможную самоагглютинацию. После 3 час. выдержки в термостате пластинку с содержимым лунок оставляли на 30 мин. при комнатной температуре, после чего учитывали результаты реакции визуально и оценивали их по четырехбалльной системе в крестах. В целях подтверждения специфичности полученного и используемого нами антигена параллельно с серологической реакцией агглютинации были проведены, по возможности, патологоанатомические, микроскопические и аллергические исследования, показатели которых на 98-100 процентов дали совпадающие результаты и подтвердили полную пригодность саркоцистозного антигена для прижизненной диагностики саркоцистоза у овец при помощи простой в исполнении реакции агглютинации (РА).

Полученные нами результаты по прижизненной диагностике сар-

саркоцистозной инвазии у овец при помощи РА с использованием сыворотки крови и саркоцистозного антигена, подтвердили высокую (99,4%) экстенсивность саркоцистозной инвазии у взрослых овец и 60,9% у ягнят, которую мы затем определили методом саркоцистоскопии мышечной ткани овец и ягнят, убитых на мясоперерабатывающих предприятиях Республики Молдова.

Активность и специфичность саркоцистозного антигена были нами исследованы с использованием сыворотки крови овец в различных разведениях как давших положительную, так и давших отрицательную РА, а также токсоплазмозного антигена и физиологического раствора хлористого натрия. При этом можно было проследить специфичность саркоцистозного антигена, дающего положительную РА только с сывороткой крови больных саркоцистозом овец, а также его высокую активность, которая подтверждается наличием положительной РА с сывороткой крови пораженных саркоцистозом овец в разведении 1:1024.

Что касается контроля, то сыворотка крови, давшая отрицательную РА на саркоцистоз, к которой были добавлены токсоплазмозный антиген или физиологический раствор хлористого натрия, а также саркоцистозный антиген с физиологическим раствором хлористого натрия не дали положительной РА.

На основании полученных данных мы пришли к выводу, что лучшая РА с использованием саркоцистозного антигена из культуры вегетативных стадий *S. ovis* и *S. ovis felis* может широко применяться для прижизненной диагностики саркоцистоза у овец.

Аналогичные исследования с постановкой РА с использованием сыворотки крови и саркоцистозного антигена мы провели на собаках и кошках — окончательных хозяевах в биологическом цикле развития возбудителей саркоцистозной инвазии у овец — *S. ovis* и *S. ovis felis*.

Полученные нами результаты по изучению экстенсивности саркоцистозной инвазии у собак и кошек с помощью РА свидетельствуют о высокой (100%) экстенсивности саркоцистозной инвазии у исследованных взрослых животных, что было также подтверждено копрологическими исследованиями по обнаружению ооцист и аллергическими с постановкой кожной пробы (поджесточная сыпь) о саркоцистозном антигеном.

Нами также были проведены исследования по изучению специфичности и активности саркоцистозного антигена о использовании данной положительную РА сыворотки крови собак и кошек. По полученным данным, так же как и по РА с сывороткой крови овец, можно проследить специфичность саркоцистозного антигена, дающей положительную РА только о сывороткой крови пораженных саркоцистозом собак и кошек и его активность в разведении 1:1024.

Приведенные сведения дают основание утверждать о том, что использованный нами для постановки РА о сывороткой крови собак и кошек антиген, является специфическим и активным биопрепаратом и его можно широко использовать для прижизненной диагностики саркоцистозной инвазии у собак и кошек о помощью РА наряду о копрологическими исследованиями по обнаружению спорулированных ооцист и постановкой аллергической реакции (кожная проба о саркоцистозным антигеном).

ВЫВОДЫ

1. Саркоцистозная инвазия овец - широко распространенное заболевание и регистрируется во всех регионах Республики Молдова.
2. Экстенсивность саркоцистозной инвазии среди овец в условиях Республики Молдова повышается с возрастом животных и достигает в ряде районов 100 процентов.

3. У облюдованных овец (2463 головы) наряду с микросаркоцистами у многих (39,71%) обнаруживались в мышечном слое пищевода микросаркоцисты, что свидетельствует об инвазировании овец в условиях Молдовы двумя видами рода *Sarcocystis* - *S. oviscanis* и *S. ovifelis* (*S. tenella*).

4. В условиях Республики Молдова строгая закономерность сезонной динамики и зависимость саркоцистозной инвазии от природно-экономических зон размещения овец не установлена.

5. Экстенсивность саркоцистозной инвазии окончательных хозяев - прифермских собак и кошек составляет соответственно 100% и 93,7±12,1% и находится в прямо пропорциональной зависимости от экстенсивности саркоцистозной инвазии овец.

6. На твердой искусственной полусинтетической питательной среде (авт. свид. 1091546) возможно культивирование цистных стадий *S. oviscanis* и *S. ovifelis* с целью накопления биомассы для получения спопрепаратов.

7. Разработан способ получения саркоцистозного антигена (авт. свид. 1543610) с использованием твердой искусственной полусинтетической питательной среды.

8. Саркоцистозный антиген, полученный из культур цистных стадий *S. oviscanis* и *S. ovifelis*, обладает высокой активностью и специфичностью при постановке РА с сывороткой крови овец, собак и кошек с целью приближенной диагностики саркоцистозной инвазии.

9. Дуночная реакция агглютинации (РА) с использованием саркоцистозного антигена из культур вегетативной стадии развития *S. oviscanis* и *S. ovifelis* может быть рекомендована для широкого применения при приближенной диагностике саркоцистозной инвазии у овец, собак и кошек.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты исследований по распространению и диагностике саркоцистоза овец, собак и кошек используются при профилактике этого заболевания на территории Республики Молдова (Справка Республиканского ветеринарно-диагностического центра Республики Молдова № 421 от 25.09.92 г.).

2. Для получения биомассы саркоцист можно использовать разработанную твердую искусственную полусинтетическую питательную среду (авт. свид. 1091546).

3. Прижизненную диагностику саркоцистозной инвазии у овец, собак и кошек проводить с помощью реакции агглютинации (РА) с использованием предложенного нами саркоцистозного антигена (авт. свид. 1543610).

4. Для успешной профилактики саркоцистоза наряду с другими мероприятиями широко использовать для этих целей научно-популярный кинофильм "Саркоцистоз", созданный Ленинградской киностудией в 1989 году на базе Республики Молдова и лаборатории экологии простейших Института генетики Академии наук Республики Молдова.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. ДИК Э.Н., ЧЕБАН Л.Н., ДАНЫШИНА М.С. Серологическая диагностика саркоцистоза // Известия АН МССР. Серия биологических и химических наук, 1987, - № 5, - С. 37-42.

2. ДИК Э.Н. (АБРАМЯН Э.Н.), ТИМЧУК В.Ф., ДАНЫШИНА М.С. Влияние саркоцистина на биохимические показатели мышечной ткани кроликов // Известия АН РМ. Серия биологических и химических наук, 1988, - № 4, - С. 29-32.

3. ДИК Э.Н., ДАНЫШИНА М.С., ДАНЫШИЛ Н.С. Способ получения саркоцистозного антигена // Авторское свидетельство 1543610 от

15 октября 1989 г.

4. ДИК Э.Н., ДАНЬШИНА М.С., ДАНЬШИН Н.С. Что следует знать о мясе // Брошюра. Кишинев: Штиинца, 1989. - 6,3 п.л.

5. ДИК Э.Н., ДАНЬШИН Н.С., ДАНЬШИНА М.С. Генетика и селекция простейших рода *Sarcocystis* // Тезисы VI-го съезда Общества генетиков и селекционеров Република Молдова, Кишинев, 1992.- С.14-16.

Подписано к печати 30.10.62г. Печать офсетная
Формат 84x84 1/16 Усл.п.л. 1,0
Заказ 166 Тираж 100 Бесплатно

БелНИИЭП АПК Минск, Казинца, 88