

**МЕТОД ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ МЯСА
ПРОМЫСЛОВЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПАРАЗИТАРНЫХ ЗООНОЗАХ**

А.В. УСПЕНСКИЙ,
доктор ветеринарных наук
Ф.К. СКВОРЦОВА
кандидат ветеринарных наук

*Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии
им. К.И. Скрябина, 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28,
e-mail: director@vniigis.ru, fainaskvorcova1011@gmail.com*

(Рассмотрен и одобрен на заседании секции «Инвазионные болезни животных» 27 мая 2014 года, протокол № 1)

Ветеринарно-санитарная экспертиза продуктов промысловой и любительской охоты направлена на выявление источников и предотвращение заражения человека гельминтозоозами. Она должна проводиться комплексным методом с использованием компрессорной трихинеллоскопии и метода пептолиза в искусственном желудочном соке. Приведено описание и дифференциация опасных для человека личинок, выделенных из мяса промысловых животных. Применение на практике методов ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов охотничьих трофеев позволит предотвратить заболеваемость человека и домашних животных опасными зоонозами.

Ключевые слова: зооноз, трихинеллез, аляриоз, ветеринарно-санитарная экспертиза.

За последние годы наблюдается усиление эпидемической напряженности по зоонозам в РФ, включая и сопредельные регионы. Анализ эпизоотической и эпидемиологической ситуации свидетельствует о повышении роли диких промысловых животных в распространении таких зоонозов как трихинеллез и аляриоз. Доминирующую роль в заражении людей в качестве источника инвазии играют дикие животные.

Трихинеллез во многих регионах оценивается уже исключительно как природно-очаговая инвазия, что связано в основном с употреблением населением мяса диких животных, добытых на охоте (бурых и белых медведей, кабанов), и экзотических блюд из мяса барсуков, собак, нутрий и др.

Цель работы - дифференциальная диагностика личинок гельминтозоозов промысловых (кабанов и диких плотоядных) животных методами компрессорной трихинеллоскопии и пептолиза.

Методы компрессорной микроскопии и пептолиза мышечной ткани животных в искусственном желудочном соке (ИЖС) можно применять в ветеринарно-санитарных лабораториях на рынках, мясокомбинатах для диагностики трихинеллеза и аляриоза.

Материалы и методы

В соответствии с «Методическими указаниями по диагностике трихинеллеза животных» (Департамент ветеринарии Минсельхоза РФ № 13-7-2/1428 от 28.10.1998) обязательному исследованию на трихинеллез подлежит: мясо свиней, кабанов, медведей, барсуков, нутрий, собак, других всеядных и

плотоядных животных и продукты их убоя, имеющие поперечно-полосатую мускулатуру (субпродукты).

У хищников из природных биоценозов следует учитывать специализированный характер распределения личинок трихинелл и алярий в различных группах поперечно-полосатых мышц.

У кабанов и медведей пробы берут из ножек диафрагмы, ближе к основанию, из межреберных, шейных, жевательных, икроножных мышц, мышц языка; у плотоядных – из сгибателей и разгибателей передних и задних конечностей, межреберных и жевательных мышц; у псовых и кунных (лисиц и куниц) - дополнительно из мышцы спины. В отдельных случаях исследуют шпиг с мышечными прослойками и/или мышечную прирезь со свежих шкур.

Предпочтительнее пробы отбирать от туш только что убитых туш. Однако, для исследований пригодны замороженные, подгнившие или долго пролежавшие куски мяса, копченые, соленые или сушеные продукты из него, прирезь со шкур. В этом случае увеличивают массу проб для исследования.

Трихинеллез и аляриоз у хищных животных распространены повсеместно, однако интенсивность инвазии гельминтами обычно не превышает 0,5-1 лич./г. По инструкции обязательные для исследования 24 среза мышечной ткани составляют около 2 г, этого явно недостаточно для обнаружения гельминтов. Мясо диких промысловых животных необходимо в обязательном порядке исследовать нижеприведенным образом.

Мясо кабанов и медведей. 96 срезов мышечной ткани (по 48 срезов из ножек диафрагмы или массетеров или других мышц) методом компрессорной трихинеллоскопии или по 4,0 г из тех же мышц методом пептолиза в ИЖС.

Мясо барсука и хищных млекопитающих. С учетом результатов исследований, связанных с оценкой закономерностей распределения личинок трихинелл в различных группах мышц: 96 срезов мышечной ткани (по 48 из мышц плечевого пояса и задних конечностей или других мышц) методом компрессорной трихинеллоскопии или по 4,0 г из тех же мышц методом пептолиза в ИЖС.

Метод компрессорной трихинеллоскопии. Принцип метода заключается в раздавливании срезов мышц между стеклами компрессориума и просматривания их под микроскопом или трихинеллоскопом. Целесообразно брать пробы мышц из мест наибольшего скопления личинок трихинелл. Если такой возможности нет, то изучению подвергают имеющиеся мышцы.

Трихинеллоскопия свежих мышц дает наилучшие результаты, так как в них четко видны цисты алярий и капсулы трихинелл или свободные личинки трихинелл и других нематод.

В мышцах, пролежавших некоторое время, происходит аутолиз, при этом паразиты становятся плохо заметными, а молодые тонкостенные капсулы или цисты могут совсем оптически исчезнуть. Такие срезы можно подкрасить несколькими каплями 1%-ного спиртового раствора метиленового синего.

В мышцах после замораживания личинки трихинелл с еще не сформированными капсулами или с тонкими капсулами видны очень плохо и могут также оптически исчезнуть. В таком случае срезы подкрашивают 1%-ным спиртовым раствором метиленового синего. Сформированные капсулы хорошо видны в оттаявших мышцах на срезе. Цисты алярий видны в виде плотного образования с более темным пятном внутри.

В копченом и соленом мясе личинки трихинелл видны еще хуже; тонкие срезы из такого мяса просветляют 1-2 каплями 50%-ного раствора глицерина в течение 4-5 ч.

Цисты алярий просветляют длительное время – в течение 14-16 ч.

Нарезанные для компрессориума срезы высушенных мышц или сухие остатки подкожных мышц со шкуры животного кладут на 10-20 мин в молочную кислоту, а затем исследуют обычным способом.

При невозможности исследовать на месте кусочки мышц следует сохранить в замороженном виде или законсервировать в насыщенном растворе поваренной соли для дальнейшего изучения обычным способом.

После консервации в спирте или формалине приготовленные срезы из мышц помещают на 4-5 ч в 50%-ный раствор глицерина для просветления, а затем исследуют обычным способом.

От каждой пробы по ходу мышечных волокон ножницами делают срезы мышц размером $1,5 \times 0,3$ см. Их помещают на стекло компрессориума и прижимают вторым стеклом. Срезы необходимо раздавливать между стеклами до полной прозрачности и только в таком состоянии исследовать. Их просматривают под микроскопом при малом увеличении. Дифференцируют личинок гельминтов по морфологическим признакам и учитывают число обнаруженных на срезах. Тщательно документируют данные о животном, группе исследованных мышц и интенсивности инвазии.

Дифференциальная диагностика. Капсулы с трихинеллами необходимо дифференцировать от наиболее часто встречаемых в образцах мышц от диких животных цист с личинками алярий (мезоцеркарий) и нематод. Дифференциация основывается на морфологии возбудителей.

Личинки трихинелл наиболее распространенных видов, *Trichinella spiralis* и *T. nativa* и др., образуют капсулы в мышечных волокнах поперечно-полосатых мышц. Личинки *T. pseudospiralis* не образуют капсул и свободно лежат между мышечными волокнами. Личинки алярий также находятся в цистах, которые располагаются в межмышечной ткани в отличие от трихинелл.

При компрессорной диагностике при наличии инвазии в исследуемых срезах мышц отчетливо видны слоистые капсулы с трихинеллами, расположенными внутри мышечного волокна. В стенке капсул хорошо различимы внутренний тонкий гиалиновый слой и внешний утолщенный соединительнотканый слой. Капсулы могут быть различной формы - лимонovidной, овальной, округлой; разного размера, но в любом случае в них хорошо заметна свернутая личинка (или несколько личинок) в виде объемной спирали.

Встречаются капсулы с погибшими или лизированными личинками трихинелл. Они обычно темного цвета и нечетких очертаний. В пробах от плотоядных часто встречаются обызвествленные толстостенные капсулы, частично лизированные, а также следы резорбции капсул в виде темных пятен.

В мышечных волокнах могут встречаться юные личинки капсульных видов трихинелл с 10 по 17-е сутки после заражения, которые только начинают формировать соединительнотканную капсулу. Они очень подвижны, но малозаметны на срезе.

Личинки бескапсульного вида трихинелл также плохо видны на срезах, так как располагаются между мышечных волокон. Они обычно свернуты в виде скрепки или полураскрытой скрепки. Однако, через некоторое время (5-10 мин) в тканевой жидкости около среза можно наблюдать активно двигающиеся личинки, сворачивающиеся в спираль.

Цисты алярий обычно овальной формы размером $0,54 \times 0,42$ мм. У молодых алярий гиалиновая оболочка тонкая, одинарная, несколько похожая на капсулу трихинелл. Внутри цисты находится мезоцеркарий трематоды. Толстая двуслойная гиалиновая оболочка образуется позднее.

Цисты обычно расположены между мышечными волокнами в тех же группах поперечнополосатых мышц, что и капсулы трихинелл, но чаще встречаются на границе с жировой тканью. Циста алярии более крупная, округлая и прозрачная, чем капсула трихинелл, меняющая свою форму при движении личинки в компрессориуме при исследовании свежего мяса. Внутри видна плоская личинка с двумя присосками (ротовой и брюшной) и У-образным кишечником. Наряду с цистами с тонкими стенками встречаются более плотные, непрозрачные с малоподвижной личинкой.

От бескапсульных личинок трихинелл следует дифференцировать личинок нематод аскаридного типа, которые также свободно лежат между миофибриллами. Личинки на срезе малоподвижны, расположены в виде полукруга. Линейный размер этих нематод почти в 2-3 раза превышает размер бескапсульных личинок трихинелл.

Компрессорную трихинеллоскопию в полевых условиях проводят с помощью устройств типа ТП (ТП-2, ТП-3).

Заражение гельминтами, как правило, устанавливают при интенсивной инвазии, когда в 1 г мышц находится несколько личинок, а при слабой степени заражённости эффективность компрессорной микроскопии значительно снижается.

Эти недостатки компрессорной микроскопии восполняют за счёт увеличения числа срезов и исследованием других групп мышц или методом пептолиза.

Метод пептолиза мышечных проб в ИЖС. Основан на растворении в искусственном желудочном соке мышечной ткани и обнаружении в осадке личинок гельминтов. Метод позволяет обнаруживать личинки при слабой инвазии, которые не всегда улавливаются при обычном компрессорном исследовании. Пептолиз мышечных проб в ИЖС можно проводить стандартным (пассивным) методом или автоматизированным (экспресс-диагностика) с помощью приборов для выделения личинок. Для этих целей применяют ИЖС на основе пепсина и соляной кислоты или ИЖС бетасол, включающий пепсин, бетаин и лимонную кислоту.

Приготовление искусственного желудочного сока. Состав: вода при температуре 41-42 °С – 1 л; кислота соляная концентрированная (уд. масса 1,2) - 10 мл; пепсин свиной в зависимости от активности - 3-10 г, при исследовании соленых, копченых мясопродуктов – 14-18 г. ИЖС данного состава годен для применения в течение 8 ч с момента приготовления.

ИЖС бетасол: вода при температуре 41-42 °С - 1 л; пепсин свиной в зависимости от активности 3-10 г; бетаин - 10 г; лимонная кислота - 12-14 г. Состав необходимо использовать в течение 48 ч.

Пепсин. Концентрацию пепсина в ИЖС определяют видом используемого препарата. Предлагаемые пепсины обладают высокой ферментной активностью в дозе 3 г/л ИЖС.

Фирма Акрос (Acros Organics, Бельгия, США) - пепсин для биохимии, лиофилизированный кристаллический порошок. Активность 0,7 Ph.Eur.U/mg.

Фирма Сигма (Sigma Aldrich, Германия, США) - пепсин для биохимии, лиофилизированный кристаллический порошок. Активность 600-1200 ед/мг.

Фирма Мерск (Германия, США) - пепсин для биохимии, лиофилизированный кристаллический порошок. Активность 0,7 Ph.Eur.U/mg.

ООО «Шако» (Россия) - пепсин свиной для сыроделия, лиофилизированный кристаллический порошок. Активность 100 ед/мг. Обладает невысокой ферментной активностью и небольшим сроком годности. Это обстоятельство вынуждает перед использованием данного пепсина тестировать его и в дальнейшем постоянно повышать дозу.

Мясо промысловых животных (кабана, медведя, енотовидной собаки, барсука и других) более плотное, жесткое, чем свинина, поэтому в отдельных случаях следует увеличивать дозу пепсина. Солонину, копчености, длительно мороженое мясо, мясные полуфабрикаты следует исследовать только методом пептолиза с увеличением дозы пепсина до 14 г/л.

Пассивный метод пептолиза. Переваривание образцов можно проводить в контейнере, который помещается в любую стеклянную емкость.

Пробу измельчают в мясорубке с диаметром решетки 3-4 мм. 20-25 г фарша помещают в контейнер из металлизированной сетки или в мешок из мельничного газа (с ячейками 0,3-0,5 мм) размером 8-10 см в диаметре. На 25 г фарша готовят не менее 500 мл ИЖС. Контейнер погружают в стеклянную емкость с ИЖС и закрепляют его на специальном держателе или любой

планке. При исследовании нескольких туш емкости соответственно маркируют. Емкость помещают в термостат при температуре 41-42 °С и выдерживают 10-18 ч. В процессе пептолиза личинки проходят через ячейки контейнера или мельничного газа и концентрируются на дне емкости. Из нее осторожно сливают надосадочную жидкость, оставляя 2-3 см над осадком. Осадок при необходимости промывают водопроводной водой и отстаивают. Чистый осадок переносят пипеткой на часовое или предметное стекло и микроскопируют на наличие личинок гельминтов под биноклем, микроскопом ($\times 30$) или трихинеллоскопом.

Метод доступен для использования в любой ветеринарной лаборатории.

Автоматизированный метод пептолиза. В настоящее время разработаны приборы для выделения личинок трихинелл типа АВТ, Гельми, Гастрос, которые используют в ветеринарных лабораториях мясокомбинатов и рынках. Время переваривания мышечной массы (пептолиза) в аппаратах сокращено до 35 мин.

При исследовании туши из регламентированных групп мышц берут по 4 г мышечной ткани и формируют групповую пробу массой 25-50 г. Реакторы заправляют ИЖС стандартного состава или ИЖС бетасол. Для пептолиза 50 г мясного фарша готовят 1 л ИЖС по прописи. Для качественной диагностики оптимальный объем проб, исследуемых в одном реакторе, не должен превышать 50 г на 1 л ИЖС. За один цикл работы прибора переваривается от 25 до 60 % мышечной массы в зависимости от дозы и качества пепсина и структуры исследуемого образца. При повышении дозы пепсина процесс пептолиза ускоряется. По окончании цикла пептолиза 3-4 мл осадка сливают; при необходимости его промывают водопроводной водой, отстаивают и микроскопируют. При микроскопировании осадка легко выявляются личинки гельминтов, паразитирующие в мышечных тканях животных: личинки трихинелл, мезоцеркарии алярий и личинки нематод.

Личинки трихинелл появляются в осадке в течение первых 15-20 мин пептолиза. При этом они активно двигаются, сгибаются и разгибаются. Личинки длительное время сохраняют подвижность при температуре 39-42 °С, а при комнатной температуре сворачиваются в спираль. Погибшие личинки раскручиваются и принимают серповидно изогнутую форму.

Кроме свободных личинок в осадке можно наблюдать неперевавшиеся капсулы как с живыми, так и с погибшими трихинеллами.

В осадке выделяют крупные активно двигающиеся мезоцеркарии алярий. При микроскопировании на плоском теле личинки отчетливо видны ротовая и брюшная присоски и У-образный кишечник. При комнатной температуре движение личинок замедляется и они становятся неподвижными. Личинки нематод в осадке слабоподвижны в течение небольшого времени. При этом в отличие от трихинелл они никогда не скручиваются в спираль. Следует дифференцировать трихинелл, у которых на переднем конце имеется хорошо выраженная стихосома, состоящая из стихоцитов, от личинок нематод аскаридного типа и личинок спирурид. При микроскопировании личинки аскариды кроме крупного размера характеризуются наличием простого мышечного пищевода, в то время как у спирурид пищевод отчетливо разделен на железистую и мышечную части.

Диагностика гельминтозоонозов методом автоматизированного пептолиза качественна, легкодоступна и не занимает много времени.

Меры безопасности. Ветеринарно-санитарная экспертиза продуктов промысловой и любительской охоты, направленная на выявление источников заражения, должна проводиться специально подготовленными ветеринарно-санитарными экспертами.

При обнаружении в исследуемом материале личинок трихинелл и алярий необходимо направлять материал в ветеринарную лабораторию, а тушу и органы изолировать. С пораженными мясными продуктами поступают в соответ-

ствии с «Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мясных продуктов».

Применение на практике методов ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов охотничьих трофеев позволит предотвратить заболеваемость человека и домашних животных опасными зоонозами.

Method of veterinary-sanitary expertise of meat of commercial animals at parasitic zoonosis

A.V. Uspensky

doctor of veterinary sciences

F.K. Skvortsova

PhD in veterinary sciences

*All-Russian Scientific Research Institute of Helminthology
named after K.I. Skryabin, 117218, Russia, B. Cheremushkinskaya st., 28,
e-mail: director@vniigis.ru, fainaskvortsova1011@gmail.com*

(Considered and approved in the meeting of Section «Invasive diseases in animals» on May 27th, 2014, Protocol № 1)

The analyze of epizootic and epidemiological situation indicates an increased role of wild animals in spreading of such zoonotic diseases as trichinellosis and alariosis. Wild animals as a source of infection play the leading role in human infection. The task of present work is differential diagnosis of larvae at helminthozoonosis in commercial wild animals (wild boars, wild carnivorous) using method of compressor trichinelloscopy and peptolysis. Methods of compressor trichinelloscopy and peptolysis of muscle tissue of animals by applying artificial gastric juice can be used at veterinary-sanitary laboratories in markets and meat-processing plants for diagnostics of trichinellosis and alariosis. Veterinary-sanitary expertise of meat from game and commercial hunting is aimed at detection of sources of infection and prevention of helminth zoonosis in human. This expertise should be conducted using a complex method: compressor trichinelloscopy and peptolysis using artificial gastric juice (peptolytic artificial gastric juice). This method contains the description and differentiation of larvae (dangerous to human) released from meat of commercial wild animals using this technique. Practical application of veterinary-sanitary expertise of meat and meat products from hunter's trophies allows to prevent infection of human and domestic animals with dangerous zoonosis.

Keywords: zoonosis, trichinellosis, alariosis, veterinary-sanitary expertise.