

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Башкирский государственный аграрный университет»

Методические указания
Основы ветеринарии и биотехника размножения животных

Кафедра инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы

Б1.В.16 ОСНОВЫ ВЕТЕРИНАРИИ И БИОТЕХНИКА РАЗМНОЖЕНИЯ ЖИВОТНЫХ

Лабораторная работа

Диагностика гельминтозов

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Направление подготовки

35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции

Профиль подготовки

Прогрессивные технологии производства и переработки продукции животноводства

Технология производства продукции органического и функционального питания

Квалификация (степень) выпускника **бакалавр**

УДК 619 ББК 48 М 54

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета биотехнологий и ветеринарной медицины (протокол № 8 от « 21 » марта 2024 г.)

Составитель:

профессор кафедры инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы, д-р. ветеринар. наук

А.И. Иванов

Рецензент: зав. кафедры морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней д-р. ветеринар. наук профессор

Е.Н. Сковородин

Ответственный за выпуск:

зав. кафедрой инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы, канд. биол. наук, доцент

О.Н. Николаева

г. Уфа, БГАУ, кафедра инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы

Диагностика гельминтозов

Цель занятия: Изучить методы прижизненной и посмертной диагностики гельминтозов животных. Освоить методику взятия проб фекалий от животных разных видов, а также крови, мочи, кожи, истечения из глаз, содержимого желудка и др. Ознакомиться с оборудованием и реактивами, используемыми при исследовании проб фекалий и других субстратов животных на гельминтозы.

Материалы и оборудование: микроскопы биологические, бинокулярные лупы, кюветы, чашки Петри, стаканчики стеклянные, мензурки, предметные и покровные стекла, скальпели, препаровальные иглы, ножницы, кисточки, марля, фильтровальные ситечки, ведра и др.

2 Общие сведения

Диагностика гельминтозов может проводиться для установления экстенсивности и интенсивности инвазии, с познавательной и профилактической целями. Используют прижизненные и посмертные методы диагностики. Диагноз на гельминтозы следует ставить с учетом комплексных исследований: эпизоотологии, симптомов болезни, результатов лабораторных методов, гельминтологических и патологоанатомических вскрытий.

При изучении вопросов эпизоотологии целесообразно учитывать нальность, сезонность, вид животного, его возраст, породные особенности. Симптомы болезни при гельминтозах в целом зависят от места локализации паразита, стадии его развития, величины, количества и проявляются остро, субклинически или хронически. В основном признаки гельминтозов бывают стертыми, характерными для групп заболеваний. В работе ветеринарного врача лабораторные методы диагностики являются приоритетными. При этом большое значение придают гельминтоко- проскопическим исследованиям, включающим гельминтоскопию, гельминтоовоскопию гельминтоларвоскопию. Кроме того, к лабораторным исследованиям относят специальные исследования крови, мочи, кожи, мышц, сухожилий, истечений из глаз, молока, содержимого желудка и др. При лабораторных исследованиях ставят цель - обнаружить яйца, личинок, а иногда и самих гельминтов или их фрагменты. Исследования проводят планово или по мере необходимости.

3 Методы прижизненной диагностики гельминтозов

Гельминтоскопия (от греч. helmins - червь, scopeo - смотрю) применяется для выявления в исследуемом материале взрослых и юных гельминтов или их фрагментов. Они могут быть так же обнаружены в фекалиях (многие виды трематод, ленточные и круглые гельминты), бронхах (диктиокаулюсы), брюшной полости (сетарии), мочевом пузыре и лоханках почек (диоктофимы), полости сердца (дирофилярии и др.).

С целью обнаружения члеников имагинальных цестод осматривают свежие фекалии жвачных, плотоядных и птиц. Если гельминты достигли половой зрелости, то выделяются светло-серые или желтоватые членики, хорошо видимые на поверхности фекалий или в их толще. У плотоядных животных членики цестод из отряда тениата способны активно передвигаться во внешней среде, следовательно, необходимо осматривать свежевыделенные фекалии. Собранных гельминтов промывают в воде и фиксируют.

Гельминтоовоскопия (от лат. ovum - яйцо и греч. scopeo - смотрю) включает многие методы исследований, применяемых для выявления яиц гельминтов. В зависимости от вида гельминта и цели исследования пробы берут (от 10% поголовья) из прямой кишки животного. В отдельных случаях фекалии можно собирать в загоне или помещениях с пола. Помещают их в кульки из пергаментной бумаги, в целлофановые пакеты или небольшие баночки. В сопроводительном документе указывают хозяйство, ферму, вид животного, его возраст, цель исследования. При кишечных и легочных нематодозах откладывать исследования фекалий более чем на 18 ч (при температуре 16 - 36 °C) нельзя. Если же какие-либо причины не позволяют исследовать фекалии своевременно, то материал помещают в холодильник (температура 3 - 4 °C). Нередко для длительного хранения фекалии консервируют в химических консервантах (моющее средство «Лотос», Экстра, жидкость Барбагалло (3 %-ный раствор формалина в физиологическом растворе).

Метод нативного мазка. Наиболее прост, но наименее эффективен. Он заключается в том, что берут 2 - 3 кусочка фекалий (с горошину), помещают на

предметное стекло разбавляют 2 - 3 каплями воды или смеси глицерина с водой (1:1). Затем грубые частички удаляют, а осадок исследуют под микроскопоми выявляют яйца гельминтов (Рисунк 1,2,3).

От одного животного рекомендуется исследовать одновременно 2 - 3 пробы фекалий. Данный метод можно использовать при диагностике кишечных цестодозов и нематодозов.

Метод последовательного промывания (метод осаждения). Для исследования берут 3 - 5 г. Фекалии смешивают в фарфоровой ступке при помощи пестика с 10-кратным количеством воды и фильтруют через металлическое сито или марлю. Отстаивают в течение 10 мин, после чего слой жидкости сливают, а к осадку добавляют свежую порцию воды, и снова дают отстояться 6 - 8 мин. И так делают до тех пор, пока верхний слой жидкости не станет прозрачным. Затем жидкость сливают, а осадок микроскопируют на наличие яиц. Если фекалии мелкого рогатого скота сформированы в катышки и подсохли, то их следует растереть в ступке в небольшом объеме воды и после этого добавить требуемое количество воды.

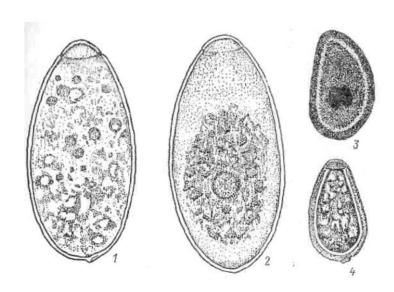


Рисунок 1. Яйца трематод: 1 – Fasciola hepatica;

2 – Paramphistomum sp.; 3 - Dicrocoelium lanceatum; 4 – Opisthorchis felineus.

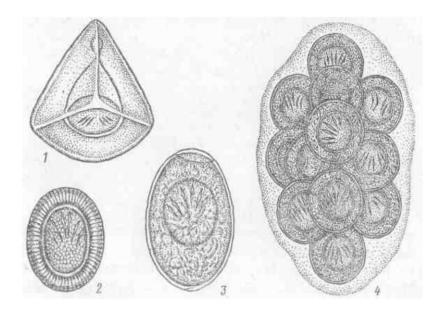


Рисунок 2. Яйца цестод: 1 – Moniezia; 2 – Taenia; 3 – Diphyllobotrium latum; 4 – кокон Dipilidium caninum.

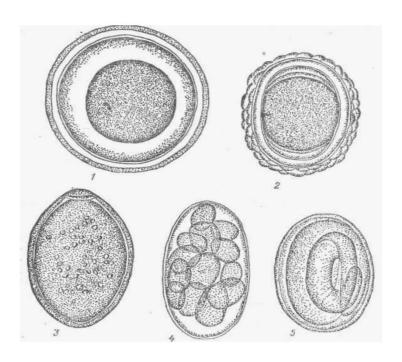


Рисунок 3. Яйца нематод: 1 - Parascaris eguorum; 2 - Ascaris suum; 3 - Oxyuris equi; 4 - Strongylidae sp.; 5 - Metastrongylus sp.

Метод флотации и его модификации. Этот метод основан на принципе флотации: всплывание вследствие низкой плотности яиц и личинок гельминтов на поверхность исследуемой взвеси при обработке пробы растворами различных солей. Для вылавливания всплывших яиц используют петлю из мягкой проволоки с диаметром кольца 8 - 10 мм. При меньшем диаметре затрудняется сбрасывание капли на предметное стекло, а при большем - пленка в кольце разрывается. Целесообразно брать с поверхности от 3 до 6 капель в зависимости от величины покровного стекла.

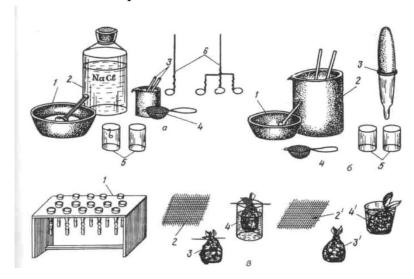


Рисунок 4. Оборудование для гельминтокопроскопических исследований:

- а методом флотации: 1 фарфоровая чашка с пестиком; 2 емкость с насыщенным раствором поваренной соли; 3 стаканчик для промывания стеклянных палочек; 4 металлическое ситечко; 5 химические стаканы; 6 проволочные петли;
- б методом последовательных смывов: 1 фарфоровая чашка с пестиком; 2 емкость для промывания стеклянных палочек; 3 пипетка; 4 металлическое ситечко; 5 химические стаканы;
- в методами гельминтоларвоскопии: 1 модифицированный аппарат Бермана (по И А. Щербовичу); 2 марля; 3 марлевый сверток с фекалиями; 4 марлевый сверток, свободно лежащий в воде (2', 3', 4' по В. И. Шильникову).

В настоящее время для флотации предложено большое количество насыщенных растворов солей: хлорид натрия (поваренная соль) плотностью 1,18 - 1,20 (400 г. на 1 л воды), нитрат аммония (гранулированная или химически чистая аммиачная селитра) плотностью 1,3 (1500 г на 1 л воды) и другие растворы.

Метод Фюллеборна. 5 - 8 г (можно 10 - 20 г) фекалий помещают в фарфоровую ступку и заливают небольшим количеством насыщенного раствора поваренной соли, который готовят путем кипячения соли в ведре воды до тех пор, пока соль не перестанет растворяться (из расчета 400 г соли на 1 л воды). После тщательного растирания фекалий в смесь добавляют 150 - 200 мл раствора и процеживают через сито в сухой и чистый стакан, размешивая стеклянной палочкой. Взвесь отстаивают 10 - 15 мин. Затем с поверхности отстоявшейся жидкости с помощью петельки снимают пленку, переносят ее на предметное стекло для микроскопирования (Рисунок 4).

Метод Дарлинга. Этот метод сочетает процедуры осаждения и флотации. Вначале проводят обычные последовательные смывы. Затем осадок 2 -3 мин центрифугируют при 3 - 4 тыс. об /мин. Верхний слой жидкости сливают, а к осадку добавляют смесь равных частей насыщенного раствора поваренной соли и глицерина. Применяют при диагностике кишечных нематодо- зов.

Метод соскоба с перианальных складок. Представители подотряда оксиурата откладывают яйца при выходе из кишечника вокруг ануса животного, поэтому для установления зараженности животных достаточно исследовать соскобы с этой области. Для этой цели берут спичку или тонкую деревянную палочку, один конец смачивают смесью глицерина и воды (1:1) и делают соскоб из перианальных складок или собирают высохшие пленки вокруг ануса. Материал помещают на предметное стекло в капли той же жидкости и микроскопируют.

Гельминтоларвоскопия (от лат. larva - личинка) - это комплекс приемов и исследований проб фекалий, тканей и органов с целью обнаружения личинок и установления по ним возбудителей болезни. Данный метод может быть применен для диагностики тех гельминтозов, при которых в организме животных паразитируют личинки (личинки аскарид в легких при остром аскаридозе, личинки стронгилят в подслизистой кишечника и желудка), микроонхоцерки (в коже у крупного рогатого скота) либо выделяются наружу с фекалиями (при диктиокаулезе и мюллериозе), слезой (при телязиозе), молоком (при стронгилоидозе, неоаскаридозе). Принцип заключается в том, что личинки

нематод, обладая свойством термотаксиса, в теплой воде (37 - 38 °C) быстрее освобождаются из толщи фекалий или ткани и падают на дно посуды.

Метод Бермана и Орлова применяют для диагностики легочных и кишечных (после выхода из яиц) нематодозов. Для этого пробы фекалий (10 - 20 г) помещают на сетку или марлю, нетуго натянутую на верхний край воронки, которая прикрепляется к штативу. На конец воронки надевают резиновую трубку с пробиркой. Затем в воронку наливают воду (37 - 38 °C) так, чтобы масса фекалий находилась в воде, и оставляют при комнатной температуре на 3 - 6 ч (фекалии овец) и на 6 - 12 ч (фекалии лошадей и крупного рогатого скота). По истечении времени резиновую трубку осторожно отсоединяют от воронки, сливают воду из каждой пробирки до осадка, а осадок микроскопируют.

В нашей стране все шире используют упрощенные модификации метода Бермана (по И. А. Щербовичу и В. И. Шильникову). 5- 10 г фекалий овец завертывают в кусочки марли и раскладывают или подвешивают в конусовидные стаканчики (50 мл) с теплой водой (35 - 38 °C) на 6 ч (фекалии крупного рогатого скота - на 12 ч). Затем марлю с содержимым удаляют, а воду осторожно сливают до осадка. Осадок можно отцентрифугировать или перенести его полностью на предметное стекло для микроскопирования.

Специальные диагностические исследования. Эти исследования в гельминтологической практике применяются значительно реже.

Исследование мочи. С мочой животных яйца выделяются при немногих гельминтозах. Однако они занимают определенное место в работе ветспециалистов. Так, можно обнаружить диоктофимы в лоханке почек собаки, свиньи, норки, куницы, пумы; капиллярии - в мочевом пузыре собаки, енотовидной собаки, песца, соболя, норки, лисицы и куницы. Ориентобильхарции и шистосомы (трематоды) паразитируют в кровеносных сосудах животных и человека, яйца этих паразитов выделяются с мочой.

Мочу для исследования берут катетером или общепринятыми методами. Ее сначала осматривают макроскопически, так как в ней могут быть гельминты. Для обнаружения яиц мочу разводят водой в соотношении 1:1 и центрифугируют 2 - 3 мин при 1000 - 1500 об/мин. Верхний слой осторожно сливают, а осадок микроскопируют.

Исследование крови. Сетарии и парафилярии паразитируют у лошадей и крупного рогатого скота в брюшной полости или подкожной клетчатке, дирофилярии - в крови (в желудочках сердца) плотоядных и т.д. Следовательно, яйца или личинки этих гельминтов можно обнаружить в крови. При исследовании на сетариозы кровь желательно брать рано утром или ночью. Для диагностики сетариоза и дирофиляриоза берут венозную и периферическую кровь (из кончика уха), дипеталонемоза и парафиляриоза - периферическую кровь.

Из многих методик исследования крови наиболее просты и эффективны следующие:

- 1. Венозную кровь (2 -3 мл) берут с гепарином и другими антикоагуляционными средствами, центрифугируют 8 10 мин при 1500—2000 об/мин. верхний слой сливают, а осадок разводят физраствором (1:1) и микроскопируют.
- 2. Кровь разводят в соотношении 1:5 или 1:10 дистиллированной водой (для гемолиза), центрифугируют, осадок микроскопируют.

При парафиляриозах («сечение») яйца и личинки паразита обнаруживают путем исследования выделившейся на кожу крови. Для этого берут каплю крови, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Исследование молока для выявления личинок нематод. При некоторых гельминтозах у лактирующих животных личинки выделяются с молоком, например личинки стронгилоидесов - у лошадей, свиней, крупного рогатого скота, овец, неоаскариса - у крупного рогатого скота, овец, токсокары - у собак и других плотоядных.

Для обнаружения личинок гельминтов свежевыдоенное молоко разбавляют 1:1 дистиллированной водой и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Затем надосадочную жидкость сливают, а осадок исследуют. Для этого в него добавляют насыщенный раствор нитрата натрия, смешивают и через 15 мин проволочной петлей снимают несколько капель и микроскопируют.

Исследование проб кожи для выявления личинок нематод. Личинки многих видов нематод паразитируют в сосудах кожи различных животных. Поэтому для обнаружения личинок при жизни животных исследуют кусочки кожи, полученные с отдельных участков тела в различные сезоны года.

Для обнаружения микроонхоцерков (личинок) в коже крупного рогатого скота следует учитывать сезон года, места их наибольшего скопления (локализации) и возрастные особенности животных. Микрофилярий обнаруживают в коже пупка, вымени, уха, холки и конечностей, но чаще всего их выявляют в первых двух участках.

Для исследования берут кусочек кожи размером с небольшую горошину при помощи ножниц Купера (с учетом условий асептики и антисептики). Наиболее приемлем метод Н.П. Кивако, при котором берут кожу толщиной 3,5 мм (150 мг), используя щипцы конструкции автора метода (Рисунок 5).

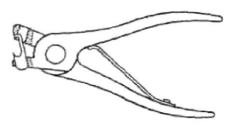


Рисунок 5. Щипцы для взятия проб кожи (по Кивако).

Во всех случаях ранку смазывают настойкой йода, а пробу помещают в пробирку с 2 мл физраствора и выдерживают при 37 °С в течение 1 ч. Жидкость центрифугируют 5 мин при 1500 об /мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок микроскопируют.

Для выявления личинок возбудителя онхоцеркоза у *пошадей* пользуются методикой Р. С. Чеботарева. В области холки, плеча или передней конечности выбривают шерсть, кожу дезинфицируют и срезают ножницами слой толщиной 3 - 4 мм и площадью 15 - 30 мм. Дальнейшие исследования идентичны исследованиям кожи крупного рогатого скота.

Диагностическая дегельминтизация. С целью ранней диагностики гельминтозов, когда возбудители не достигли половой зрелости, небольшой группе животных (15 - 20) в отаре овец или на ферме крупного ро гатого скота

назначают антгельминтик. Животных на 12 - 24 ч изолируют и за это время исследуют их фекалии с помощью метода гельминтоскопии. Как правило, у плотоядных и птиц гельминты начинают отходить через 5 - 6 ч, у овец и крупного рогатого скота - через 12 - 18 ч. Чаще всего данный метод диагностики применяют при кишечных цестодозах и аскаридатозах животных, так как крупные гельминты легко обнаруживаются.

4. Методы посмертной диагностики гельминтозов

Гельминты паразитируют фактически во всех органах и тканях животных, в том числе птиц и рыб различных видов. Посмертная диагностика гельминтозов заключается в гельминтологических вскрытиях животного или его отдельных органов и обнаружении гельминтов в различных стадиях развития. Разработаны полное гельминтологическое и неполное гельминтологическое вскрытия по К. И. Скрябину.

Полное гельминтологическое вскрытие в основном применяют при научно-исследовательских разработках, когда после снятия кожи начинают тщательный осмотр трупа с подкожной клетчатки, затем вскрывают грудную и брюшную полости, далее извлекают каждый орган в отдельности. Органы вскрывают в просторной посуде с водой, визуально или под лупой осматривают содержимое, слизистые и глубже лежащие слои (иногда просматривают и под микроскопом). Собранных гельминтов фиксируют и этикетируют с указанием вида животного, его возраста, органа, места локализации и т.д. Кожу фиксируют в формалине, а кровь собирают в отдельную посуду для последующего изучения.

Полное гельминтологическое вскрытие отдельных органов применяют для точного установления места расположения гельминтов, определения интенсивности заражения органа, его различных слоев.

Неполное *гельминтологическое вскрытие* чаще всего на прак тике используют для постановки диагноза, сбора гельминтофауны для учебных

целей и пополнения музейных экспонатов. Из органов и тканей извлекают только отдельных гельминтов.

Трихинеллоскопия. Проводится после убоя животного методом компрессорной трихинеллоскопии мышечной ткани свиней. От каждой свиной туши берут две пробы по 60 г из ножек диафрагмы или из межреберных мышц. Из каждой пробы изогнутыми ножницами делают 24 среза мышц величиной с овсяное зерно. Каждый срез кладут на нижнюю стеклянную пластинку компрессория, покрывают другим стеклом и сжимают винтами так, чтобы через расплющенные срезы можно было читать газетный текст. В таком виде срезы рассматривают под малым увеличением микроскопа или под трихинеллоскопом с целью обнаружения личинок возбудителя (обычно инкапсулированных). Капсула имеет округлую, овальную или лимоновидную форму, более или менее одинаковой величины - длиной 0,68 мм и шириной 0,37 мм. Как правило, в одной капсуле находится одна личинка, реже - две, свернутые в спираль (Рисунок 6).

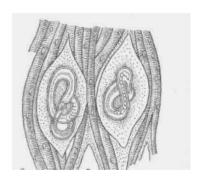


Рисунок 6. Trichinella spiralis - личинки трихинелл в мышечных волокнах.

Довольно часто встречаются личинки с обызвествленными капсулами. Для их просветления срезы помещают на 1 - 2 ч в 10 %-ный раствор соляной кислоты, а затем исследуют в капле глицерина. Однако более эффективен ускоренный метод переваривания мышц в искусственном желудочном соке по П.А. Владимировой. Пробу мышц 10 г измельчают в мясорубке, опускают в стаканчик или банку, заливают 250 мл искусственного желудочного сока (пепсин медицинский - 3 г, соляная кислота -1 г, вода - 100 мл), тщательно перемешивают и ставят в термостат при 42 - 47 °С. Через 4 - 5 ч верхний слой

осторожно сливают, а осадок наносят на предметные стекла тонким слоем и исследуют под микроскопом. В настоящее время на мясокомбинатах применяют метод исследования свинины на трихинеллез путем переваривания проб мышц из ножек диафрагмы (от 20 или 100 туш свиней одновременно) в искусственном желудочном соке с помощью аппарата для выделения личинок трихинелл.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

- 1. В чем суть прижизненных и посмертных методов диагностики гельминтозов?
- 2. Каковы условия проведения гельминтокопроскопических исследований?
- 3. В чем состоит принцип флотационных методов исследования фекалий?
- 4. При каких гельминтозах показаны специальные диагностические исследования?
- 5. В чем различие полного и неполного гельминтологического вскрытия?
- 6. Как оформляется сопроводительный документ на патологический материал для отправки в лабораторию?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИМ СПИСОК

3. Дюльгер, Г.П. Основы ветеринарии[Электронный ресурс]: учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по направ-лению подготовки 111100— «Зоотехния» (квалификация (степень) «бакалавр» и «магистр») / Г.П. Дюльгер, Г.П. Табаков. - СПб: Лань, 2013. - 480с. - Режим доступа: http://e.lanbook.com/view/book/12972/

- 4. Основы ветеринарии [Текст] : учебник для студ. вузов по спец. 310700 "Зоотехния" / И. М. Беляков, Ф. И. Василевич, А. В. Жаров [и др.]. М. : КолосС, 2004. 560 с.
- 5. Основы ветеринарии [Текст] : учебник для студ. вузов, обуч. по спец. 110401 "Зоотехния" / В. К. Кретинин [и др.] ; Международная ассоциация "Агрообразование". М. : КолосС, 2006. 383 с.
- 6. Паразитология и инвазионные болезни животных [Текст] : учебник для студ. вузов по спец. 310800 "Ветеринария" / М. Ш. Акбаев [и др.] ; под ред. М. Ш. Акбаева. 2-е изд., испр. М. : Колос, 2000. 744 с. :
- 7. Практикум по диагностике инвазионных болезней животных [Текст]: учеб. пособие для студ. вузов, обуч. по спец. 110501 "Ветеринарно- санитарная экспертиза" и 111201 "Ветеринария" / М. Ш. Акбаев [и др.]; под ред. М. Ш. Акбаева; Международная ассоциация "Агрообразование". М.: КолосС, 2006. 535 с.
- 8. Практикум по основам ветеринарии [Текст] : учеб. пособие для студ. вузов по спец. 310700 "Зоотехния" / А. В. Коробов [и др.] ; под ред. А. В. Коробова, В. Т. Кумкова. М. : КолосС, 2004. 200 с
- 9. Справочник ветеринарного врача [Текст] / [Ч. К. Авылов [и др.]] ; сост. А. А. Кунаков. М. : КолосС, 2006. 735 с.