

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Кафедра паразитологии и инвазионных болезней

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по выполнению паразитологических методов
лабораторной диагностики гельминтозов, протозоозов
и арахноэнтомозов**

Витебск
ВГАВМ
2022

УДК 619:616.995.121
ББК 48.73
М54

Утверждены Департаментом ветеринарного и продовольственного надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь 27 июня 2022 года

Авторы:

доктор ветеринарных наук, профессор *А. И. Ятусевич*; кандидат ветеринарных наук, доцент *И. Н. Дубина*; кандидат биологических наук, доцент *В. А. Самсонович*; кандидаты ветеринарных наук, доценты *Е. Б. Криворучко*; *Е. О. Ковалевская*; *О. С. Горлова*; *И. С. Касперович*; *Е. Л. Братушкина*; *М. П. Синяков*; ассистенты *А. М. Сарока*; *О. Е. Юшковская*; *Л. И. Рубина*; *И. П. Захарченко*; *Ю. А. Бородин*; врачи ветеринарной медицины *Е. А. Косица*; *Е. Э. Ловишенко*; *М. В. Старовойтова*; *С. Н. Кузьменкова*; аспирант *В. А. Конопская*

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор *М. В. Скуловец*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *Н. И. Олехнович*

М54 Методические рекомендации по выполнению паразитологических методов лабораторной диагностики гельминтозов, протозоозов и арахноэнтомозов: методические рекомендации / А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2022. – 44 с.

Рекомендации предназначены для врачей ветеринарной медицины, слушателей ФПК, студентов и учащихся, преподавателей высших и средних учебных заведений ветеринарного профиля.

УДК 619:616.995.121
ББК 48.73

© Ятусевич А. И. [и др.], 2022
© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОТБОР ПРОБ, КОНСЕРВИРОВАНИЕ И УСЛОВИЯ ДОСТАВКИ МАТЕРИАЛА В ЛАБОРАТОРИЮ ДЛЯ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	5
1.1. Отбор проб и доставка фекалий в лабораторию	5
1.2. Консервирование фекалий	7
1.3. Отбор проб мочи	8
1.4. Отбор проб крови	8
1.5. Отбор соскобов с перианальных складок	8
1.6. Биопсия мышечной ткани (поперечнополосатой мускулатуры)	9
1.7. Отбор проб эпидермиса кожи	9
1.8. Отбор проб для контроля эффективности лечения кишечных гельминтозов и протозоозов	10
2. ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕЛЬМИНТОЗОВ	10
2.1. Исследование фекалий	10
2.1.1. Макроскопические методы	10
2.1.2. Микроскопические методы. Овоскопия	11
2.2. Исследование перианальных соскобов	24
2.3. Исследование мочи	25
2.4. Исследование крови	25
2.5. Ларвоскопическое исследование эпидермиса кожи	28
2.6. Исследование мышечной ткани для обнаружения личинок трихинелл	29
3. ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРОТОЗООЗОВ	31
3.1. Методы обнаружения простейших, паразитирующих в пищеварительном тракте	31
3.2. Лабораторные методы диагностики простейших, паразитирующих в крови	36
4. ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АРАХНОЭНТОМОЗОВ	38
4.1. Методы обнаружения чесоточных клещей	38
4.2. Сбор и исследование иксодовых клещей	40
4.3. Сбор и исследование паразитических насекомых	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	42

ВВЕДЕНИЕ

Паразитарные болезни имеют широкое распространение во всех регионах мира и наносят большой экономический ущерб. В настоящее время описано около 1,5-2 млн видов живых организмов, из которых примерно 6% ведут паразитический образ жизнедеятельности. Некоторые типы животных представлены только паразитическими видами (например, тип плоских червей). Особенно богат паразитическими видами тип членистоногих (около 50 тыс. видов). Большое значение имеют паразиты, общие для животных и человека, вызывающие болезни «Зооантропонозы». Их описано около 200. По данным отечественных ученых на территории Беларуси выявлено у крупного рогатого скота 36 видов гельминтов, у овец – 41 вид, у коз – 28 видов, у лошадей – 7, собак – 17 и т.д. До 20 видов гельминтов паразитируют у человека. По последним данным, гельминтофауна всех позвоночных животных и человека на территории Республики Беларусь представлена 755 видами (Ятусевич А.И. с соавт., 2020). Способствуют широкому распространению паразитов природно-климатические условия, сложившиеся в Беларуси, и разнообразный животный мир.

Большинство паразитарных болезней протекают без специфических клинических признаков. По этой причине при диагностике паразитозов решающее значение имеют лабораторные исследования. Получение достоверных данных во многом зависит от правильности отбора биологического материала и выбранного метода исследований.

**БУДЕМ ПОМНИТЬ,
КАК МНОГО ЖИЗНЕЙ БЫЛО СПАСЕНО,
КАК МНОГО УЖАСНЫХ СТРАДАНИЙ
БЫЛО ПРЕДОТВРАЩЕНО
БЛАГОДАРЯ ЗНАНИЯМ
О ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ЧЕРВЯХ**

Чарльз Дарвин, 1881 г.

1. ОТБОР ПРОБ, КОНСЕРВИРОВАНИЕ И УСЛОВИЯ ДОСТАВКИ МАТЕРИАЛА В ЛАБОРАТОРИЮ ДЛЯ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для лабораторных паразитологических исследований служит различный биологический материал от животных:

- на гельминтозы – фекалии, моча, истечения из трахеи, бронхов, половых отверстий, кровь, биопсийные ткани и др.
- на протозоозы – фекалии, кровь, смывы со слизистых оболочек, биопсийные ткани и др.
- на арахноэнтомозы – скарификаты, шерстный покров.

1.1. ОТБОР ПРОБ И ДОСТАВКА ФЕКАЛИЙ В ЛАБОРАТОРИЮ

Для проведения исследований отбирают пробы кала у животных из одного стада, станка или же стаи с учетом числа животных.

От каждой головы крупного рогатого скота берут 50 г кала; овец, коз и свиней – 20 г, домашней птицы и кроликов – 10 г.

Отбор фекалий осуществляют из прямой кишки животного или после дефекации из разных участков.

Помещают в чистую, сухую, стеклянную или пластмассовую посуду с крышкой.

На пробах проставляют номера или клички животных, дату и время отбора материала.

Фекалии должны быть доставлены в лабораторию и исследованы в день отбора.

Для обнаружения личинок стронгилоидов, яиц анкилостоматид и трихостронгилид фекалии исследуются не позднее 3-4 ч после дефекации.

Для обнаружения вегетативных форм кишечных простейших (балантидий, лямблий, амёб и др.) время от дефекации до исследования должно быть сокращено до минимума – 20-30 мин. после дефекации (не более 1 ч).

При взятии проб фекалий у животных необходимо строго соблюдать меры личной гигиены!

У ***крупного рогатого скота*** пробы фекалий берут из прямой кишки рукой, одетой в тонкую резиновую или полиэтиленовую гинекологическую перчатку. Кисть руки, одетую в перчатку, увлажняют с наружной стороны, складывают лодочкой и вращательными движениями вводят в ампулообразное расширение прямой кишки, захватывают небольшое количество фекалий и осторожно извлекают руку. Свободной рукой в это же время отводят хвост в сторону.

У ***молодняка крупного рогатого скота*** отбор проб фекалий можно проводить специальными «ложками».

При проведении массовых исследований пробы фекалий отбирают от 10% поголовья, но не менее 30 проб от возрастной группы. У лактирующих коров пробы лучше брать от каждого животного.

У *овец и коз* фекалии берут двумя пальцами (средним и указательным) руки, одетой в тонкую резиновую перчатку, осторожно вводя их в прямую кишку. У молодняка овец и коз отбор проб фекалий проводят, надавливая на брюшную стенку ближе к прямой кишке.

Можно также использовать резиновую грушу, наконечник которой смазывают вазелином. Затем легкими вращательными движениями наконечник груши вводят в прямую кишку. При сдавливании груши воздух входит в прямую кишку и вызывает рефлекторный акт дефекации.

Пробы фекалий отбирают от 5-10% поголовья, но не менее 25 животных, или от каждого животного.

У *лошадей* пробы фекалий берут из прямой кишки рукой, одетой в тонкую резиновую перчатку или в полиэтиленовую перчатку. У жеребят пробы фекалии берут двумя пальцами – средним и указательным, вводя их в прямую кишку.

Фекалии берут от 5% поголовья табуна, но не менее 25 проб. Если в табуне меньше 30 животных, то пробы фекалий отбирают от каждого животного.

При содержании лошадей в индивидуальных стойлах фекалии можно брать с пола, если они свежие и незагрязненные.

Проводя отбор проб фекалий у лошадей из прямой кишки, необходимо строго соблюдать меры предосторожности. Манипуляция проводится только при надежной фиксации животного.

У *свиней* фекалии берутся из прямой кишки двумя пальцами (средним и указательным) руки, одетой в перчатку. Можно проводить отбор фекалий специальными «ложками». У поросят отбор проб фекалий проводят одним указательным пальцем, надавливая на брюшную стенку ближе к прямой кишке.

Фекалии берут от 10% поголовья, но не менее 30 проб от возрастной группы, при этом проводится отбор проб фекалий от всех хряков-производителей и супоросных свиноматок.

При содержании хряков и свиноматок в отдельных станках фекалии можно брать с пола, если они свежие и незагрязненные.

Проводя отбор проб фекалий у хряков и свиноматок, необходимо строго соблюдать меры предосторожности.

У *собак* фекалии берут из прямой кишки указательным пальцем руки, одетой в тонкую резиновую перчатку. Манипуляция проводится очень осторожно при надежной фиксации животного. Можно также проводить отбор фекалий во время прогулки собак, если фекалии не загрязнены.

У *кошек* фекалии берут из кошачьего туалета, если они свежие и не загрязнены.

У *кроликов* берут несколько горошин фекалий, надавливая на брюшную стенку ближе к прямой кишке. Если кролики содержатся в индивидуальных клетках, то фекалии можно взять с пола, если они свежие и не загрязненные.

У *птиц* пробы помета для исследования берут от 5% поголовья. Для отбора фекалий птицу отсаживают в отдельные клетки или производят групповое взятие фекалий с пола.

1.2. КОНСЕРВИРОВАНИЕ ФЕКАЛИЙ

При невозможности исследования фекалий сразу же после дефекации или в день поступления материала в лабораторию материал необходимо подвергнуть консервированию.

Физический способ хранения фекалий: при низкой температуре от 0 до 4°C не более суток.

Химические консерванты:

1. *Жидкость Барбагалло* (3 мл формалина 40%+97 мл изотонического раствора $NaCl$ или 1 л дистиллированной воды+30 мл формалина 40%+8,5 г натрия хлорида).

2. 4% раствор формалина.

3. Смесь 4% раствора формалина с равным количеством глицерина.

4. Раствор уксусной кислоты от 3 до 10%.

5. Растворы детергентов 1-1,5% – небioактивные моющие средства; перед приготовлением раствора из порошка удаляют влагу, выдерживая в сухожаровом шкафу при 100°C в течение 2 ч.

Фекалии заливаются одним из приготовленных консервантов в объеме 1:1 или 1:2 (1 часть фекалий и 1-2 части раствора консерванта), проба тщательно перемешивается индивидуальной палочкой.

Хранить фекалии в растворах консервантов можно от 1 до 6 месяцев (максимум год), при более длительном хранении возможно разрушение яиц гельминтов.

Для консервации простейших кишечника фекалии можно поместить в консервант *Турдыева*: 80 мл 0,2% раствора нитрита натрия (натрия азотистокислого) (0,16 г $NaNO_2$ + 80 мл воды дистиллированной) + 2 мл глицерина + 10 мл концентрированного формалина (аптечного) + 8 мл концентрированного раствора Люголя.

Смешивать в соотношении: 1 часть фекалий и 3 части консерванта.

Химические консерванты для консервации и хранения взрослых гельминтов или их фрагментов:

- 10% формалин;
- 70% спирт;
- жидкость Барбагалло;
- глицерин.

Для консервации мышц с личинками трихинелл используется концентрированный раствор натрия хлорида (на 100 мл воды 40-50 г $NaCl$).

1.3. ОТБОР ПРОБ МОЧИ

Мочу собирают при естественном акте мочеиспускания или посредством катетеризации в чистые стеклянные банки с крышками.

Лучше всего исследовать свежеполученную (не более 2 ч после взятия) мочу, поэтому в лабораторию доставляется моча утреннего сбора. Моча исследуется сразу после поступления в лабораторию.

Если провести исследование сразу по поступлению мочи в лабораторию невозможно, то хранят ее в закрытой посуде при температуре не выше 4°С не более 24 часов.

Для исследования на шистосомоз желательно собрать мочу после физической нагрузки.

1.4. ОТБОР ПРОБ КРОВИ

В зависимости от цели исследования взятие крови осуществляют из:

- периферических сосудов (краевые вены уха, вены венчика копыт) – диагностика пироплазмидозов и анаплазмоза;
- из магистральных кровеносных сосудов (вены предплечья, вены сафена, яремной вены) – диагностика дирофиляриоза, парафиляриоза и др.

Место взятия крови обрабатывают этиловым спиртом или спирт-эфиром 1:1.

Прокол осуществляют обыкновенной инъекционной иглой или скарификатором.

Для диагностики пироплазмидозов и анаплазмоза берут первые капли крови.

Для исследования на дирофиляриоз в пробирку со стабилизатором отбирают 1-2 мл крови. В качестве стабилизатора можно использовать трилон Б (динатриевая или дикалиевая соль ЭДТА – этилендиаминтетрауксусной кислоты) добавляется из расчета 0,1-0,2 мл 10% раствора на 10 мл крови; гепарин – 50 ЕД на 10 мл крови (1-2 капли).

1.5. ОТБОР СОСКОБОВ С ПЕРИАНАЛЬНЫХ СКЛАДОК

Соскоб с перианальных складок можно отбирать:

- методом «отпечатка», ватным тампоном. Тампоном, смоченным глицерином, обтирают кожу вокруг ануса и перианальных складок;
- липкой лентой (скотчем). Отрезок липкой ленты длиной 8-10 см, держа за концы, плотно прижимают всей липкой поверхностью к анусу и перианальным складкам.

После забора соскоба тампон вкладывают в пробирку, липкую ленту наклеивают на предметное стекло. Пробирки, предметные стекла маркируются.

1.6. БИОПСИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ (поперечнополосатой мускулатуры)

Хирургическим путем из пораженных участков мышечной ткани либо из места преимущественной локализации возбудителей получают биопсированные кусочки (биоптат желательно отбирать из участков, приближенных к сухожилию).

Помещают в стерильную стеклянную посуду с физраствором.

Исследуют сразу после биопсии.

Если лабораторное исследование откладывается на какой-то срок, пробы мышц помещают в консервант или замораживают. Консервантом может служить концентрированный раствор натрия хлорида (30-50%).

1.7. ОТБОР ПРОБ ЭПИДЕРМИСА КОЖИ

Для исследования животных на акарозы делают соскобы с пораженных участков кожи которые в последующем доставляют в лабораторию для микроскопического исследования. Перед взятием соскобов вокруг очага выстригают шерсть. Для обнаружения чесоточных клещей на границе между пораженной и здоровой кожей брюшистым скальпелем соскабливают верхний слой эпидермиса до появления сукровицы. Взятый материал помещают в баночку, плотно закрывают крышкой и этикетируют с указанием наименования хозяйства, фермы, отары, номера животного, даты взятия материала.

Для щенков псовых и кошек готовят ватные тампоны на небольших деревянных палочках (можно использовать ушные палочки). Для взрослых песцов, лисиц, собак делают палочки длиной 8-10 см и на концы наматывают небольшие кусочки ваты. Палочку с ватным тампоном смачивают 50% водным раствором глицерина, затем вводят в слуховой проход животного и несколькими вращательными движениями снимают коричневую массу с поверхности кожи.

Для выявления демодексов на месте бугорков выстригают шерсть, дезинфицируют кожу и стерильной кровопускательной иглой делают укол в центре бугорка на глубину 2-3 мм, прокалывая оболочку капсулы, в которой находится колония клещей. Содержимое полости иглы переносят на предметное стекло, потом заливают капелькой подсолнечного или вазелинового масла, разрушают иглой скопление клещей и просматривают под микроскопом. Материал исследуют сразу после отбора.

Для обнаружения гельминтов и их личинок, паразитирующих в кожном покрове, с пораженных участков кожи делают несколько срезов.

Поверхностные срезы кожи диаметром 2-3 мм делают бескровно, с соблюдением асептики, стерильным лезвием бритвы или скальпелем, предварительно приподняв кожу кончиком стерильной иглы.

Помещают кусочки кожи в стерильную стеклянную посуду (можно чашки Петри) с физраствором. Исследуют сразу после отбора материала.

1.8. ОТБОР ПРОБ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ КИШЕЧНЫХ ГЕЛЬМИНТОЗОВ И ПРОТОЗООЗОВ

После лечения геогельминтозов кишечника фекалии отбирают через месяц после проведенного лечения.

После лечения протозоозов кишечника фекалии отбирают в зависимости от выявленного заболевания: при балантидиозе и амебиазе – сразу после лечения, при лямблиозе – через неделю.

При первом отрицательном результате отбор проб проводится еще двукратно с интервалом 2-4 дня, после чего ставится окончательный результат лабораторного анализа.

2. ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИГНОСТИКИ ГЕЛЬМИНТОЗОВ

2.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕКАЛИЙ

В зависимости от вида гельминтов исследования могут быть макроскопическими – направлены на выявление в исследуемых фекалиях гельминтов и их фрагментов; микроскопическими – направленными на обнаружение яиц и личинок гельминтов.

2.1.1. МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Многие виды гельминтов во внешнюю среду выделяют фрагменты тела – членики (представители класса цестод). Для обнаружения в фекалиях животных фрагментов гельминтов (члеников-проглоттид) используется проглоттидоскопия, а для обнаружения целых гельминтов – гельминтоскопия.

Метод визуального осмотра фекалий (гельминто- и проглоттидоскопия) с последующим последовательным промыванием их

При поверхностном осмотре свежевыделенных фекалий на их поверхности можно обнаружить членики крупных цестод (у собак – *Taenia hydatigena*, *Taenia pisiformis*, *Dipylidium caninum* и др.; у жвачных – *Moniezia expansa*, *Moniezia benedeni* и др.). Иногда выделяются с фекалиями аскариды.

Фекалии сначала осматривают целиком, затем разводят водой до жидкой консистенции и небольшими порциями исследуют при хорошем освещении.

У овец при проведении проглоттидоскопии после фиксации животного резиновой спринцовкой в прямую кишку вливают 100-150 мл охлажденной воды и вводят влагалищное зеркало. Через влагалищное зеркало из прямой кишки свободно выделяются фекальные массы, их собирают в кювету. Собранные в кювете фекальные массы осматривают на наличие члеников цестод.

Для лучшего просмотра фекалий применяют метод отмучивания.

Метод отмучивания

Необходимые реактивы и оборудование:

- химические стаканы объемом 1-2 л;
- чашки Петри;
- черная бумага;
- пинцеты;
- препаровальные иглы;
- предметные стекла 6 x 10, 8 x 12 см;
- лотки эмалированные;
- лупа, микроскоп.

Ход исследования:

1. Фекальные массы размешивают с большим количеством воды, в емкости объемом 1-2 л.
2. Взвесь отстаивают 15-20 мин.
3. Надосадочную жидкость сливают
4. К осадку добавляют воду и дают повторно отстояться.
5. Процедуру повторяют до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной.
6. Небольшими порциями осадок переносят в чашки Петри и тщательно просматривают под лупой на фоне черной бумаги.
7. Все подозрительные частицы и крупные образования извлекаются пинцетом или препаровальной иглой на отдельное предметное стекло и просматривают под микроскопом.

Применение.

Для обнаружения члеников мелких цестод (*Echinococcus granulosus*, *Alveococcus multilocularis*), а также гельминтов небольших размеров (стронгиляты желудочно-кишечного тракта и др.).

При контроле эффективности лечения после применения лекарственных препаратов, не вызывающих деструкцию паразита.

2.1.2. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ. ОВОСКОПИЯ

(обнаружение яиц гельминтов в исследуемых фекалиях)

Метод нативного мазка

Необходимые реактивы и оборудование:

- глицерин;
- предметные стекла;
- палочки стеклянные или деревянные;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. Небольшое количество фекалий тщательно размешивают на предметном или часовом стекле с равным количеством воды или со смесью, состоящей из

воды и глицерина 1:1 (глицерин добавляют для просветления изучаемого объекта и чтобы предотвратить быстрое высыхание препарата).

2. Оставшиеся не размельченными грубые частицы фекалий удаляют.

3. Каплю накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод является самым простым методом исследования фекалий на гельминтозы, протозоозы, но при этом и самым малоэффективным. Данный метод используется в основном как подсобный.

МЕТОДЫ ФЛОТАЦИИ

В основе методов флотации (всплывания) лежит разность удельного веса флотационного раствора и яиц гельминтов, удельный вес флотационного раствора выше, в результате яйца гельминтов всплывают на поверхность жидкости и обнаруживаются в поверхностной пленке.

Необходимые реактивы и оборудование:

- флотационный раствор;
- ареометр;
- проволочная петля диаметром 0,3-0,5см;
- предметные стекла (обезжиренные);
- химические стаканчики емкостью 30-50 мл;
- чашки Петри;
- стеклянные или деревянные палочки;
- микроскоп.

Подготовка к работе.

Приготовление флотационного раствора: флотационный раствор готовят по одной из нижеописанных прописей (таблица 1).

Таблица 1 –Флотационные жидкости, используемые для исследования фекалий

Вещество	Химическая формула	Плотность раствора, кг/м³	Количество соли на1000 мл воды
Натрия хлорид	<i>NaCl</i>	1,18-1,2	400-420
Магния сульфат	<i>MgSO₄</i>	1,26-1,28	920
Нитрат аммония (аммиачная селитра)	<i>NH₄NO₃</i>	1,32	1500
Нитрат натрия (натриевая селитра)	<i>NaNO₃</i>	1,38-1,4	1000
Натрия тиосульфат (гипосульфит натрия)	<i>Na₂S₂O₃×5H₂O</i>	1,4	1750

Вещество	Химическая формула	Плотность раствора, кг/м ³	Количество соли на 1000 мл воды
Сахар		1,27	454
Нитрат свинца (азотнокислый свинец)	$Pb(NO_3)_2$	1,5	650
Цинка сульфат	$ZnSO_4$	1,18	371
Хлорид цинка	$ZnCl_2$	1,82	2000
Сульфат натрия	Na_2SO_4	1,26-1,28	920

Любую из солей, указанных в таблице, растворяют в горячей воде в эмалированной посуде. Соль порциями кладут в емкость с горячей водой при постоянном подогревании и перемешивании до полного растворения.

После остывания раствора до комнатной температуры обязательно измеряют удельный вес флотационных растворов, т.к. приготовление раствора по прописи не гарантирует получение нужного удельного веса (если используемая соль недостаточно химически чистая). Измеряется плотность ареометрами общего пользования.

Если раствор хранится длительное время, то перед исследованием его подогревают с размешиванием осадка и после остывания раствора снова измеряют ареометром удельный вес.

Различные солевые растворы используются при выполнении различных методов исследования:

- Метод Фюллеборна – раствор хлорида натрия;
- Метод Дарлинга – раствор хлорида натрия и глицерина (1:1);
- Метод Г.А. Котельникова и В.М. Хренова – раствор аммиачной селитры;
- Метод И.А. Щербовича – раствор сульфата магния;
- Метод Калантарян – раствор азотнокислого натрия.

Подготовка предметных стекол: предметные стекла обезжиривают в смеси Никифорова (равные части этилового спирта и эфира).

Методы флотации без центрифугирования

Метод Фюллеборна

Ход исследования:

1. 5-10 г фекалий тщательно размешивают в 20-кратном объеме насыщенного раствора поваренной соли.
2. Полученную взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли в стакан емкостью 75-100 мл. Фильтрат оставляют в покое на 40-60 минут.
3. Проволочной петлей, прикасаясь к поверхности взвеси, берут пробу.

4. Приставшую к петле пленку жидкости стряхивают на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод используется для обнаружения яиц нематод.

Метод Г.А. Котельникова и В.М. Хренова

Ход исследования:

1. 3-5 г фекалий тщательно размешивают в 20-кратном объеме насыщенного раствора аммиачной селитры до получения однородной взвеси.
2. Полученную взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли.
3. Фильтрат оставляют в покое на 15-20 минут.
4. Прикасаясь к поверхности жидкости металлической петлей, берут пробу, стряхивают ее на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод позволяет обнаружить яйца гельминтов с высокой удельной массой.

Флотационно-центрифужные методы

Метод Дарлинга

Ход исследования:

1. 3-5 г фекалий смешивают с водой (1:10, 1:20).
2. Взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли в стакан емкостью 75-100 мл.
3. Фильтрату дают отстояться 5-10 минут.
4. Надосадочную жидкость сливают
5. Осадок переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 2 минуты при 1000-1500 об/ мин.
6. Надосадочную жидкость удаляют.
7. К осадку добавляют жидкость Дарлинга (смесь равных частей глицерина и насыщенного раствора поваренной соли).
Содержимое перемешивают и центрифугируют 2 минуты при 1000-1500 об/мин.
8. Металлической петлей берут пробу, переносят ее на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод позволяет обнаружить яйца большинства видов гельминтов, паразитирующих в пищеварительной системе животных.

Примечание.

При отсутствии глицерина вторичное центрифугирование можно проводить с одним насыщенным раствором поваренной соли, поскольку глицерин не имеет флотационной роли, а предотвращает быстрое высыхание капли.

Метод И.А. Щербовича

Ход исследования:

1. Пробу фекалий тщательно размешивают с водой 1:10 до получения однородной взвеси.
2. Взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли в емкость объемом 100 мл.
3. Фильтрату дают отстояться 5-10 минут.
4. Надосадочную жидкость сливают.
5. Осадок переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 2 мин. при 1000-1500 об/мин.
6. Надосадочную жидкость удаляют.
7. К осадку добавляют насыщенный раствор магния сульфата.
8. Содержимое перемешивают и повторно центрифугируют в том же режиме.
9. Сразу же после остановки центрифуги металлической петлей снимают с поверхности взвеси пробу, стряхивают ее на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение метода.

Данный метод является высокоэффективным для обнаружения яиц гельминтов с высокой удельной плотностью.

Флотация в растворе сахара

Ход исследования:

1. 3-5 г фекалий тщательно смешивают с 15-20 мл воды.
2. Профильтровывают взвесь через металлическое ситечко или один слой марли.
3. Фильтрат центрифугируют в течение 3-5 минут при 2000-3000 об/мин.
4. Надосадочную жидкость удаляют.
5. К осадку добавляют насыщенный раствор сахара.
6. Осадок ресуспензируют стеклянной палочкой.
7. Взвесь центрифугируют в течение 3-5 минут при 1500–2000 об/мин.
8. Металлической петлей снимают с поверхности жидкости пробу, переносят ее на предметное стекло и микроскопируют.

Применение.

Метод эффективен при обследовании животных на нематодозы.

СЕДИМЕНТАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ

Для обнаружения яиц гельминтов, имеющих высокий удельный вес (яйца трематод, цестод, акантоцефал), можно использовать методы, в основе которых лежит седиментация (осаждение). Из-за более высокого удельного веса яиц гельминтов, чем используемых растворов, они выпадают в осадок, где и обнаруживаются в последующем.

Необходимые реактивы и оборудование:

- химические стаканчики емкостью 30-50 мл;

- лабораторные стаканы (баночки Флоринского) – 2 шт. на каждого студента;
- ступки фарфоровые с пестиками – на каждого студента;
- ситечки металлические, марлевые салфетки;
- чашки Петри;
- центрифужные пробирки;
- проволочная петля диаметром от 0,3 до 0,5 см;
- предметные стекла (обезжиренные);
- микроскоп.

Метод последовательных промываний

Ход исследования:

1. 5-10 г фекалий тщательно размешивают с 50-100 мл воды до получения однородной взвеси.
2. Взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли в стеклянные стаканы.
3. Фильтрат отстаивают 5 мин.
4. Надосадочную жидкость сливают.
5. К осадку добавляют новую порцию воды с последующим отстаиванием в течение 5 мин.
6. Данную манипуляцию повторяют до тех пор, пока жидкость над осадком не станет прозрачной.
7. После последнего удаления надосадочной жидкости осадок небольшими частями переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Применение.

Метод позволяет обнаружить яйца гельминтов с высокой удельной массой (яйца фасциол, парамфистум, акантоцефал и др.).

Примечание.

Для ускорения процесса после 2-3 отстаиваний осадок можно перенести в центрифужные пробирки и процентрифугировать в течение 2 минут при 1500 об/мин. Для удобства надосадочную жидкость можно отсасывать спринцовкой.

Метод седиментации с целлофановыми пленками по Г.А. Котельникову и В.М. Хренову

Подготовка пленок.

Пленки готовят из гидрофильного целлофана толщиной 22 мкм. Прямоугольные пленки размером 3×2 см опускают в чашку Петри с 50% раствором глицерина или молочной кислоты на 24 часа.

Молочная кислота и глицерин служат для просветления и для предохранения от высыхания препарата, который будет ими покрываться.

Ход исследования:

1. 2 г фекалий кладут в стаканчик емкостью 50 мл с небольшим количеством воды и размешивают, постепенно добавляя воду до получения однородной взвеси.

2. Взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли.
3. Фильтрат отстаивают 5 минут.
4. Надосадочную жидкость сливают.
5. К осадку добавляют воду, ресуспензируют, отстаивают в течение 5 мин.
6. Надосадочную жидкость сливают.
7. Осадок помещают отдельными порциями на предметное стекло и покрывают предварительно подготовленной пленкой.
8. Препарат выдерживают 5-10 минут, после чего приступают к его микроскопии.

Применение.

Метод является высокоэффективным для обнаружения яиц с темным цветом окраски (дикроцелий, фасциол, трихоцефал, аскаридов и др.).

Метод Я.Д. Никольского

Ход исследования:

1. 5-10 г фекалий смешивают с 20 мл воды.
2. В течение 10-20 минут взвесь отстаивают, периодически встряхивая.
3. Жидкость переносят в пробирки и дают ей отстояться в течение 2 часов, а фекалии удаляют.
4. Надосадочную жидкость отсасывают.
5. Осадок переносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод рекомендуется для диагностики цестодозов жвачных и лошадей.

Формалин-эфирный метод

Необходимые реактивы и оборудование.

- 10% раствор формалина;
- этиловый эфир медицинский;
- 1% раствор Люголя;
- центрифужные градуированные пробирки;
- металлическое ситечко или бинт (марля);
- предметные и покровные стекла;
- деревянные или стеклянные палочки;
- микроскоп;
- центрифуга на 3000 об/мин.

Ход исследования:

1. 7 мл 10% раствора формалина смешивают с 1 г фекалий до получения однородной взвеси (общий объем взвеси должен составить 8 мл).
2. Фильтруют взвесь фекалий через металлическое ситечко или один слой марли в центрифужную пробирку.
3. Добавляют к фильтрату 2 мл эфира.
4. Пробирку закрывают пробкой и энергично встряхивают в течение 30 с.
5. Смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 1 мин.
6. После центрифугирования в пробирке образуется 4 слоя: эфир, «фекальная

пробка», раствор формалина и на дне осадок, в котором будут содержаться яйца гельминтов.

7. «Фекальную пробку» палочкой отделяют от стенок пробирки и вместе с надосадочной жидкостью удаляют.

8. Осадок переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Применение.

Применяется для выявления яиц, личинок гельминтов кишечника и печени. Не снижает эффективности при исследовании законсервированных фекалий.

Используется как специальный метод для диагностики трематодозов, а также как количественный метод диагностики.

Уксусно-эфирный метод

Необходимые реактивы и оборудование:

- 5% водный раствор уксусной кислоты;
- 1% раствор Люголя;
- этиловый эфир медицинский;
- центрифужные градуированные пробирки;
- металлическое ситечко или бинт (марля);
- предметные и покровные стекла;
- палочки деревянные или стеклянные;
- микроскоп;
- центрифуга на 3000 об/мин.

Ход исследования:

1. 1 г фекалий смешивают с 5 мл 5% раствора уксусной кислоты до получения однородной взвеси.

2. Взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли в центрифужную пробирку.

3. К фильтрату добавляют 4 мл эфира (общий объем взвеси должен составлять 10 мл).

4. Закрывают пробкой и энергично встряхивают в течение 30 с.

5. Смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 1 мин. или в течение 2 мин. при 1500 об/мин.

6. После центрифугирования в пробирке различают 4 слоя: в верхней части пробирки - эфирный экстракт, образовавшаяся «фекальная пробка», раствор уксусной кислоты и на дне - небольшой осадок.

7. «Фекальную пробку» отделяют от стенок пробирки и вместе с надосадочной жидкостью удаляют.

8. Осадок (как правило, небольшой, бесцветный) переносят на предметные стекла и микроскопируют.

Применение.

Применяется для выявления яиц, личинок гельминтов кишечника и печени.

Не снижает эффективности при использовании законсервированных фекалий.

Используется как специальный метод для диагностики трематодозов, а также как количественный метод диагностики.

ФЛОТАЦИОННО-СЕДИМЕНТАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ

Метод Н.В. Демидова

Ход исследования:

1. Навеску фекалий массой 3-5 г помещают в стакан емкостью 100-200 мл, добавляют насыщенный раствор поваренной соли (350 г поваренной соли на 1 л воды) и тщательно размешивают до получения однородной взвеси.
2. Взвесь отстаивают 15-20 мин.
3. Надосадочную жидкость отсасывают спринцовкой, оставляя 20-30 мл ее над осадком.
4. К осадку добавляют воду до полного объема стаканчика и тщательно перемешивают.
5. Взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли и дают отстояться в течение 5 минут.
6. Надосадочную жидкость из стаканчика отсасывают спринцовкой, оставляя на дне 15-20 мл жидкости.
7. Осадок переливают в пробирки и дают отстояться 3-5 минут.
8. Надосадочную жидкость отсасывают.
9. К осадку добавляют воду до полного объема пробирки. Эту процедуру повторяют 3-5 раз.
10. Надосадочную жидкость удаляют.
11. Осадок переносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод является высокоэффективным при исследовании фекалий на наличие яиц фасциол.

Метод А. Вишняускаса

Ход исследования:

1. Навеску фекалий массой около 3 г тщательно размешивают с 40-50 мл воды до получения однородной взвеси.
2. Взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли в стакан емкостью 100 мл и добавляют воду до полного объема стакана.
3. Взвеси дают отстояться 5 мин.
4. Надосадочную жидкость осторожно сливают или отсасывают, оставляя на дне 20 мл осадка.
5. К осадку добавляют 80 мл воды и дают отстояться в течение 5 минут.
6. Надосадочную жидкость сливают, оставляя на дне 10 мл осадка, который переносят в центрифужные пробирки.

7. Взвесь центрифугируют в течение 1-2 мин. при 1500 об/мин.
8. Надосадочную жидкость сливают.
9. К осадку добавляют раствор цинка сульфата, так, чтобы мениск жидкости находился выше краев центрифужной пробирки.
10. Пробирку накрывают покровным стеклом, чтобы жидкость всей своей поверхностью соприкасалась с ним.
11. Центрифугируют 30 сек. при 1500 об/мин.
12. Покровное стекло аккуратно переносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод является высокоэффективным при исследовании фекалий на наличие яиц фасциол, трихоцефал, цестод жвачных и лошадей, а также стронгилят пищеварительного тракта животных.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОВОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Количественными методами определяют число яиц гельминтов в 1 г или 1 мл фекалий. Данные методы дают ориентировочное представление об интенсивности инвазии, позволяют судить об эффективности лечения гельминтозов.

Метод толстого мазка под целлофаном по Като-Кац (количественная модификация метода Като и Миура)

Необходимые реактивы и оборудование:

- раствор Като (100 мл 6% раствора фенола+100 мл глицерина+1,2 мл 3% раствора малахитового зеленого, раствор можно хранить длительное время в склянке из темного стекла с притертой крышкой);
- целлофан гидрофильный (гидрофильный целлофан горит, в отличие от полиэтиленовой пленки, которая плавится и непригодна для исследования);
- предметные стекла;
- пластинка размером 40×30 мм (из пластмассы или металла) с отверстием в центре диаметром 6 мм;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. До проведения анализа полоски из целлофана поместить в рабочий раствор Като не менее чем на 24 ч.
2. На предметное стекло поместить пластинку с отверстием.
3. Произвольную навеску фекалий поместить на отверстие пластинки.
4. Провести по материалу шпателем так, чтобы через отверстие в пластинке на стекло выдавилась стандартная навеска.
5. Фекалии растереть тонким слоем по предметному стеклу.
6. Накрыть препарат целлофановой полоской, обработанной в растворе Като.
7. Целлофан сверху притереть резиновой пробкой до получения тонкого, равномерного, прозрачного слоя.

8. Препарат выдержать при комнатной температуре в течение 1 ч или в термостате при 40°C в течение 20-30 мин.
9. При микроскопии просматривается весь мазок и ведется подсчет обнаруженных яиц гельминтов.
10. Чтобы определить количество яиц в 1 г фекалий: число яиц, обнаруженных в данном препарате, следует умножить на коэффициент, равный 24.

Применение метода.

Применяется для определения интенсивности инвазии при клинико-диагностических обследованиях и при массовых обследованиях для определения напряженности очага инвазии.

Методы формалин-эфирного и уксусно-эфирного осаждения

Методы основаны на исследовании 1 г фекалий (количество фекалий, внесенное в пробирку и вызвавшее подъем жидкости на 1 мл, равно 1 г). При просмотре всего осадка полностью методы дают возможность провести количественный учет обнаруженных яиц, т. к. количество яиц в осадке соответствует нахождению их в 1 г фекалий.

ЛАРВОСКОПИЯ

(исследование фекалий на наличие личинок гельминтов)

Метод Ветцеля – Орлова (Бермана – Орлова)

Необходимое оборудование:

- штатив;
- стеклянная воронка (диаметром 10 см);
- металлическое сито;
- резиновая трубка с зажимом;
- предметные стекла;
- стеклянные или деревянные палочки;
- чашки Петри;
- центрифуга;
- микроскоп.

Подготовка к работе.

Закрепить в штативе стеклянную воронку с металлическим ситом. На нижний конец воронки надеть резиновую трубку с зажимом.

Ход исследования:

1. 10-20 г фекалий кладут в металлическое сито или заворачивают в марлю и помещают в воронку.
2. В воронку заливают теплую воду (35-38°C) таким образом, чтобы фекалии были покрыты водой.
3. Фекалии выдерживают 4-6 часов при исследовании фекалий овец и коз, 10-12 часов – фекалий крупного рогатого скота и лошадей.
4. По прошествии указанного времени, открывая зажим, осадок собирают в пробирку. Пробирку отсоединяют от трубки и центрифугируют 2-3 минуты при 1500 об/мин.

5. Надосадочную жидкость сливают.
6. Осадок переносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод является высокоэффективным при исследовании фекалий на наличие личинок легочных гельминтов овец, коз, крупного рогатого скота, лошадей.

Метод И.А. Щербовича

Необходимое оборудование:

- химические стаканы;
- марля;
- предметные стекла;
- стеклянные или деревянные палочки;
- центрифуга
- микроскоп.

Ход исследования:

1. 5-10 г фекалий заворачивают в один слой марли и помещают в стеклянный стаканчик.
2. Заливают в стаканчик теплую воду 35-38°C так, чтобы полностью закрыть фекалии.
3. Дают отстояться 4-6 часов при исследовании фекалий овец и коз, 10-12 часов – фекалий крупного рогатого скота и лошадей.
4. Фекалии удаляют, надосадочную жидкость аккуратно отсасывают.
5. Осадок переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 1 мин. при 1000-1500 об/ мин.
6. Надосадочную жидкость удаляют.
7. Осадок переносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Данный метод используется для диагностики диктиокаулеза сельскохозяйственных животных, мюллерииоза, протостронгиленоза и других стронгилятозов органов дыхания.

Метод В.И. Шильникова

Необходимое оборудование:

- химические стаканы;
- марля;
- предметные стекла;
- стеклянные или деревянные палочки;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. 5-10 г фекалий заворачивают в один слой марли и помещают в стеклянный стаканчик.
2. Заливают в стаканчик теплую воду 35-38°C так, чтобы полностью закрыть фекалии.
3. Дают отстояться 4-6 часов при исследовании фекалий овец и коз, 10-12

часов – фекалий крупного рогатого скота и лошадей.

Фекалии удаляют, надосадочную жидкость аккуратно отсасывают.

4. Осадок переносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Данный метод используется для диагностики диктиокаулеза сельскохозяйственных животных, мюллерииоза, протостронгиленоза и других стронгилятозов органов дыхания.

Метод Вайда

Ход исследования:

1. 3-4 горошины фекалий овец, коз и других мелких животных помещают в чашку Петри, на часовое стекло или по одному на предметное стекло.

2. Наносят сверху 5-7 капель воды, подогретой до 35-38°C.

3. Через 15-20 мин. фекалии удаляют.

4. Оставшуюся жидкость исследуют под микроскопом.

Применение:

Используется для исследования фекалий овец, коз и других животных, имеющих плотную консистенцию фекалий в виде горошин на наличие личинок диктиокаулов и других легочных гельминтов.

Метод прост в выполнении, но при этом является недостаточно эффективным.

Методика культивирования личинок стронгилят

При обнаружении в фекалиях животных яиц стронгилят по одним морфологическим особенностям яиц поставить родовой диагноз бывает достаточно затруднительно.

С целью более точной диагностики необходимо провести культивирование личинок стронгилят и по морфологическим особенностям личинок поставить точный диагноз.

Ход исследования:

1. Пробу фекалий массой 10 г кладут в чашку Петри.

2. Фекалии увлажняют водой, закрывают крышкой.

3. Чашку Петри с фекалиями помещают в термостат при температуре 25-30°C.

4. Ежедневно чашку открывают для аэрации и слегка увлажняют.

5. Через 7-10 дней пробы закладывают в аппарат Бермана.

6. Заливают теплой водой (40°C) и оставляют на 4-6 часов.

7. Осадок сливают каплями на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

8. Для обездвиживания личинок к осадку добавляют 1-2 капли 0,1% раствора йода или 3-5 капель 3% водного раствора формалина.

Культивирование личинок стронгилят лошадей по П.А. Величкину

1. В стакан емкостью 100 мл помещают 50 г свежих фекалий лошадей.
2. Стакан сверху обвязывают чистой марлей и помещают в термостат при температуре 25-27°C на 6-7 дней (культивирование личинок при комнатной температуре 20-22°C осуществляется 9-10 дней).
3. Фекалии периодически перемешивают и увлажняют.
4. По истечении срока культивирования стакан аккуратно переворачивают и фекалии заворачивают в марлю, которой был обвязан стакан.
5. Фекалии, завернутые в марлю, помещают в стакан емкостью 200 мл таким образом, чтобы они не соприкасались с дном стакана.
6. Заливают теплой водой 35-36°C и оставляют на 2-3 часа.
7. По истечении указанного времени фекалии из стакана аккуратно удаляют.
8. Надосадочную жидкость отсасывают спринцовкой.
9. Осадок переносят в чашку Петри или на предметные стекла и исследуют под микроскопом.
10. Для обездвиживания личинок к осадку добавляют 8-10 капель раствора Люголя.

2.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРИАНАЛЬНЫХ СОСКОБОВ

Необходимые реактивы и оборудование:

- глицерин;
- ватный тампон на деревянной палочке;
- липкая прозрачная лента, скотч;
- предметные стекла;
- микроскоп.

Ход исследования.

1. Ватным тампоном, смоченным в 50% водном растворе глицерина, обтирают кожу вокруг ануса и перианальные складки.
2. На предметное стекло наносят каплю глицерина.
3. Ватный тампон обчищают о край предметного стекла.
4. Смешивают полученный материал с каплей глицерина.
5. Полученный препарат микроскопируют без покровного стекла.

Применение.

Метод используют для обследования лошадей на оксиуроз, а также для обнаружения яиц тениид у плотоядных.

Метод перианального соскоба липкой лентой

Используется скотч, полиэтиленовая прозрачная пленка с липким слоем для детского технического творчества, а также операционная пленка ЛПО-1, ЛПО-2.

Ход исследования.

1. Отрезок липкой ленты длиной 8-10 см, держа за концы, плотно прижимают всей липкой поверхностью к анусу и перианальным складкам.

2. Отклеивают полоску от кожи перианальной области и переносят на предметное стекло липким слоем вниз.
3. Ленту приклеивают к стеклу равномерно во избежание образования воздушных пузырей.
4. Для улучшения микроскопии под ленту можно нанести каплю иммерсионного масла.

2.3. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

Необходимое оборудование:

- центрифужные пробирки;
- стеклянные палочки;
- пипетки;
- предметные и покровные стекла;
- центрифуга;
- микроскоп.

Метод визуального осмотра мочи с последующей ее концентрацией

Исследуемую мочу наливают в стеклянный стакан и осматривают.

Отдельные порции мочи переносят в широкие прозрачные емкости и просматривают при помощи лупы.

Для более тщательного исследования мочи используют метод концентрации.

Метод концентрации

Ход исследования:

1. Порцию мочи помещают в высокий стеклянный сосуд и дают отстояться в течение 30-45 мин.
2. Сливают верхнюю часть столба мочи, оставив 10-15 мл осадка.
3. Осадок переносят в центрифужные пробирки.
4. Центрифугирование осуществляют в течение 5 мин. при 1500 об/мин или 1-2 мин. при 3000 об/мин.
5. Надосадочную жидкость сливают.
6. Осадок пипеткой переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Применение.

Чаще применяется как специальный метод диагностики диоктофимоза, мочевого капилляриоза.

2.4. ИССЛЕДОВАНИЕ КРОВИ

Метод концентрации для обнаружения микрофилярий

Необходимое оборудование:

- 1% раствор уксусной кислоты;
- центрифужные пробирки;

- пипетки;
- предметные и покровные стекла;
- центрифуга;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. 2 мл стабилизированной крови смешивают с 10 мл 1% раствора уксусной кислоты.
2. Смесь перемешивают до полного лизиса эритроцитов и центрифугируют 2 мин при 1500 об/мин.
3. Надосадочную жидкость удаляют.
4. Осадок пипеткой переносят на предметное стекло и микроскопируют. Для более тщательного исследования из осадка изготавливают мазки, фиксируют их и окрашивают одним из общепринятых методов.

Применение.

Метод используется для обнаружения микрофилярий, дирофилярий, парафилярий, сетарий.

Модифицированный метод Кнотта

Необходимое оборудование:

- 2% раствор формалина;
- 0,1% раствор метиленового синего;
- центрифужные пробирки;
- пипетки;
- предметные и покровные стекла;
- центрифуга;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. 1 мл стабилизированной крови смешивают с 2% раствором формалина 1:10.
2. Смесь перемешивают и центрифугируют 5 мин. при 1500 об/мин.
3. Надосадочную жидкость удаляют.
4. Осадок смешивают с раствором метиленового синего в соотношении 1:1 и оставляют для окрашивания на 5 мин.
5. Осадок пипеткой переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Применение.

Метод используется для обнаружения микрофилярий.

Метод центрифугирования крови с дистиллированной водой

Необходимое оборудование:

- дистиллированная вода;
- центрифужные пробирки;
- пипетки;
- предметные и покровные стекла;
- центрифуга;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. 1 мл стабилизированной крови тщательно перемешивают с 9 мл дистиллированной воды.
2. Смесь отстаивают 5 мин. и центрифугируют 5 мин. при 2000 об/мин.
3. Надосадочную жидкость удаляют, оставляя 1 мл жидкости с осадком.
4. Осадок ресуспендируют, порционно переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Применение.

Метод используется для обнаружения живых подвижных микрофилярий.

Исследование сыворотки крови

Необходимое оборудование:

- центрифужные пробирки;
- пипетки;
- предметные стекла;
- центрифуга;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. Отбирают не менее 1,5-2 мл крови и оставляют в пробирке при комнатной температуре 5-6 ч до образования сгустка.
2. Пипеткой отбирают сыворотку со дна пробирки (или предварительно удаляют сгусток и содержимое пробирки центрифугируют 5 мин. при 1500-2000 об/мин).
3. Осадок помещают на предметное стекло и исследуют.

Применение.

Метод используется для обнаружения живых подвижных микрофилярий.

Метод прижизненного количественного определения микрофилярий

Необходимое оборудование:

- дистиллированная вода;
- ледяная уксусная кислота;
- раствор фуксина;
- меланжер;
- счетная камера Фукса-Розенталя;
- пипетки;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. Меланжер до метки I заполняется кровью и до отметки II раствором, состоящим из ледяной уксусной кислоты, раствора фуксина и дистиллированной воды 3:4:93.
2. Смешивают раствор с кровью 2-3 мин.
3. К чистой и сухой камере Фукса-Розенталя притирают покровное стекло до появления колец Ньютона.
4. Раствор в меланжере встряхивают и наносят каплю (не первую) раствора на

среднюю часть пластинки камеры и под микроскопом (10×10) подсчитывают количество микрофилярий во всех квадратах.

5. Полученное количество умножают на 6,23 и получают количество микрофилярий в 20 см³.

6. Для определения количества микрофилярий в 1 мл окончательный результат умножают на 50.

Применение.

Метод используется для количественного определения микрофилярий.

2.5. ЛАРВОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭПИДЕРМИСА КОЖИ

Необходимые реактивы и оборудование:

- изотонический раствор *NaCl*;
- стерильные иглы;
- стерильное лезвие бритвы или глазной скальпель;
- стерильные чашки Петри;
- предметные и покровные стекла;
- микроскоп.

Подготовка к работе.

Кончиком иглы приподнимают эпидермис кожи и лезвием бритвы или острым скальпелем срезают кусочек кожи диаметром 2-3 мм (бескровно, соблюдая правила асептики).

Делают одновременно несколько срезов, главным образом с тех участков, на которых заметны изменения кожи и отмечается зуд.

Помещают в стерильную чашку Петри с физраствором.

Метод исследования нативного препарата

Ход исследования:

1. Биоптат эпидермиса кожи помещают на предметное стекло в каплю изотонического раствора хлорида натрия.

2. Микроскопируют сразу после приготовления препарата при увеличении объектива ×8 или ×10, окуляра ×10.

Примечание. Из положительных препаратов можно приготовить постоянные препараты: высушить, зафиксировать метанолом, окрасить по Романовскому-Гимза.

Метод «обогащенного» препарата

Ход исследования:

1. Срезы кожи помещают в пробирку с физраствором или средой с коллагеназой и оставляют при температуре 24-37°C на 24-36 ч.

2. Надосадочную жидкость сливают.

3. Осадок переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Применение.

Эффективен при диагностике онхоцеркоза, кожного дипеталонемоза, церкариоза.

2.6. ИССЛЕДОВАНИЕ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЛИЧИНОК ТРИХИНЕЛЛ

Компрессорная трихинеллоскопия

Необходимое оборудование

- стеклянный компрессорий или предметные стекла (размером 12×6 или 15×28 см);
- препаровальные иглы;
- ножницы, скальпель;
- эмалированные кюветы;
- стереоскопический микроскоп МБС.

Ход исследования:

1. Каждую пробу мышц перед исследованием помещают в чашки Петри, расположенные на эмалированных кюветах, куда помещают и необходимый инструментарий (ножницы, пинцеты, препаровальные иглы), предметные стекла. Работа проводится в перчатках с соблюдением правил техники безопасности.
2. Из каждой пробы мышц ножницами делают срезы строго вдоль мышечных волокон, величиной с «овсяное зерно».
3. Всего из разных участков пробы делают 24 среза.
4. Каждый срез помещают на отдельный квадрат нижнего стекла компрессория и сдавливают верхним стеклом, путем завинчивания закрепляющих винтов компрессория.
5. Микроскопируют каждый срез в отдельности.

Примечание.

Диагностика личинок трихинелл бывает затруднена, если кусочки мышцы подсохли, или в срезах обильные включения жира, или пробы мышцы фиксированы формалином, или личинки находятся в обызвествленных капсулах.

В этих случаях:

- помещают срезы мышц в 5% раствор натрия гидроокиси и выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре или 10 мин. в термостате при температуре 45°C;
- срезы с обызвествленными капсулами, где личинки не видны, помещают предварительно в 5-10% раствор соляной кислоты на 1-2 ч, чтобы растворить известь, затем помещают в глицерин или молочную кислоту для просветления.

Трихинеллоскопия методом переваривания в искусственном желудочном соке

Необходимые реактивы и оборудование:

- соляная кислота концентрированная или 1% раствор;
- медицинский пепсин кристаллический или 3% раствор;
- дистиллированная вода;

- термостат;
- ножницы, скальпель;
- измельчитель ткани;
- химические стаканчики;
- пипетки;
- микроскоп;

Подготовка к работе.

Мышечную ткань измельчают до состояния фарша.

Готовят раствор искусственного желудочного сока по одной из прописей:

- 1 л дистиллированной воды + 7 мл 1% раствора соляной кислоты + 5 мл 3% раствора пепсина;
- 1 л дистиллированной воды + 7 мл концентрированной соляной кислоты + 5-7 г пепсина кристаллического.

Ход исследования:

Использование 1-го варианта желудочного сока.

1. В химический стакан с искусственным желудочным соком помещают мышечную массу в соотношении 1:10 (10 г мясного фарша и 100 мл желудочного сока) и тщательно размешивают.
2. Смесь помещают в термостат при температуре 37°C на 16-18 ч.
3. Смесь периодически помешивают стеклянной палочкой.
4. После переваривания всю массу помещают в аппарат Бермана на 1,5-2 ч.
5. Пробирку снимают, надосадочную жидкость удаляют.
6. Осадок переносят в чашку Петри или предметные стекла и микроскопируют.

Использование 2-го варианта желудочного сока.

1. Фарш смешивают с желудочным соком в соотношении 1:25 или 1:50.
2. Смесь помещают в термостат при температуре 42-47°C на 3,5 ч.
3. Личинки осаждают в химическом стаканчике емкостью 50 мл в течение 20-30 мин.
4. Надосадочную жидкость удаляют.
5. Осадок микроскопируют

Непереваренные мышечные волокна можно окрасить 0,25% раствором бриллиантового зеленого, в результате хорошо видны недекапсулированные личинки трихинелл.

Применение.

Применяется как метод прямой диагностики для обнаружения личинок трихинелл в мышечной ткани.

3. ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРОТОЗООЗОВ

3.1. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ПРОСТЕЙШИХ, ПАРАЗИТИРУЮЩИХ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ

Основным материалом, исследуемым для диагностики протозоозов пищеварительного тракта, являются фекалии.

Метод нативного мазка

Необходимые реактивы и оборудование:

- изотонический раствор $NaCl$;
- предметные и покровные стекла;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. Фекалии исследуют не позднее 15-20 мин. после дефекации (когда возможно обнаружение подвижных вегетативных форм простейших).
2. Небольшое количество фекалий тщательно размешивают на предметном или часовом стекле с равным количеством 0,9% раствора хлорида натрия, подогретого до 35-37°C, или со смесью, состоящей из физраствора и глицерина 1:1.
3. Оставшиеся не размельченными грубые частицы фекалий удаляют.
4. Каплю накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод используется в основном для исследования свежесвыделенных фекалий на наличие вегетативных форм жгутиковых (лямблий, трихомонад), реснитчатых простейших (балантидий).

Окраска нативного мазка с целью обнаружения цист простейших

Необходимые реактивы и оборудование:

- изотонический раствор $NaCl$;
- 1%раствор Люголя;
- предметные и покровные стекла;
- деревянные палочки;
- микроскоп.

Приготовление маточного раствора Люголя (5%).

10 г йодида калия растворяют в 30 мл дистиллированной воды + 5 г кристаллического йода, размешивают до полного растворения и доводят до 100 мл дистиллированной водой. Хранить после приготовления в посуде из темного стекла.

Приготовление рабочего 1% раствора Люголя.

5 мл маточного раствора Люголя смешивают с 20 мл изотонического раствора $NaCl$.

Ход исследования:

1. Для исследования выбирают в первую очередь фекалии с примесью слизи

или прожилками крови.

2. Готовят нативный мазок фекалий.
3. Мазок высушивают на воздухе.
4. Мазок фиксируют спирт-эфиром 1:1 в течение 10-15 мин.
5. Окрашивают мазок рабочим раствором Люголя в течение 10-20 мин.

Применение.

На розовом фоне цисты балантидий, лямблий окрашиваются в красный цвет, амебы окрашиваются в светло-зеленый цвет.

Модификация метода Бермана для исследования на балантидиоз

Необходимые реактивы и оборудование:

- дистиллированная вода;
- химические стаканчики;
- чашки Петри;
- пробирки центрифужные;
- центрифуга;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. В химический стаканчик или в чашку Петри помещают 10-15 г фекалий.
2. Заливают фекалии теплой (45°C) дистиллированной водой, так, чтобы полностью их закрыть.
3. Через 1,5-2 ч сливают жидкость в центрифужные пробирки.
4. Центрифугируют жидкость 2 мин. при 1500 об/мин.
5. Надосадочную жидкость сливают.
6. Осадок переносят на предметное стекло, накрывают покровными стеклами и микроскопируют.

Применение.

Для диагностики балантидиоза. Позволяет выявлять трофозоиты балантидий при низкой интенсивности инвазии.

Окраска мазков фекалий по Цилю-Нильсену

Необходимые реактивы и оборудование:

- физраствор;
- фуксин основной;
- этиловый спирт;
- фенол;
- 7% раствор серной кислоты (5-10%);
- 5% раствор малахитовой зелени в 10% этиловом спирте;
- предметные стекла;
- горелка (спиртовка);
- химические стаканчики;
- микроскоп.

Приготовление рабочего раствора краски по Цилю-Нильсену:

1. 2 г фуксина основного растворить в 12 мл 96% спирта.

2. 5 г фенола растворить в 50 мл дистиллированной воды.
3. Слить вместе растворы фуксина и фенола, довести объем раствора дистиллированной водой до 100 мл.

Ход исследования:

1. На предметное стекло нанести небольшое количество фекалий.
2. Добавить к фекальной массе 1-2 капли физраствора и тщательно перемешать.
3. Растереть фекалии тонким слоем.
4. Высушить мазок на воздухе (не менее 30 мин.).
5. Фиксировать мазки в смеси спирт-эфира 1:1 в течение 10-15 мин.
6. Высушить зафиксированный мазок на воздухе.
7. Провести 3-5 раз зафиксированным и высушенным мазком над пламенем горелки.
8. На 5-10 мин. поместить мазок в рабочий раствор карбол-фуксина.
9. Промыть мазок водопроводной водой.
10. Обесцветить мазок 7% раствором серной кислоты в течение 20-60с.
11. Промыть в воде.
12. Подкрасить в течение 5 мин. 5% раствором малахитовой зелени.
13. Промыть в воде.
14. Высушить на воздухе.
15. Микроскопировать под иммерсией.

Применение.

Метод окраски фиксированных мазков по Цилю-Нильсену считается одним из наиболее надежных для выявления ооцист криптоспоридий.

На зеленоватом фоне ооцисты криптоспоридий выглядят в виде округлых образований 4-5 мкм в диаметре, ярко-красного цвета.

Примечание.

Перед исследованием материал можно обогатить флотационным методом (методом Дарлинга) или методом последовательных промываний, используя вместо воды 0,9% раствор хлорида натрия.

Для окрашивания фиксированных мазков можно применять и другие красители, например: азур-эозином по Романовскому-Гимза окрашивать от 10 до 30-45 мин. в 10% растворе красителя, при этом ооцисты не окрашиваются или слабо окрашиваются и имеют вид округлых образований, внутри ооцист (по периферии) могут быть в виде бледно-голубых удлиненных и слегка изогнутых телец спорозоиты с красноватыми гранулами внутри.

МЕТОДЫ ФЛОТАЦИИ

Метод Фюллеборна

Ход исследования:

1. 5-10 г фекалий тщательно размешивают в 20-кратном объеме насыщенного раствора поваренной соли (в одном литре горячей воды растворяют 350-400 г поваренной соли).

2. Взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли
3. Фильтрат оставляют в покое на 40 минут.
4. Проволочной петлей, прикасаясь к поверхности взвеси, берут пробу.
5. Приставшую к петле пленку жидкости стряхивают на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Применение.

Метод позволяет обнаружить в исследуемых фекалиях ооцисты эймерий, цистоизоспор, саркоцист и др.

Метод Дарлинга

Ход исследования.

1. 3-5 г фекалий смешивают с водой (1:10, 1:20).
2. Взвесь фильтруют через металлическое ситечко или один слой марли в стакан емкостью 75-100 мл.
3. Фильтрат дают отстояться 5-10 минут.
4. Надосадочную жидкость сливают.
5. Осадок переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 2 минуты при 1000-1500 об/мин.
6. Надосадочную жидкость удаляют.
7. К осадку добавляют жидкость Дарлинга (смесь равных частей глицерина и насыщенного раствора поваренной соли).
8. Содержимое перемешивают и центрифугируют 2 минуты при 1000-1500 об/мин.
9. Металлической петлей берут пробу, переносят ее на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Примечание.

При отсутствии глицерина вторичное центрифугирование можно проводить с одним насыщенным раствором поваренной соли, поскольку глицерин не имеет флотационной роли, а предотвращает быстрое высыхание капли.

Применение.

Метод позволяет обнаружить в исследуемых фекалиях ооцисты эймерий, цистоизоспор, саркоцист и др. даже при невысокой интенсивности инвазии.

Флотация в растворе сахара

Ход исследования.

- 3-5 г фекалий тщательно смешивают с 15-20 мл воды.
- Профильтровывают взвесь через металлическое ситечко или один слой марли.
- Фильтрат центрифугируют в течение 3-5 минут при 2000-3000 об/мин.
- Надосадочную жидкость удаляют.
- К осадку добавляют насыщенный раствор сахара.
- Осадок ресуспендируют стеклянной палочкой.
- Взвесь центрифугируют в течение 3-5 минут при 1500–2000 об/мин.

- Металлической петлей снимают с поверхности жидкости пробу, переносят ее на предметное стекло и микроскопируют.

Применение.

Данный метод используется для диагностики эймериидозов.

Использование для флотации раствора сахара имеет ряд преимуществ, по сравнению с использованием растворов поваренной соли. Растворы сахаров не оказывают разрушающего действия на оболочки ооцист, что позволяет их использовать в дальнейшем для культивирования. Кроме того, растворы сахаров не кристаллизуются при длительной микроскопии.

Культивирование ооцист эймериид

1. Фекалии, содержащие ооцисты, помещают в чашки Петри и увлажняют их 2-2,5% раствором двуххромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$).
2. Чашки Петри с фекалиями помещают в термостат при температуре 25-28°C.
3. Ежедневно фекалии увлажняют, 3-4 раза в день перемешивают для доступа кислорода и просматривают ооцисты под микроскопом, наблюдая за процессом споруляции.
4. Процесс споруляции может продолжаться от 12 часов до 7 и более дней, в зависимости от вида ооцист.

Применение.

Метод используется для определения видовой принадлежности ооцист, а также для оценки эффективности используемого лекарственного средства.

Метод исследования материала из консерванта формалин-эфирным обогащением

Необходимое оборудование и реактивы:

- изотонический раствор $NaCl$;
- 1% раствор Люголя;
- этиловый эфир;
- 10%раствор формалина нейтральный (для нейтрализации – во флакон из темного стекла с раствором формалина на дно слоем в 1-2 см насыпать порошкообразный углекислый кальций);
- центрифужные пробирки;
- бинт (марля);
- стекла предметные и покровные;
- пробки резиновые;
- центрифуга;
- микроскоп.

Ход исследования:

1. Со дна флакона с консервантом отобрать 1,5-2 мл осадка и перенести в центрифужную пробирку.
2. Добавить к осадку 6-7 мл 10% нейтрального формалина и тщательно перемешать.
3. Полученную взвесь профильтровать через один слой марли в другую центрифужную пробирку.

4. К фильтрату добавить 2-3 мл этилового эфира.
5. Смесь тщательно перемешать.
6. Дать отстояться смеси 2 мин. в вытяжном шкафу.
7. Смесь центрифугируют 2 мин. при 1500 об/мин.
8. Образовавшуюся фекальную пробку и надосадочную жидкость удаляют.
9. На предметное стекло нанести каплю изотонического раствора $NaCl$ и раствора Люголя.
10. Перенести в каждую каплю осадок из центрифужной пробирки, размещать деревянной палочкой и накрыть каждую каплю покровным стеклом.
11. Приступить к микроскопированию.

Применение.

Для обнаружения цист кишечных простейших.

3.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПРОСТЕЙШИХ, ПАРАЗИТИРУЮЩИХ В КРОВИ

Основным методом диагностики кровопаразитарных заболеваний является микроскопическое исследование мазков крови.

Техника изготовления и окраски мазков крови

Необходимые реактивы и оборудование:

- 96%спирт этиловый;
- смесь спирт-эфира 1:1;
- метанол;
- предметные стекла;
- микроскоп.

Подготовка стекол:

- тщательно промывают стекла горячей мыльной водой;
- промывают стекла чистой проточной водой;
- высушивают стекла;
- помещают стекла в емкость (банку с притертой пробкой), заполненную абсолютным этиловым спиртом или смесью равных частей этилового спирта и эфира.

Стекла хранятся указанным способом до необходимости приготовления мазков. Перед использованием стекла извлекаются из емкости со спиртом и насухо вытирают чистой салфеткой.

Приготовление мазка крови:

Чистое предметное стекло держат между большим и средним пальцами левой руки. Поверхностью предметного стекла осторожно, но быстро касаются выступившей из прокола капли крови, стараясь сделать это ближе к среднему пальцу, и сразу же приводят стекло в горизонтальное положение. Незамедлительно к капле крови осторожно под углом 40-50° подводят шлифованное стекло. Как только капля, коснувшись шлифованного стекла, разойдется по линии соприкосновения стекол, быстрым, но ровным движением шлифованное стекло направляют в обратную сторону (в сторону большого

пальца), сохраняя все время угол наклона 40-50°С. Полученный таким способом мазок высушивают и подписывают.

Фиксация мазка:

- *фиксация абсолютным метиловым спиртом* – сухие мазки крови на 3 минуты погружают в абсолютный метиловый спирт. Через 3 минуты мазки вынимают и просушивают. Спирт можно наливать на мазок так, чтобы он полностью покрыл его, по прошествии 3 минут спирт сливают, мазок высушивают;
- *фиксация смесью, состоящей из равных количеств этилового спирта и эфира* – мазки погружают в смесь спирт-эфир (1:1) на 10-30 минут или смесь наносят на мазок и выдерживается до полного испарения спирт-эфира.

Примечание.

Фиксация мазков метиловым спиртом является лучшим методом. Фиксация мазков смесью этилового спирта и эфира дает много артефактов.

Окраска мазков по Романовскому-Гимза

1. В лабораториях имеется готовый заводской раствор краски Романовского-Гимза. Перед окрашиванием мазков готовят рабочий раствор краски в соотношении 1:10. При необходимости небольшого объема краски готовят рабочий раствор краски из расчета 1-2 капли исходного раствора на 1 мл дистиллированной воды.
2. Рабочий раствор краски осторожно наливают пипеткой на предметные стекла так, чтобы мазок крови был полностью покрыт краской.
3. Через 30-40 минут краску сливают.
4. Препараты промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

Эритроциты окрашиваются в красный цвет, цитоплазма пироплазмид – в голубой, их ядра – в темно-красный цвет.

Примечание.

При окрашивании мазков крови методом наслаивания на препарат выпадают нерастворенные хлопья краски, что значительно затрудняет исследования мазка с целью обнаружения кровепаразитов. В связи с этим, лучше красить мазки методом подслаивания. Предметные стекла кладут на стеклянные палочки мазками вниз и рабочий раствор краски подливают под мазки.

Окраска мазков по Май-Грюнвальду

1. Мазки окрашивают без предварительной фиксации.
2. На мазок методом подслаивания или наслаивания наносят краску.
3. Через 2-5 минут добавляют равное количество воды.
4. Смесь аккуратно перемешивают.
5. Через 5-10 мин. мазок промывают водой и высушивают.

Эритроциты – розовые, паразиты – бледно-голубые, их ядра бурого цвета.

Окраска мазков по Паппенгейму

Комбинированный метод, сочетающий окрашивание краской Май-Грюнвальда с последующим докрасиванием краской Романовского-Гимза.

1. Предварительной фиксации мазков не требуется.
2. Мазок покрывают краской Май-Грюнвальда и выдерживают 3 минуты.
3. На мазок к краске добавляют равное количество дистиллированной воды, аккуратно перемешивают и выдерживают 1-2 минуты.
4. Краску сливают.
5. Препарат докрасивают рабочим раствором краски Романовского-Гимза в течение 10-15 минут.
6. Мазок обильно промывают дистиллированной водой и сушат.

Эритроциты – медно-розовые, цитоплазма паразитов – синего цвета, ядра их темно-красного или коричневого цвета.

Окраска мазков по Г. Эпштейну

1. На 20-30 мин. на зафиксированный мазок наносят раствор: 1 г лимоннокислого лития + 1 г толуидинового голубого + 100 мл дистиллированной воды.
2. Промывают препарат в чистой дистиллированной воде.
3. На 1-2 сек. препарат погружают в насыщенный водный раствор пикриновой кислоты.
4. Тщательно промывают проточной водой.
5. Высушивают фильтровальной бумагой.

Эритроциты окрашиваются в зеленый цвет, у кровепаразитов цитоплазма синего цвета, их ядра – красные.

4. ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АРАХНОЭНТОМОЗОВ

4.1. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ЧЕСОТОЧНЫХ КЛЕЩЕЙ

Для обнаружения чесоточных клещей делают соскобы с пораженных участков кожи.

Путем визуального осмотра на теле животного находят поражения кожи и на границе здоровой и больной ткани брюшистым скальпелем соскабливают верхний слой кожи до появления капель крови.

Из внутренней поверхности ушной раковины соскоб делают тупым концом скальпеля, деревянной лопаткой или ватным тампоном. Скарификат помещают на часовое стекло или в чашки Петри.

Для исследования скарификата можно использовать:

- *мортальные методы*, позволяющие обнаружить клещей и их яйца;
- *витальные методы*, позволяющие обнаружить клещей и оценить их жизнеспособность.

Отбор материала при *демодекозе*: на месте бугорков выстригают шерсть, обрабатывают кожу антисептическим раствором и стерильной инъекционной

иглой делают прокол в центре бугорка на глубину 2-3 мм. Содержимое полости иглы мандреном выталкивают на предметное стекло. Полученную массу смешивают с 1-2 каплями подсолнечного или вазелинового масла. Полученный мазок накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Материал исследуют сразу после отбора.

Для диагностики *хейлителлеза* можно проводить следующие исследования:

- прямая визуализация клещей: эта процедура заключается в вычесывании шерстного покрова вдоль спины над крестцом, затем вычесанную перхоть помещают на темную бумагу и наблюдают движения клещей в собранном материале;
- микроскопия поверхностных соскобов кожи, скотч-тест (при помощи липкой ленты), волос, чешуек (собранные при вычесывании гребнем) позволяет выявить клещей *Cheyletiella*, нимф, личинок или яйца.

МОРТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Метод с использованием раствора натрия (калия) гидроокиси

1. Соскоб кожи помещают в чашку Петри или часовое стекло и заливают 10% раствором натрия (калия) гидроокиси.
2. Залитый скарификат оставляют на 15-20 минут или подогревают над пламенем горелки до появления паров.
3. Скарификат небольшими порциями переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Метод М.П. Добычина

1. В пробирку вносят небольшое количество скарификата (0,5 г) и добавляют двойной объем 10% раствора натрия (калия) гидроокиси (1 мл).
2. 3-5 мин. подогревают пробирку до 60-70°C.
3. Пробирку доверху заполняют 60% раствором гипосульфита (тиосульфата натрия) и оставляют в покое на 5 минут.
4. По истечении указанного времени проволочной петлей, прикасаясь к поверхности жидкости, снимают 5-6 капель и стряхивают их на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Метод Г.З. Шика

1. Небольшое количество скарификата (1 г) помещают в центрифужную пробирку и заливают 10-кратным объемом 10% раствора калия гидроокиси (10 мл).
2. Помешивая, подогревают содержимое до 50-60°C в течение 20 минут, а затем центрифугируют при 1500 об/мин.
3. Жидкость из пробирки сливают, а осадок переносят на предметное стекло и микроскопируют.

ВИТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Метод Н.Н. Богданова

Соскобы кожи помещают на черную бумагу, в термостате подогревают до 28-30°C. Под действием тепла паразиты выползают из соскобов, их собирают с помощью препаровальной иглы, помещают на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Метод М.Г. Хатина

В пробирку помещают мелкорасщепленный соскоб кожи, заливают его подогретым до 30°C 0,9% раствором натрия хлорида и центрифугируют 1-2 минуты при 1500 об/мин. После этого верхний слой жидкости сливают, а осадок помещают на предметное стекло и микроскопируют.

Метод Н.Ф. Родиной

Аппарат Бермана заливают водой, подогретой до 42-43°C, на металлическое ситечко помещают соскобы кожи. Через 30-40 минут содержимое трубки сливают в пробирку и центрифугируют 2 минуты при 1500 об/мин. Верхний слой жидкости сливают, а осадок микроскопируют.

Метод Н.А. Гавриловой

Соскоб помещают на предметное стекло, обрабатывают кедровым иммерсионным маслом, покрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом. Клещи, находясь в иммерсионном масле, просветляются и лучше видны за счет проникновения терпиноидов, входящих в состав масла.

Метод М.В. Шустровой

Тампон с ватой предварительно окрашивают черной тушью, в последующем на таком тампоне невооруженным глазом хорошо видны клещи в виде белых точек. Собранный материал подвергают дальнейшей обработке и микроскопируют.

4.2. СБОР И ИССЛЕДОВАНИЕ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ

Иксодовых клещей собирают на животных, внимательно осматривая места наиболее вероятного их нахождения. Чаще всего иксодовых клещей можно обнаружить на морде, ушных раковинах, конечностях, брюхе, вымени. Собранных клещей на несколько секунд помещают в 70% спирт, подогретый до 70°C.

Для определения родовой принадлежности иксодовых клещей помещают на предметные стекла или на листы белой бумаги и просматривают под лупой. Просматривают вначале спинную, затем брюшную и боковые поверхности клещей.

Определяют длину хоботка, форму его основания. При изучении верхней стороны тела клеща определяют величину спинного щитка (для определения

пола особи), устанавливают его форму, характер пунктировки, наличие глаз. Обращают внимание на форму и длину цервикальных и латеральных бороздок, наличие спинного рисунка. При изучении вентральной поверхности определяют форму и расположение анальной бороздки, форму и длину перитрем. По этим и другими признакам определяют род клещей.

4.3. СБОР И ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ НАСЕКОМЫХ

Сбор бескрылых паразитических насекомых проводится при осмотре животных и прочесывании волос гребнем. Насекомых, оставшихся на зубцах гребня, снимают пинцетом или кисточкой, смоченной спиртом. При обследовании животных на наличие паразитических насекомых учитывают излюбленные места их обитания и сезон года. Зимой и весной у крупного рогатого скота паразитические насекомые в большой степени локализуются в области верхней части шеи, холки, основания рогов и внутренней поверхности бедер; у лошадей – в области корня хвоста, шеи и лопаток; у плотоядных – в области межчелюстного пространства, верхней части шеи, живота. В летний период года паразитические насекомые локализуются на участках тела, защищенных от прямых солнечных лучей, и где поддерживается влажность прикожного воздуха.

Для облегчения сбора насекомых на теле животных можно использовать их термотропизм. С этой целью отдельные участки тела обогревают электролампой типа «соллюкс» или накрывают тканью, нагретой до 50°C. Насекомые выползают на поверхность нагретого участка волосяного покрова или переползают на поверхность теплой ткани и становятся хорошо заметными.

Для ускорения сбора паразитических насекомых можно также использовать легкое увлажнение волос слабым раствором креолина или лизола. После увлажнения паразиты от основания волос перемещаются к их вершине, что облегчает их сбор.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаптационные процессы и паразитозы животных : монография / А. И. Ятусевич [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – 2-е изд., перераб. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 571 с.
2. Животные сельскохозяйственные жвачные. Методы лабораторной диагностики гельминтозов : ГОСТ Р 54627-2011. – Введ. 12.12.2011. – Москва : Стандартинформ, 2013. – 16 с.
3. Мясцова, Т. Я. Методы выявления микродирофилярий в периферической крови собак / Т. Я. Мясцова // Ветеринарное дело. – 2019. – № 1 (91). – С. 10–16.
4. Основные методы лабораторной диагностики паразитарных болезней : пер. с англ. / Всемирная организация здравоохранения ; пер. К. Д. Имамкулиева ; отв. ред. О. А. Фадеева. – [Москва] : Медицина, 1994. – Ч. 1. : Паразитология - руководства к лабораторной диагностике. – 135 с.
5. Паразитология и инвазионные болезни животных. Практикум : учебное пособие для студентов вузов по специальностям «Ветеринарная медицина», «Ветеринарная санитария и экспертиза» / А. И. Ятусевич [и др.] ; ред. А. И. Ятусевич. – Минск : ИВЦ Минфина, 2011. – 312 с.
6. Паразитология и инвазионные болезни животных : учебник для студентов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / А. И. Ятусевич [и др.] ; ред. А. И. Ятусевич. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 544 с.
7. Паразитология и инвазионные болезни животных : учебник для студентов вузов, обучающихся по специальности «Ветеринария» / М. Ш. Акбаев [и др.] ; ред. М. Ш. Акбаев. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : КолосС, 2008. – 776 с.
8. Практикум по диагностике инвазионных болезней животных : учебное пособие для студентов вузов по специальности «Ветеринарно-санитарная экспертиза» и «Ветеринария» / М. Ш. Акбаев [и др.] ; ред. М. Ш. Акбаев ; Международная ассоциация «Агрообразование». – Москва : КолосС, 2006. – 536 с.
9. Руководство по ветеринарной паразитологии / А. И. Ятусевич [и др.] ; ред. В. Ф. Галат, А. И. Ятусевич ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. – Минск : ИВЦ Минфина, 2015. – 495 с.

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины является старейшим учебным заведением в Республике Беларусь, ведущим подготовку врачей ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарных врачей, провизоров ветеринарной медицины и зооинженеров.

Вуз представляет собой академический городок, расположенный в центре города на 17 гектарах земли, включающий в себя единый архитектурный комплекс учебных корпусов, клиник, научных лабораторий, библиотеки, студенческих общежитий, спортивного комплекса, Дома культуры, столовой и кафе, профилактория для оздоровления студентов. В составе академии 4 факультета: ветеринарной медицины; биотехнологический; повышения квалификации и переподготовки кадров агропромышленного комплекса; международных связей, профориентации и довузовской подготовки. В ее структуру также входят Аграрный колледж УО ВГАВМ (п. Лужесно, Витебский район), филиалы в г. Речице Гомельской области и в г. Пинске Брестской области, первый в системе аграрного образования НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии (НИИ ПВМ и Б).

В настоящее время в академии обучается более 4 тысяч студентов, как из Республики Беларусь, так и из стран ближнего и дальнего зарубежья. Учебный процесс обеспечивают 305 преподавателей. Среди них 168 кандидатов, 26 докторов наук и 18 профессоров.

Помимо того, академия ведет подготовку научно-педагогических кадров высшей квалификации (кандидатов и докторов наук), переподготовку и повышение квалификации руководящих кадров и специалистов агропромышленного комплекса, преподавателей средних специальных сельскохозяйственных учебных заведений.

Научные изыскания и разработки выполняются учеными академии на базе Научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии. В его состав входит 2 отдела: научно-исследовательских экспертиз (с лабораторией биотехнологии и лабораторией контроля качества кормов); научно-консультативный.

Располагая современной исследовательской базой, научно-исследовательский институт выполняет широкий спектр фундаментальных и прикладных исследований, осуществляет анализ всех видов биологического материала и ветеринарных препаратов, кормов и кормовых добавок, что позволяет с помощью самых современных методов выполнять государственные тематики и заказы, а также на более высоком качественном уровне оказывать услуги предприятиям агропромышленного комплекса. Активное выполнение научных исследований позволило получить сертификат об аккредитации академии Национальной академией наук Беларуси и Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь в качестве научной организации. Для проведения данных исследований отдел научно-исследовательских экспертиз аккредитован в Национальной системе аккредитации в соответствии с требованиями стандарта СТБ ИСО/МЭК 17025.

Обладая большим интеллектуальным потенциалом, уникальной учебной и лабораторной базой, вуз готовит специалистов в соответствии с европейскими стандартами, является ведущим высшим учебным заведением в отрасли и имеет сертифицированную систему менеджмента качества, соответствующую требованиям ISO 9001 в национальной системе (СТБ ISO 9001 – 2015).

www.vsavm.by

210026, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/11, факс (0212) 48-17-65,
тел. 33-16-29 (факультет международных связей, профориентации и довузовской подготовки);
33-16-17 (НИИ ПВМ и Б); E-mail: pk_vgavm@vsavm.by.

Нормативное производственно-практическое издание

Ятусевич Антон Иванович,
Дубина Иван Николаевич,
Самсонович Владимир Алексеевич и др.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по выполнению паразитологических методов
лабораторной диагностики гельминтозов,
протозоозов и арахноэнтомозов**

Ответственный за выпуск А.И. Ятусевич
Технический редактор О. В. Луговая
Компьютерный набор А. М. Сарака
Компьютерная верстка Е. В. Морозова
Корректор Т.А. Никитенко

Подписано в печать 02.09.2022. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Ризография.
Усл. печ. л. 2,75. Уч.-изд. л. 1,88. Тираж 150 экз. Заказ 2297.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.
ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 48-17-82.
E-mail: rio@vsavm.by
<http://www.vsavm.by>