
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ**



**НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

ГОСТ Р

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ
Методы лабораторной диагностики паразитозов

Издание официальное

**Москва
Стандартинформ
2019**

ГОСТ Р

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН «Всероссийским научно-исследовательским институтом фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко (ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (www.gost.ru)

© Стандартинформ, 2019

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

II

ГОСТ Р

Содержание

1 Область применения.....	
2 Нормативные ссылки.....	
3 Термины и определения.....	
4 Общие положения.....	
5 Требования безопасности.....	
6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы.....	
7 Отбор, хранение и транспортирование проб фекалий.....	
8. Приготовление растворов.....	
9 Методы определения наличия яиц и личинок гельминтов.....	
10 Гельминтоляроскопические методы диагностики нематодозов.....	
11 Методы определения количества яиц нематод, цестод и трематод в фекалиях.....	
12 Методы определения жизнеспособности яиц и личинок гельминтов.....	
13 Метод исследования соскобов из объектов внешней среды на наличие яиц гельминтов.....	
14 Метод установления интенсивности инвазии.....	
15 Исследования павшей птицы на наличие гельминтов и ооцист простейших.....	
16 Метод исследования почвы на наличие яиц гельминтов.....	
17 Методы гельминтологической оценки водоемов.....	
18 Метод исследования промежуточных хозяев нематод, цестод и трематод на зараженность.....	
19 Методы определения наличия ооцист паразитических простейших.....	
20 Методы определения количества ооцист простейших в помете и подстилке.....	
21 Методы определения жизнеспособности ооцист простейших.....	
22 Метод установления интенсивности инвазии.....	
23 Метод исследования почвы на наличие ооцист простейших.....	
Приложение А (справочное) Пример записи в журнале результатов гельминтологических исследований.....	

ГОСТ Р

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ

Методы лабораторной диагностики паразитозов

Agricultural bird

Methods of laboratory parasitology diagnostics

Дата введения –

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сельскохозяйственную птицу (далее – птица) и устанавливает методы лабораторной диагностики паразитозов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

- ГОСТ 2 Селитра аммиачная. Технические условия
- ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности
- ГОСТ 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования
- ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты
- ГОСТ 12.4.011 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация
- ГОСТ 244 Натрия тиосульфат кристаллический. Технические условия
- ГОСТ 490 Кислота молочная. Технические условия
- ГОСТ 1625 Формалин технический. Технические условия
- ГОСТ 1770 (ИСО 1042:83, ИСО 4788:80) Посуда мерная лабораторная стеклянная: цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
- ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия
- ГОСТ 3760 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия
- ГОСТ 4168 Реактивы. Натрий азотнокислый. Технические условия
- ГОСТ 4174 Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия
- ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
- ГОСТ 4236 Реактивы. Свинец (II) азотнокислый. Технические условия
- ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия
- ГОСТ 4523 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия
- ГОСТ 4529 Реактивы. Цинк хлористый. Технические условия
- ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия
- ГОСТ 5789 Реактивы. Толуол. Технические условия
- ГОСТ 6259 Реактивы. Глицерин. Технические условия
- ГОСТ 6672 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия
- ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия
- ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия
- ГОСТ 9284 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия
- ГОСТ 9412 Марля медицинская. Общие технические условия
- ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
- ГОСТ 14702 Селитра аммиачная водоустойчивая. Технические условия
- ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия
- ГОСТ 183000 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия
- ГОСТ 18481 Ареометры и цилиндры стеклянные. Общие технические условия
- ГОСТ 19126 Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия
- ГОСТ 21239 Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний
- ГОСТ 23932 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия
- ГОСТ 22867 Реактивы. Аммоний азотнокислый. Технические условия

ГОСТ Р

ГОСТ 24363–80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 28498 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические условия. Методы испытаний

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные.

Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р 51652 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 54001 Удобрения органические. Методы гельминтологического анализа

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **инвазия**: Проникновение в организм животного паразитов (гельминтов) с последующим развитием сложного патофизиологического процесса их взаимодействия.

3.2 **интенсивность инвазии**: Общее число яиц, личинок гельминтов и ооцист простейших, обнаруженных у обследованного животного, выраженное в экземплярах.

3.3 **экстенсивность инвазии**: Отношение числа зараженных животных к общему поголовью обследованных разного возраста и вида, выраженное в процентах.

3.4 **гельминтозы**: Паразитарные болезни животных, вызываемые гельминтами – паразитическими червями.

3.4.1 **нематодозы**: Болезни, вызываемые круглыми гельминтами, относящими к классу нематода (Nematoda).

3.4.2 **цестодозы**: Болезни, вызываемые ленточными гельминтами, относящими к классу цестода (Cestoda).

3.4.3 **трематодозы**: Болезни, вызываемые плоскими гельминтами, относящими к классу трематода (Trematoda).

3.5 **протозоозы**: Болезни, вызываемые паразитическими простейшими, относящимися к классу Coccidea.

4 Общие положения

4.1 Лабораторную диагностику паразитозов птиц проводят по показателям:

- экстенсивности инвазии;

- интенсивности инвазии;

- числа жизнеспособных яиц гельминтов и ооцист простейших определенных видов в количественном или процентном отношении к общему числу обнаруженных.

4.2 Жизнеспособность обнаруженных яиц гельминтов и ооцист простейших определяют и подтверждают в соответствии с требованиями настоящего стандарта.

4.3 По числу обнаруженных яиц гельминтов и ооцист простейших интенсивность инвазии у птиц классифицируют в соответствии с таблицей 1.

Т а б л и ц а 1

Класс гельминтов и простейших	Интенсивность инвазии в зависимости от числа обнаруженных яиц гельминтов и ооцист простейших, экз./1 г фекалий			
	Низкая	Средняя	Высокая	Очень высокая
Нематоды, цестоды	1 — 100	101 — 500	501 — 1000	Св. 1000
Трематоды	1 — 10	11 — 100	Св. 101	—
Кокцидии	до 5000	6000 - 15000	16000 - 50000	свыше 100000

ГОСТ Р

5 Требования безопасности

5.1 Сотрудники, выполняющие работу по отбору, доставке и анализу проб, должны иметь рабочую спецодежду: халаты, фартуки, перчатки, резиновую обувь по ГОСТ 12.4.011. Рабочие халаты подлежат обмену на чистые по истечении каждой рабочей недели. Спецодежду и обувь хранят в шкафах.

Сотрудники должны быть обеспечены средствами и условиями для личной гигиены и обязаны соблюдать санитарно-гигиенические требования.

5.2 Требования безопасности при работе с химическими реактивами – по ГОСТ 12.1.007, с электрооборудованием – по ГОСТ Р 12.1.019.

Требования пожарной безопасности – по ГОСТ 12.1.018.

5.3 Помещение, в котором проводят исследования, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Работы необходимо проводить в вытяжном шкафу с применением резиновых перчаток.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы

Шкаф вытяжной.

Холодильник эклектический бытовой, любого класса, позволяющий поддерживать температуру от минус 6 °С до плюс 5 °С, по техническим характеристикам и условиям эксплуатации соответствующий требованиям ГОСТ 16317.

Термостат электрический, позволяющий поддерживать температуру от 50 °С до 60 °С с допустимой погрешностью $\pm 0,4$ °С.

Центрифуга напольная с частотой вращения 1500–2500 об/мин.

Микроскоп биологический, предназначенный для исследования прозрачных препаратов в проходящем свете в светлом поле, обеспечивающий 100 и 400-кратное увеличение.

Осветитель к микроскопу.

Столик нагревательный к микроскопу (столик Морозова).

Весы лабораторные с пределами допустимой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 5 мг и ± 10 мг.

Пинцеты анатомические.

Пинцеты хирургические.

Набор ареометров АОН-1 типа 1 (А1) с пределами измерений от 1,000 до 1,600 кг/см³ по ГОСТ 18481.

Сита почвенные с размером диаметра ячеек 0,5, 0,25 и 0,3 мм².

Стаканы пластмассовые вместимостью 30 см³.

Петли металлические паразитологические с диаметром восемь–девять мм.

Штатив для пробирок лабораторный.

Кюветы эмалированные.

Кюветы почковидные.

Спиртовка СЛ-1 по ГОСТ 25336.

Камеры счетные Горяева, ВИГИС.

Часы песочные на три–пять мин или сигнальные.

Шпатели пластмассовые и металлические по ГОСТ 19126.

Ножницы анатомические.

Ножницы хирургические по ГОСТ 21239.

Прибор для уравнивания центрифужных пробирок вместимостью 10–100 см³.

Прибор вакуумного фильтрования.

Пробоотборник А.А. Черепанова.

Термометры технические стеклянные с пределом измерения температуры от 0 °С до 100 °С и от 100 °С до 200 °С по ГОСТ 28498.

Совки, портативные лопаты, пробоотборники.

рН-метр, обеспечивающий измерения с погрешностью не более 0,01 ед. рН.

Дозаторы пипеточные.

Шкаф сушильный лабораторный, обеспечивающий поддержание температуры от 0 °С до 105 °С с допустимой погрешностью ± 2 °С.

Карандаши по стеклу (стеклографы).

Груши резиновые разных размеров.

Перчатки резиновые.

Фартук клеенчатый.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Бумага пергаментная.

ГОСТ Р

Емкости для отбора проб воды, органических удобрений, навоза, навозных стоков, осадков, пригодные для обеззараживания из нейтральных материалов, канистры, ведра вместимостью 80 дм³, тазы.

Клеенка, полиэтиленовые пленка, пакеты, мешки.

Вата медицинская по ГОСТ 5556.

Марля медицинская по ГОСТ 9412.

Стекла предметные размерами 25 x 75, 60 x 120 мм по ГОСТ 9284.

Стекла покровные размерами 18 x 18 мм, 24 x 24 мм по ГОСТ 6672.

Чашки биологические Петри по ГОСТ 25336.

Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 400 и 1000 см³ по ГОСТ 25336.

Чашки выпарные плоскодонные сферические вместимостью 1000 и 2500 см³ по ГОСТ 25336.

Пипетки градуированные вместимостью 1–10 см³ и 50 см³ по ГОСТ 29227.

Пипетки глазные.

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

Цилиндры измерительные с носиком вместимостью 1,25 и 500 см³ по ГОСТ 1770.

Колбы конические вместимостью 50, 100 и 1000 см³ по ГОСТ 1770.

Стекла часовые разных размеров по ГОСТ 23932.

Цилиндры градуированные с носиком на 100, 200, 500 и 1000 см³ по ГОСТ 1770.

Палочки стеклянные.

Банки стеклянные с притертыми пробками вместимостью (до 1000 см³).

Ступки и пестики фарфоровые разных размеров по ГОСТ 9147.

Эксикаторы с притертой крышкой.

Стаканы стеклянные высокие с носиком (ВН) вместимостью 50, 100 см³ по ГОСТ 1770.

Стаканы аптечные вместимостью 50 и 100 см³.

Пробирки центрифужные градуированные (ПЦГ) вместимостью 10 см³ по ГОСТ 1770.

Кристаллизаторы стеклянные.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Натрий хлористый, х. ч. на изотоническом растворе с массовой долей 0,85 % (жидкость Барбагалло).

Натрий азотнокислый по ГОСТ 4168.

Аммоний азотнокислый по ГОСТ 22867 или гранулированная аммиачная селитра по ГОСТ 2.

Цинк хлористый по ГОСТ 4529.

Свинец азотнокислый по ГОСТ 4236.

Формальдегид 40 %-ный.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

Глицерин по ГОСТ 6259.

Аммиак.

Эфир этиловый (диэтиловый, серный).

Метиленовый синий, х. ч.

Карбол-фуксин

Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174.

Натрия тиосульфат по ГОСТ 244.

Толуол по ГОСТ 5789.

Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья по ГОСТ 5962.

Спирт метиловый по ГОСТ 6995.

Кислота молочная по ГОСТ 490.

Индикаторы бумажные для определения pH в диапазоне шесть–восемь с интервалом деления 0,2.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов, по качеству не ниже вышеуказанных.

7. Отбор, хранение и транспортирование проб фекалий

7.1. Точечные пробы отбирают из фекалий птиц, патологического материала, соскобов объектов внешней среды, промежуточных хозяев гельминтов.

7.2 Точечные пробы фекалий берут от живой и павшей птицы.

7.3 Точечные пробы фекалий от живой птицы берут из прямой кишки (5 г) или только что выделившегося испражнения. В последнем случае берут верхнюю часть фекалий, не соприкасающуюся с полом или подстилкой.

ГОСТ Р

Руки после взятия точечной пробы тщательно моют, чтобы не занести яйца гельминтов и ооцисты простейших из фекалий инвазированной птицы.

Точечные пробы в условиях промышленных птицеводческих хозяйств, когда в одном птичнике содержится 32 – 35 тысяч голов, берут от 0,2 – 0,3 % поголовья, но не менее чем от 50 птиц каждой возрастной группы. От племенного поголовья и особо ценной птицы точечные пробы берут от каждой особи.

7.4 Точечные пробы фекалий от павшей птицы берут из прямой кишки в количестве, указанном в 7.3.

7.5 Отобранные точечные пробы фекалий упаковывают в герметичный сосуд - пластиковые контейнеры, помещают в полиэтиленовый пакет и ставят номер точечной пробы.

Отобранные точечные пробы доставляют в лабораторию в течение суток со времени взятия, консервируют 2,5 %-ным раствором бихромата калия и хранят до проведения исследований в холодильнике при температуре 2°C — 4 °C для задержки развития личинок нематод.

7.6 Точечные пробы патологического материала отбирают при вскрытии павшей или вынуждено убитой птицы.

При отборе точечных проб учитывают характерные патологоанатомические изменения и берут части кишечника, паренхиматозных органов, которые консервируют бихроматом калия. Для гистологических исследований точечные пробы хранят в 10 %-ном растворе формальдегида.

7.7 Для определения загрязненности объектов внешней среды яйцами гельминтов и ооцистами кокцидий, берут совочком или шпателем пробы помета из разных участков пола, соскобы из пола, стен и технологического оборудования, а также пробы почвы вблизи птичников и придерживаются при этом следующих указаний. Из птичника параметрами 96 м x 18 м x 3 м перед сдачей птиц на убой отбирают в отдельные пакеты из разных участков пола по диагонали через равные промежутки по 10 проб помета массой 3-5г каждая слева направо и справа налево, всего 20 проб. Каждую пробу упаковывают в отдельные чистые пронумерованные пакеты или пластиковые контейнеры. Партию однотипных проб помещают в более крупные пакеты. В сопроводительной прилагают опись с полной расшифровкой. По отмеченной схеме по диагонали через равные промежутки берут 10 проб подстилки из разных глубин (5; 10 и 15 см). При исследовании проб подстилки кроме яиц гельминтов, ооцист кокцидий часто выделяют подстилочных жуков, клещей, их яиц и личинок.

7.7.1 После уборки помета и подстилки из птичников для оценки остаточного загрязнения инвазионными элементами кокцидий, гельминтов, насекомых и клещей отбирают шпателем и кисточкой в пакеты из разных мест пола по диагонали через равные промежутки по 10 соскобов по направлениям массой 2 – 3 г каждый из содержимого пола особенно стыков, трещин и неровностей, всего 20 проб.

7.7.2 Стены птичников при напольном содержании наиболее часто бывают загрязнены инвазионными элементами на высоте до одного метра. Исходя из отмеченного, соскобы из стен берут из разных мест на высоте 20; 40; 60; 80 и 100 см от пола, всего 10 проб.

7.7.3 Из имеющегося в птичниках технологического оборудования: трубы кормораздатчика, водопровод, газовая труба, вентиляция можно брать соскобы осевшей пыли, других осадков по 5 – 10 из каждого вида оборудования и направить на обследование для оценки загрязненности инвазионными элементами.

7.7.4 Представляет определенный интерес обсемененность оставшегося в птичнике после сдачи птицы корма и воды в поилках. Для выяснения данного вопроса можно взять и направить для обследования на наличие ооцист кокцидий и яиц гельминтов 5 – 10 проб корма из кормушек (по 50 г) и воды из поилок (в пробирках по 10 мл).

7.8 Для определения зараженности промежуточных хозяев личинками нематод, цестод и трематод в летние месяцы в местностях, неблагополучных по гельминтозам, из разных мест отбирают 10—20 экземпляров моллюсков, мух, водных беспозвоночных, стрекоз. Отобранные точечные пробы помещают в пробирки, закрывают пробками и доставляют в лабораторию в день отбора.

7.9 Отправляемые в лабораторию пробы снабжают сопроводительным документом, в котором указывают:

- хозяйство (отделение, цех, участок);
- число птиц в птичнике и на площадке;
- систему содержания птиц;
- возраст и пол птиц;
- категорию упитанности птиц;
- заболеваемость и смертность птиц;
- продолжительность заболевания птиц;
- на наличие какого гельминтоза и протозооза проводят исследование;
- дату отбора проб и отправления на исследование;

ГОСТ Р

- фамилию с инициалами и подпись ветеринарного врача.

Все отобранные пробы, направляемые в лабораторию для исследований, транспортируют в ящиках, имеющих гнезда для стандартной посуды.

7.10 Из лабораторных проб отбирают анализируемые пробы фекалий массой 1 – 3 г для проведения исследований методом овоскопии.

7.2 Отбор и подготовка проб почвы

Точечные пробы с поверхности почвы (с глубины 1—3 см) берут из затененных и освещенных солнцем участков шпателем, а с глубины до 20 см — лопаточкой или буром. С каждого обследуемого участка одновременно по диагонали отбирают три — пять точечных проб по 100 г каждая.

Из точечных проб, взятых с одного участка на одной глубине, путем перемешивания получают объединенную пробу.

Из объединенной пробы получают лабораторные пробы массой 50 – 100 г.

Лабораторные пробы помещают в банки с крышкой или целлофановые пакеты. Каждая проба должна иметь этикетку с указанием места отбора, даты, глубины, характера исследуемого участка (в тени или под солнцем, состав почвы, наличие растительности и другие). В лаборатории пробы помещают в холодильник или каждую из них пересыпают в кристаллизатор, заливают жидкостью Барбагалло.

В холодильнике почву хранят не более одного месяца при температуре 4 °С, периодически аэрируя и увлажняя ее.

8 Приготовление растворов

8.1 Приготовление флотационных растворов

Наибольшей флотационной способностью обладают растворы солей при температуре 20°С–22°С. Плотность растворов определяют ареометрами по ГОСТ 18481. Правильность приготовленных растворов определяют также по образованию кристаллической пленки на поверхности раствора и выпадению кристаллов на дно сосуда.

8.1.1 Приготовление насыщенного раствора хлористого натрия плотностью 1,18-1,19 г/см³

420 г хлористого натрия по ГОСТ 4233 растворяют в 1 дм³ кипящей дистиллированной воды. Затем раствор охлаждают и фильтруют через воронку с ватой или двуслойной марлей в чистую стеклянную посуду. Ареометром проверяют плотность раствора, которая должна быть 1,18-1,19 г/см³.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

8.1.2 Приготовление раствора нитрата аммония плотностью 1,28-1,29 г/см³

1500 г нитрата аммония по ГОСТ 22867 или аммиачной селитры по ГОСТ 2 растворяют в 1 дм³ горячей дистиллированной воды по ГОСТ 6709 в эмалированной посуде при постоянном размешивании и подогревании.

Затем раствор охлаждают и фильтруют в чистую посуду. Ареометром проверяют плотность раствора, которая должна быть 1,28-1,29 г/см³.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

8.1.3 Приготовление раствора сульфата магния плотностью 1,28-1,29 г/см³

920 г сульфата магния по ГОСТ 4523 растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды и остужают.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

8.1.4 Приготовление смеси хлористого натрия и нитрата аммония плотностью 1,27-1,28 г/см³

250 г хлористого натрия по ГОСТ 4233 и 550 г нитрата аммония по ГОСТ 4523 растворяют в 1 дм³ кипящей дистиллированной воды.

Остывший раствор фильтруют в чистую посуду, ареометром проверяют плотность, которая должна быть 1,27-1,28 г/см³.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

8.1.5 Приготовление смеси азотнокислого натрия и магния серноокислого плотностью 1,27-1,28 г/см³

500 г азотнокислого натрия по ГОСТ 4168 и 960 г магния серноокислого по ГОСТ 4523 растворяют в 1 дм³ кипящей дистиллированной воды.

Остывший раствор фильтруют в чистую посуду, ареометром проверяют плотность, которая должна быть 1,27-1,28 г/см³.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

8.1.6 Приготовление раствора серноокислого цинка плотностью 1,24 г/см³

ГОСТ Р

400 г сернокислого цинка по ГОСТ 4147 растворяют в 1 дм³ горячей дистиллированной воды по ГОСТ 6709 в эмалированной посуде при постоянном размешивании и подогревании. Через 24 ч раствор может дать осадок, и его плотность понизится.

Раствор готовят непосредственно перед определением.

8.1.7 Приготовление комбинированного раствора магния сернокислого и тиосульфата магния плотностью 1,4 г/см³

1000 г магния сернокислого по ГОСТ 4523 растворяют в 1 дм³ кипящей дистиллированной воды. Через сутки остывший раствор фильтруют в чистую посуду. 2000 г натрия тиосульфата по ГОСТ 244 растворяют в 1 дм³ кипящей дистиллированной воды и также через сутки фильтруют в чистую посуду. Три части первого раствора смешивают с тремя частями второго и добавляют одну часть воды. Раствор смешивают еще раз и ареометром проверяют плотность, которая должна быть 1,4 г/см³.

9 Методы определения наличия яиц и личинок гельминтов

9.1 Флотационные методы

9.1.1 Сущность методов

Флотационные методы основаны на определении наличия яиц нематод, цестод, некоторых трематод, личиночных стадий паразитических и свободноживущих нематод, а также члеников и половозрелых форм, всплывающих на поверхность флотационного раствора с испытуемым материалом, с помощью микроскопа.

При определении наличия яиц нематод, цестод и трематод под микроскопом используют соответствующий атлас яиц гельминтов.

9.1.2 Метод Фюллеборна для диагностики нематодозов и цестодозов

Анализируемую пробу массой 1 г заливают в ступке 3—5 см³ насыщенного раствора хлористого натрия по 8.1.1, тщательно размешивают пестиком или стеклянной палочкой и по мере размешивания добавляют раствор, доводя объем до 15 см³. Затем процеживают через сито в чистый стакан и отстаивают в течение 40 мин. За время флотации яйца нематод и цестод, удельный вес которых меньше веса насыщенного раствора хлористого натрия, всплывают на поверхность и концентрируются на поверхностной пленке.

Затем, прикасаясь металлической петлей к разным местам поверхностной взвеси, снимают три капли раствора и наносят на предметное стекло, и исследуют под микроскопом. Для недопущения быстрого высыхания и кристаллизации капель на предметных стеклах к ним добавляют по небольшой капле 50 %-ного водного раствора глицерина.

Металлическую петлю обжигают над пламенем спиртовки в начале и конце испытаний. При массовых исследованиях каплю на предметном стекле покровным стеклом не накрывают, а металлическую петлю промывают резкими движениями в стаканчике с дистиллированной водой.

9.1.3 Метод Котельникова-Хренова для диагностики нематодозов и цестодозов

Исследование проводят с помощью флотационного раствора нитрата аммония по 8.1.2 с изменением времени отстаивания после фильтрования жидкости до 10—15 мин.

9.1.4 Комбинированный флотационный метод для диагностики нематодозов и цестодозов

Исследование проводят с помощью комбинированного флотационного раствора по 8.1.4 с изменением времени отстаивания после фильтрования жидкости до 10—15 мин.

9.1.5 Комбинированный флотационный метод Бреза для диагностики нематодозов и цестодозов

Анализируемую пробу массой 3 г заливают в ступки 10-15 см³ комбинированного раствора сернокислого магния и тиосульфата натрия по 8.1.7, растирают пестиком до однородного состояния, доливают раствор до 45-50 см³, размешивают стеклянной палочкой и процеживают через металлическое сито с отверстиями 0,3-0,5 мм в чистый стакан и отстаивают в течение 10-15 минут. Затем снимают легким прикосновением металлической петли диаметром 0,8 см 3 капли поверхностной взвеси из разных мест, переносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

9.2 Седиментационные методы диагностики трематодозов

9.2.1 Сущность методов

Седиментационные методы основаны на осаждении яиц гельминтов в процессе обработки проб фекалий дистиллированной водой или другими жидкостями и исследовании осадка.

Данные методы применяют для диагностики трематодозов, реже – других гельминтозов.

9.2.2 Метод последовательного промывания

Применяется для диагностики трематодозов (простогонимозы и плягиорхоз кур, нотокотилидозы и эхиностоматидозы уток и гусей).

ГОСТ Р

Анализируемую пробу фекалий массой 3 г помещают в стакан вместимостью 50 – 100 см³, вливают небольшое количество дистиллированной воды и палочкой размешивают до получения жидкой кашицеобразной массы, затем добавляют дистиллированную воду порциями до объема 50 см³ при постоянном размешивании.

Смесь фильтруют, пропуская через ситечко в другой стакан, и отстаивают в течение 5 мин до образования осадка, после чего верхний слой жидкости сливают до осадка, а к осадку добавляют снова такое же количество дистиллированной воды и отстаивают в течение 5 мин, после чего жидкость снова сливают до осадка.

Такие операции повторяют до тех пор, пока надосадочный слой воды не будет прозрачным. Последний раз верхний слой сливают или отбирают спринцовкой, опустив наконечник в стакан, не доводя до дна 1,5 – 2,0 см, а осадок поочередно разливают на часовые или предметные стекла и исследуют под микроскопом.

9.3 Комбинированные (седиментационно-флотационные) методы

9.3.1 Сущность методов

Комбинированные (седиментационно-флотационные) методы основаны на комбинации противоположных приемов обработки проб фекалий — седиментации и флотации, благодаря чему происходит обогащение осадка или поверхностной пленки яйцами гельминтов и удаление излишних посторонних частиц взвеси, которые значительно мешают исследованию.

Методы более трудоемкие, но при некоторых гельминтозах более информативны.

9.3.2 Приготовленную в ступке водную суспензию из 3 г фекалий птиц процеживают через сито в чистую стеклянную центрифужную пробирку емкостью 10-15 мл и центрифугируют частотой вращения 2000-3000 об/мин в течение 2-3 мин. После этого надосадочную жидкость осторожно сливают, а к осадку добавляют 10 см³ один из флотационных растворов: натрия хлористого (метод Дарлинга), магния сульфата (метод Щербовича), комбинированный раствор магния сульфата и тиосульфата натрия (метод Бреза), хорошо размешивают и снова центрифугируют в том же режиме. После чего металлической петлей снимают по 3 капли поверхностной взвеси из каждой пробирки, переносят на предметное стекло и препарат исследуют под микроскопом.

9.3.3 Метод Дарлинга

Анализируемую пробу массой 2 г заливают в ступке 5 см³ дистиллированной воды, тщательно размешивают, добавляя дистиллированную воду до 15 см³. Затем полученную взвесь процеживают через сито в стакан и отстаивают в течение 5 мин. После отстаивания верхний слой жидкости сливают, а на дне оставляют осадок с водой, который переносят в центрифужную пробирку.

Наполненные до одинакового уровня пробирки центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин в течение 2 мин. После чего жидкость из пробирок сливают, а к осадку добавляют 10 см³ флотационного раствора хлористого натрия, приготовленного по 8.1.1, тщательно перемешивают до получения взвеси и опять центрифугируют в течение 1 мин.

Затем металлической петлей снимают из каждой пробирки по три капли поверхностной взвеси, переносят на предметное стекло и препарат исследуют под микроскопом.

9.3.4 Метод Вишняускаса

Применяется для диагностики нематодозов, трематодозов и цестодозов.

Анализируемую пробу фекалий массой 3 г тщательно размешивают с 50 см³ дистиллированной воды в ступке, затем фильтруют через сито в стеклянную посуду вместимостью 100 см³. Ступку прополаскивают несколько раз 50 см³ дистиллированной воды, которой промывают фекальные массы на сите. 100 см³ полученного фильтрата отстаивают в течение 5 мин, затем верхний слой жидкости отбирают спринцовкой или осторожно сливают, оставляя на дне 20 см³ жидкости с осадком.

К жидкости с осадком добавляют 80 см³ дистиллированной воды и вновь отстаивают в течение 5 мин. После чего надосадочную жидкость отбирают спринцовкой или сливают, оставляя на дне 10 см³ жидкости, которую перемещают в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 1 мин при 1500 об/мин.

Затем верхний слой жидкости отбирают спринцовкой или сливают, оставляя только осадок. К осадку постепенно добавляют раствор сульфата цинка по 8.1.6 так, чтобы мениск жидкости образовался выше краев центрифужной пробирки. Центрифужную пробирку покрывают покровным стеклом так, чтобы жидкость всей своей поверхностью соприкасалась с покровным стеклом. Заблаговременно перед началом испытания края центрифужных пробирок шлифуют на бруске. Центрифугируют в течение 0,5 мин при 1500 об/мин.

Яйца гельминтов всплывают и прилипают к покровному стеклу. Покровное стекло с яйцами снимают и помещают на предметное стекло, предварительно нанеся одну каплю дистиллированной воды, и исследуют под микроскопом.

10 Гельминтоляровоскопические методы диагностики нематодозов

10.1 Сущность методов

ГОСТ Р

Методы гельминтолярвоскопии позволяют обнаружить в фекалиях личинок и определить по ним возбудителей гельминтозов. Анализируемые пробы свежих фекалий исследуют не позднее четырех часов после отбора.

10.2 Метод Бермана-Орлова для диагностики нематодозов

3 г анализируемой пробы помета птиц заворачивают в кусочек марли и помещают в воронку на металлическое сито. Предварительно в воронку наливают дихлорированную воду температурой 40 °С. Заполненный анализируемой пробой фекалий и дистиллированной водой аппарат Бермана оставляют при комнатной температуре на 3 ч.

Личинки нематод обладают термотропностью и благодаря этому перемещаются из анализируемой пробы фекалий в теплую воду и оседают на дно пробирки. Перед исследованием пробирки осторожно разъединяют с резиновой трубкой и быстрым движением, не встряхивая осадок на дне, сливают жидкость из пробирки до осадка. Так снимают все пробирки в аппарате и ставят их в штатив. Осадок разливают на часовые или предметные стекла и микроскопируют. При осмотре под микроскопом личинки нематод подвижные, и их легко найти.

11 Методы определения количества яиц нематод, цестод и трематод в фекалиях

11.1 Определение количества яиц нематод, цестод и трематод с помощью счетной камеры Горяева

1 г фекалий размешивают в ступке с 15 см³ дистиллированной воды и тщательно гомогенизируют. Полученную суспензию фильтруют через сито, 10 см³ фильтрата помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин в течение 2 мин. Затем жидкость из пробирки сливают, а к осадку добавляют 10 см³ флотационного раствора хлористого натрия, тщательно перемешивают и используют для заполнения счетной камеры Горяева.

При отсутствии счетной камеры используют предметное стекло, на которое наносят 0,15 см³ суспензии и накрывают покровным стеклом.

Заполненную камеру Горяева или предметное стекло выдерживают в течение 2 мин, чтобы яйца нематод могли подняться к поверхности, и под микроскопом подсчитывают количество яиц нематод. Полученное число, умноженное на 100, показывает содержание яиц нематод в 1 г фекалий. Для более точного определения количества яиц используют две – три камеры.

11.2 Определение количества яиц нематод, цестод и трематод с помощью счетной камеры ВИГИСа

1 г фекалий размешивают в ступке с 5 см³ флотационного раствора аммиачной селитры и тщательно перемешивают пестиком. По мере размешивания добавляют флотационный раствор и доводят до объема 15 см³. Взвесь фильтруют через ситечко в чистый стакан с последующим отжимом содержимого в ситечко и тщательным размешиванием взвеси. Затем пастеровской пипеткой быстро переносят 0,15 см³ взвеси в одну из ячеек счетной камеры и оставляют на 2 мин, после чего подсчитывают количество яиц нематод. При необходимости заполняют и другие ячейки взвесью пробы из того же стаканчика, но при этом каждый раз перед заполнением ячейки смесь перемешивают.

Подсчет яиц нематод в ячейке проводят с помощью микроскопа при искусственном освещении.

Для установления количества яиц в 1 г фекалий делают расчет по числу обнаруженных яиц в одной, двух или четырех ячейках. Для этого число яиц, выявленных в ячейке, умножают на 30, в двух ячейках — на 15, а в четырех — на 7,5.

12 Методы определения жизнеспособности яиц и личинок гельминтов

Определение жизнеспособности яиц и личинок гельминтов проводят по ГОСТ Р 54001 (раздел 8) по морфологии, окрашиванию, культивированию и осуществляют биопробу.

12.1 Метод световой микроскопии

Под большим увеличением микроскопа выявляют резко выраженные признаки гибели яиц гельминтов:

- деформация оболочек;
- вакуолизация плазмы зародыша;
- прогибание оболочек внутрь и их разрушение;
- их склеивание;
- отсутствие образования бластомеров.

13 Метод исследования соскобов из объектов внешней среды на наличие яиц гельминтов

ГОСТ Р

Анализируемую пробу массой 3 г переносят в стакан с 30 см³ дистиллированной воды, ставят в холодильник, выдерживают в течение 12 ч и гомогенизируют в течение 2 мин в электрическом гомогенизаторе с частотой вращения 2000 об/мин. Полученную суспензию фильтруют в течение 5 мин. Затем жидкую часть сливают, к осадку добавляют 10 см³ флотационного раствора хлористого натрия и тщательно перемешивают путем встряхивания. После чего готовой взвесью наполняют счетную камеру или помещают 0,15 см³ суспензии на предметное стекло, накрывают ее покровным стеклом, выдерживают в течение 2 мин и подсчитывают количество яиц нематод.

Для определения числа яиц нематод в 1 г анализируемой пробы подсчитанное число яиц нематод умножают на коэффициент 67.

Степень загрязненности объектов внешней среды и зараженности животных оценивают в соответствии с таблицей 2.

Т а б л и ц а 2

Число яиц нематод в 1 г анализируемой пробы	Степень загрязненности объекта внешней среды
Менее 500	Низкая
От 500 до 1000 включ.	Средняя
Св. 1000	Высокая

14 Метод установления интенсивности инвазии

Интенсивность инвазии устанавливают подсчетом числа яиц гельминтов в трех каплях анализируемой пробы массой 1 г при микроскопии и делением полученного числа на 3 в соответствии с таблицей 1.

Полученное число показывает ориентировочную интенсивность гельминтозной инвазии в одной капле анализируемой пробы.

При установлении интенсивности инвазии учитывают одновременное присутствие разных видов нематод, цестод, трематод.

15 Исследование павшей птицы на наличие гельминтов и ооцист простейших

Посмертную диагностику паразитозов птиц проводят, используя специальные паразитологические вскрытия, при которых в различных органах птиц находят паразитических червей, простейших, клещей, насекомых и те характерные изменения, которые произошли под их действием. Часто используют следующие методы вскрытия:

1. Метод полных гельминтологических вскрытий по К. И. Скрябину, при этом исследуют все без исключения органы и ткани птицы.

2. Метод полных гельминтологических вскрытий отдельных органов птиц с целью выяснения степени зараженности данного органа гельминтами и другими паразитами. Данный метод простой и наиболее часто применяемый и его используют для определения степени распространения отдельного гельминтоза или паразитоза в определенном конкретном районе (при аскаридозе, гетеракидозе, гименолепидозах или эймериозе)

3. Метод неполных гельминтологических вскрытий применяют для обнаружения и извлечения из органов и тканей птиц отдельных форм паразитических червей, как правило, крупных и хорошо заметных для исследующего (аскаридоз, гименолепидоз и другие).

Из всех вышеотмеченных методов наиболее информативным для постановки диагноза является первый, хотя данный метод достаточно трудоемкий.

Метод полного гельминтологического вскрытия птиц, по К.И.Скрябину, принципиально не отличается от вскрытия млекопитающих за исключением мелких деталей.

Первый акт вскрытия — ощипывание перьевого покрова и последующий осмотр кожи. Всякого рода новообразования, наросты, бугорки на поверхности кожи должны подвергаться внимательному анализу. Затем снимают кожу и производят тщательное исследование подкожной клетчатки на наличие паразитических червей. После этого надрезают мускулатуру в области груди, отделяют грудную кость и исследуют внутреннюю ее поверхность. Труп кладут на спину, чтобы все внутренности были на виду, и постепенно извлекают отдельные системы органов, не нарушая их взаимной связи друг с другом. Так изолируют и извлекают весь пищеварительный тракт от ротовой полости до клоаки, всю дыхательную систему, почки, половые органы, сердце вместе с наиболее крупными кровеносными сосудами и т. д. Затем тщательно просматривают брюшную и грудную

ГОСТ Р

полости, всю кровь из этих полостей собирают в особую кюветку для последующего промывания, извлекают головной и спинной мозг, исследуют содержимое конъюнктивальных полостей, выщипывают глаза, вскрывают синовиальные полости суставов и исследуют их содержимое, вскрывают лобные пазухи и носовые полости, делают соскобы со слизистых оболочек носовых ходов, осматривают слезистую рта щек и языка. После этого делают вскрытия отдельных органов.

Прежде всего, изолируют и раскладывают на отдельные кюветки печень, поджелудочную железу, пищевод, зоб, железистый и мышечный желудок, тонкий отдел кишечника, слепую и прямую кишку. Отделяют желчный пузырь и помещают в чашку Петри.

Печень разрывают на мелкие кусочки и заливают водой в белом эмалированном сосуде или такого же цвета кювете и оставляют стоять в покое 20 – 30 минут. За это время паразиты из желчных ходов выходят и оседают на дно. Затем осторожно сливают верхний слой жидкости так, чтобы не слить паразитов, а сосуд вновь доливают водой. Таким путем повторяют последовательное промывание до тех пор, пока вода не будет прозрачной. После этого извлекают куски печени, еще раз сливают верхний слой воды, а осадок просматривают микроскопически (невооруженным глазом), а затем — малыми порциями в чашке Петри под препаровальной лупой. Гельминты, обнаруженные при просмотре, извлекают препаровальной иглой или кисточкой.

Желчный пузырь вскрывают в чашке Петри и исследуют под лупой.

Поджелудочную железу исследуют так же, как и печень.

Пищевод вскрывают, осматривают слизистую оболочку и с ее поверхности по всей длине пищевода делают предметным стеклом или скальпелем соскоб. Соскоб помещают на предметное стекло, покрывают другим, сдавливают и просматривают под лупой или микроскопом. При наличии гельминтов верхнее стекло отделяют и иглой или кисточкой извлекают паразита.

Зоб исследуют так же методом соскоба, как и в предыдущем случае.

Железистый желудок вскрывают, содержимое его помещают в отдельный сосуд. Слизистую оболочку осматривают невооруженным глазом. На ней могут замечаться красно-фиолетовые пятнышки – самки нематод рода тетрамерес, которые проникли в глубь ее железок. На границе железистого и мышечного желудков могут обнаруживаться опухоли величиной до лесного ореха, заключающие в себе эхиноурий. Иногда со стороны серозного покрова железистого желудка вырывается бугристая, внутри которой находятся нематоды гистрихисы. Головной и хвостовой концы их торчат в просвете желудка.

В мышечном желудке паразиты находятся под кутикулой. Для выявления их разрезают ножницами желудок, разворачивают его, освобождают от внутреннего содержимого и ополаскивают в кювете. Затем отделяют кутикулу. При этом у гусей нередко обнаруживают амидостомы, а у уток еще и стрептокары.

Все отделы тонких и толстых кишок вскрывают отдельно. Разрез делают ножницами по стороне, противоположной прикреплению брыжейки, наблюдая за тем, чтобы не перерезать гельминтов. Содержимое отделов кишечника исследуют методом последовательного промывания, а слизистую оболочку — методом соскоба. В кишечнике обнаруживается наибольшее количество гельминтов, принадлежащих к нематодам, цестодам, трематодам и скребням, а также ооцисты эймерий.

У молодых птиц близ клоаки дорзально расположена фабрициева сумка, которую вскрывают и исследуют методом соскоба. В ней обитают трематоды – плягиорхисы и простогонимусы.

Гортань, трахею и бронхи разрезают ножницами и осматривают, со слизистых оболочек делают соскоб. При этом можно обнаружить у уток и гусей трематод – трахеофилюсов и нематод – цитостом, а у кур – сингамусов. Легочную ткань проверяют так же, как и печень (методом последовательных промываний).

Почки разделяют на части, сдавливают отдельные кусочки между стеклами и просматривают под микроскопом.

Половые органы исследуют методами размозжения ткани (яичник, семенники), соскоба и последовательного промывания (яйцевод).

Мозг исследуют, как почки.

Глаза. Слизистые оболочки век и конъюнктивальную полость исследуют методом соскоба; глаза исследуют после предварительного вскрытия внутренних сред промыванием.

Сердце и крупные кровеносные сосуды вскрывают в физиологическом растворе поваренной соли, а содержимое их последовательно промывают. В кровеносных сосудах, особенно в мезентериальных венах, обнаруживаются трематоды – бильхарциеллы.

Кровь, собранную из грудной и брюшной полостей, также исследуют методом последовательного промывания.

Метод полного гельминтологического исследования отдельных органов применяют тогда, когда необходимо разрешить некоторые специальные вопросы. Исследования проводят по методике, описанной выше.

Метод неполных гельминтологических вскрытий ставит целью извлечение из органов и тканей некоторых гельминтов, наиболее резко бросающихся в глаза благодаря своим крупным

ГОСТ Р

размерам (например, аскаридий, крупных цестод и др.). Неполные гельминтологические исследования, собственно, проводят при патолого-анатомическом вскрытии трупов птиц.

16 Метод исследования почвы на наличие яиц гельминтов

Исследования почвы на наличие яиц гельминтов проводят по ГОСТ Р 54001 (раздел 17).

Для обнаружения яиц гельминтов предметные стекла просматривают при увеличении 80 раз (окуляр 10 x объектив 8), а для определения степени развития, жизнеспособности и степени деформации – при увеличении в 400 раз (окуляр 10 x объектив 40). Подсчитанное в двух предметных стеклах количество яиц нематод по видам дает характеристику степени загрязнения или обсеменности разных проб почвы яйцами гельминтов.

17 Методы исследований промежуточных хозяев нематод, цестод и трематод на зараженность

17.1 Общие положения

Промежуточных хозяев нематод, цестод и трематод собирают в местах вероятного обитания и исследуют их в живом виде.

Примечание – Инвазированные промежуточные хозяева являются источниками заражения птиц гельминтами. Роль промежуточных хозяев выполняют различные представители беспозвоночных и позвоночных животных, в том числе млекопитающих, но в основном это беспозвоночные: брюхоногие и двусторчатые моллюски, малощетинковые, ракообразные, насекомые, и др.

Собранных промежуточных хозяев вскрывают, расчленяют и исследуют тело беспозвоночного под стереоскопическим микроскопом. При этом применяют метод компрессорного исследования.

Беспозвоночное животное или части его тела кладут на предметное стекло, накрывают вторым предметным стеклом и, сдавливая, микроскопируют. Если беспозвоночные малых размеров и прозрачные (циклопиды, дафниды и пр.), то их накрывают покровным стеклом и микроскопируют при легком надавливании на покровное стекло препаровальной иглой.

Также применяют два ускоренных метода массовых исследований промежуточных хозяев.

Первый заключается в переваривании промежуточных хозяев в искусственном желудочном соке (соляная кислота – 7 см³, пепсин – 5 г, дистиллированная вода – 1000 см³). В термостате при температуре 37 °С – 39 °С переваривание длится несколько часов, в осадке остаются живые личинки. Осадок частями исследуют под микроскопом. При этом можно исследовать по видам освобожденных от раковин моллюсков, ракообразных, насекомых, олигохет и других беспозвоночных.

Второй метод применяют при исследовании гаммарусов, водяных осликов, дафний и водных насекомых для выявления личинок нематод.

Беспозвоночных завертывают в кусочек мельничного шелка, тщательно разминают руками и закладывают в аппарат Бермана. В воронку наливают теплую воду и выдерживают 4 – 6 ч. Освободившиеся личинки нематод выходят и опускаются на дно пробирки. Осадок частями микроскопируют, одновременно исследуют большое количество промежуточных хозяев одного вида или рода.

17.2 Особенности исследования моллюсков, Mollusca

Остроконечными ножницами тело моллюска освобождают от раковины. Прочную раковину крупных моллюсков разрушают ударом молотка. При этом из моллюска вытекает жидкость, и в ней нередко обнаруживают церкарии, реди и другие личиночные формы гельминтов, поэтому моллюсков вскрывают в чашке Петри, на часовом стекле или в кювете. Тело моллюска расчленяют на отдельные части и органы, которые исследуют компрессорным методом.

Мелких моллюсков исследуют целыми, даже без снятия раковины, церкарии при этом свободно выходят из тела, активно двигаются в вытекающей жидкости. В тканях тела также можно заметить метацеркариев. Метацеркариев млекопитающих определяют по наличию шипов на воротнике. Так как извлечение метацеркариев из тканей и органов моллюска затруднено, рекомендуется применять метод переваривания тела моллюсков в искусственном желудочном соке.

17.3 Особенности исследования мух семейства Muscidae

Собранных с животных мух помещают в каплю физиологического раствора, вскрывают их при помощи игл под стереоскопическим микроскопом. При необходимости их исследуют под большим увеличением.

17.4 Особенности исследования комаров Culicidae

Собранных с животных комаров вскрывают иглами в капле физиологического раствора под стереоскопическим микроскопом.

18 Методы гельминтологической оценки водоемов

ГОСТ Р

18.1 Установление фауны водоемов и их благополучия по гельминтозам.

При обследовании водоемов дают их краткое описание с указанием типа водоема (озеро, пруд, река, болото, старица и другие), его размеры, проточный, степени зарастания растительностью, бывают ли на водоеме дикие птицы и в каком количестве и другие.

В средней полосе России, Западной Сибири и на Дальнем Востоке лучшими сроками обследования водоемов является вторая половина лета — июль, август, поскольку максимальная численность большинства видов водных беспозвоночных достигают в это время пресных водоемов. На отмеченный период приходится и наибольших заражённых водных беспозвоночных личинками гельминтов, вследствие этого увеличивается вероятность нахождения инвазированных животных.

В южных регионах страны сроки обследования водоемов могут быть несколько более ранними.

18.2 Сбор и обследование разных видов водных беспозвоночных животных на инвазированность личинками паразитов.

Сбор водных беспозвоночных животных проводят с помощью сачка или скребка — циклопов, дафний, гаммариусов, моллюсков, дождевых червей, личинок насекомых — по 30 экземпляров каждого из отмеченных, которые в большом количестве встречаются у берегов в зарослях растительности. Плавающих на поверхности или в толще воды организмов вылавливают с помощью сачка, а ползающих по дну водоема животных и сидящих на растениях собирают скребком.

Есть разные способы приготовления этих приспособлений для сбора биологического материала. Сачок и скребок обычно делают из двухслойной марли. Но более практично из мельничного сита с отверстиями не более 1 мм. Мешочки, сшитые, диаметром 25 см и длиной 30 – 35 см крепят на металлическое кольцо, а кольцо закрепляют на деревянную палку.

Скребок от сачка отличается тем, что на одной стороне металлической вилки у него прикрепляют пластинку, которая при работе скребет по поверхности дна.

Целью количественного учета водных организмов и определения биомассы и ее питательной ценности для уток и гусей, сборы следует проводить на определенной площади или объеме воды, например 1 м² или 10 л воды.

Собранный биологический материал с водными животными осторожно промывают и взвешивают в сыром или высушенном виде. После чего согласно данным о содержании в них питательных веществ, определяет кормовое значение их для птиц в пересчете на полезную площадь водоема. Исследованиями установлено, что высушенные ракообразные содержат 50 –60% белков, а в сыром виде 8 – 9%. В воздушной массе моллюсков содержится около 37% белков.

18.3 Определение экстенсивности и интенсивности гельминтозной инвазии (трематодозы, цестодозы, нематодозы, акантоцефалезы) и оценка водоемов с точки зрения определения возможности дальнейшего использования в хозяйственной деятельности.

Подводных беспозвоночных животных исследуют на инвазированность личинками гельминтов под микроскопом. При этом главное внимание следует уделить по рассмотрению ракообразных циклопов, дафний, гаммариусов и дождевых червей, поскольку они являются промежуточными хозяевами гельминтов и в них развиваются личинки наиболее патогенных паразитов. Рассмотрим отдельные из них.

Циклопы — наиболее мелкие прозрачные рачки, их длина около 1 мм и они являются промежуточными хозяевами цестод птиц. При исследовании под микроскопом в случае зараженности в них обнаруживают личинок цестод — цистицеркоидов, которые видны в полости тела рачка в форме округлых, сероватых образований с четкой, гладкой оболочкой, внутри которой находится зародыш с присосками и мелкими крючками. В теле циклопа таких личинок при просмотре может быть несколько.

Дафнии или водяные блохи, тоже мелкие рачки, но они крупнее циклопов — их длина 5 – 6 мм. Их исследуют под микроскопом на обнаружение червеобразных личинок нематод эхинурий (в количестве 1 – 2 экз.), которые при надавливании на покровное стекло начинают двигаться и они хорошо заметны.

Гаммариусы (бокоплавы) — значительно крупнее дафний, их длина 10 мм и более, являются промежуточными хозяевами нескольких видов гельминтов птиц — полиморфусов, стрептокар, тетрамересов. При исследовании гаммариусов личинки полиморфусов заметны без микроскопа на спинной стороне. В виде оранжевых точек величиной с просыное зерно.

Личинки стрептокар и тетрамересов, отличающиеся друг от друга тем, что вторые на хвостовом конце имеют 10 мелких шипиков, четко видны под микроскопом в виде удлиненных червеобразных телец. При исследовании рачка необходимо разделить на 3 – 4 части и каждую часть расплющить между предметными стеклами.

Дождевые черви (олигохеты) живут в донных отложениях, под корнями растений и могут содержать в себе личинок порроцекумов и гистрихисов. Эти личинки хорошо видны сквозь стенку тела червя в передней его части в виде длинной беловатой нити длиной 15 мм и более.

ГОСТ Р

Моллюски, служащие промежуточными хозяевами многих видов трематод, быстро уничтожаются птицей и поэтому подвергать исследованию их на инвазированность личинками паразитов следует по необходимости.

Личинки насекомых (стрекоз, поденок) могут быть источником заражения птиц простогонимозом, плягиорхозом, тетрамерозом.

Степень зараженности промежуточных хозяев личинками гельминтов (экстенсинвазированность – ЭИ,%) устанавливают по результатам исследований не менее 250-300 экземпляров животных в каждой из описанных выше групп, а по количеству личинок гельминтов у одной вскрытой особи промежуточного хозяина определяют интенсивность инвазии – ИИ, экз.

19 Методы определения наличия ооцист паразитических простейших

19.1 Флотационные методы

Сущность флотационных методов основана на определении наличия ооцист простейших, всплывающих на поверхность флотационного раствора, и дальнейшем их установлении с помощью микроскопа сравнивая с действующим определителем паразитических простейших.

19.1.1 Метод Фюллеборна для диагностики кокцидиозов

Анализируемую пробу массой 1 г заливают в ступке 3–5 см³ насыщенного раствора хлористого натрия, приготовленного по 8.1.1, тщательно размешивают пестиком или стеклянной палочкой и по мере размешивания добавляют раствор, объем доводят до 15 см³. Затем процеживают через сито в чистый стакан и отстаивают в течение 30 мин. За время флотации ооцисты простейших, удельный вес которых меньше веса насыщенного раствора хлористого натрия, всплывают на поверхность и концентрируются на поверхностной пленке.

Затем, прикасаясь металлической петлей к разным местам поверхностной взвеси, снимают три капли раствора и наносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом. Для недопущения быстрого высыхания и кристаллизации капель на предметных стеклах к ним добавляют по небольшой капле 50 %-ного водного раствора глицерина.

Металлическую петлю обжигают над пламенем спиртовки в начале и конце испытаний. При массовых исследованиях каплю на предметном стекле покровным стеклом не накрывают, а металлическую петлю промывают резкими движениями в стаканчике с дистиллированной водой.

19.1.2 Метод Котельникова-Хренова для определения ооцист простейших

Анализ проводят с помощью флотационного раствора нитрата аммония, приготовленного по 8.1.2 с изменением времени отстаивания после фильтрования жидкости от 10 до 15 мин.

19.1.3 Комбинированный флотационный метод для определения ооцист простейших

Анализ проводят с помощью комбинированного флотационного раствора, приготовленного по 7.1.4 с изменением времени отстаивания после фильтрования жидкости от 10 до 15 мин

19.2 Паразитологический анализ помета на наличие ооцист криптоспоридий

19.2.1 Метод нативного мазка

Из пробы влажного помета делают тонкий мазок, высушивают, фиксируют метиловым спиртом по ГОСТ 6995, после чего окрашивают карбол-фуксином по Цилю-Нильсену.

Ооцисты криптоспоридий диаметром 3–7 мкм окрашиваются в красный цвет. Внутри их можно видеть четыре спорозонта. Сопутствующая микрофлора окрашивается в зеленый цвет.

19.2.2 Флотационный и комбинированный методы

Для увеличения в исследуемом материале концентрации ооцист криптоспоридий используют флотационный метод Фюллеборна или комбинированный метод Дарлинга. В качестве растворов применяют насыщенные растворы хлористого натрия по ГОСТ 4233 или сахарозы по ГОСТ 5833. Из материала, взятого паразитологической петлей с пленки поверхностного натяжения, в пробирке готовят мазок, фиксируют и красят. Вероятность обнаружения ооцист криптоспоридий повышается во много раз.

19.3 Комбинированные (седиментационно-флотационные) методы

Сущность комбинированных (седиментационно-флотационных) методов основана на комбинации противоположных приемов обработки проб фекалий – седиментации и флотации, благодаря чему происходит обогащение осадка или поверхностной пленки ооцистами простейших и удаление излишних посторонних частиц взвеси, которые значительно мешают исследованию.

Методы более трудоемкие, однако, при некоторых протозоозах более информативны.

19.3.1 Метод Дарлинга

Анализируемую пробу массой 1 г заливают в ступке 5 см³ дистиллированной воды, тщательно размешивают, добавляя дистиллированную воду до 15 см³. Затем полученную взвесь процеживают через сито в стакан и отстаивают в течение 5 мин. После отстаивания верхний слой жидкости сливают, а на дне оставляют осадок с водой, который переносят в центрифужную пробирку. Наполненные до одинакового уровня пробирки центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин в течение 2 мин. После чего жидкость из пробирок сливают, а к осадку добавляют 10 см³ флотаци-

ГОСТ Р

онного раствора хлористого натрия, приготовленного по 8.1.1, тщательно перемешивают до получения взвеси и опять центрифугируют в течение 1 мин.

Затем металлической петлей снимают из каждой пробирки по три капли поверхностной взвеси, переносят на предметное стекло и препарат исследуют под микроскопом.

19.3.2 Метод Щербовича

В качестве флотационного раствора используют насыщенный раствор сульфата магния по 8.1.3.

Приготовленную в ступке водную суспензию из 3 г фекалий птиц процеживают через сито в чистую стеклянную центрифужную пробирку емкостью 10-15 мл и центрифугируют частотой вращения 2000-3000 об/мин в течение 2-3 мин. После этого надосадочную жидкость осторожно сливают, а к осадку добавляют 10 см³ раствора магния сульфата, хорошо размешивают и снова центрифугируют в том же режиме. После чего металлической петлей снимают по 3 капли поверхностной взвеси из каждой пробирки, переносят на предметное стекло и препарат исследуют под микроскопом.

19.3.3 Метод Вишняускаса

Применяется для определения ооцист простейших, а также яиц гельминтов птиц. Анализируемую пробу фекалий массой 3 г от птиц тщательно размешивают с 50 см³ дистиллированной воды в ступке, затем фильтруют через сито в стеклянную посуду вместимостью 100 см³. Ступку прополаскивают несколько раз 50 см³ дистиллированной воды, которой промывают фекальные массы на сите.

100 см³ полученного фильтрата отстаивают в течение 5 мин, затем верхний слой жидкости отбирают спринцовкой или осторожно сливают, оставляя на дне 20 см³ жидкости с осадком.

К жидкости с осадком добавляют 80 см³ дистиллированной воды и вновь отстаивают в течение 5 мин. После чего надосадочную жидкость отбирают спринцовкой или сливают, оставляя на дне 10 см³ жидкости, которую перемещают в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 1 мин при 1500–2000 об/мин.

Затем верхний слой жидкости отбирают спринцовкой или сливают, оставляя только осадок. К осадку постепенно добавляют раствор сульфата цинка по 8.1.6 так, чтобы мениск жидкости образовался выше краев центрифужной пробирки. Центрифужную пробирку покрывают покровным стеклом так, чтобы жидкость всей своей поверхностью соприкасалась с покровным стеклом. Заблаговременно перед началом испытания края центрифужных пробирок шлифуют на бруске. Центрифугируют в течение 0,5 мин при 1500–2000 об/мин.

Ооцисты паразитических простейших всплывают и прилипают к покровному стеклу. Покровное стекло с ооцистами простейших снимают и помещают на предметное стекло, предварительно нанеся одну каплю дистиллированной воды и исследуют под микроскопом.

20 Методы определения количества ооцист простейших в помете и подстилке

20.1 Определение количества ооцист простейших с помощью счетной камеры Горяева

1 г помета размешивают в ступке с 15 см³ дистиллированной воды и тщательно растирают пестиком. Полученную суспензию фильтруют через сито, 10 см³ фильтрата помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин в течение 2 мин. Затем жидкость из пробирки сливают, а к осадку добавляют 10 см³ флотационного раствора хлористого натрия, тщательно перемешивают и 0,15 см³ используют для заполнения счетной камеры Горяева.

При отсутствии счетной камеры используют предметное стекло, на которое наносят 0,15 см³ суспензии и накрывают покровным стеклом.

Заполненную камеру Горяева или предметное стекло выдерживают в течение 2 мин, чтобы ооцисты простейших могли подняться к поверхности, и под микроскопом подсчитывают количество ооцист простейших. Полученное число, умноженное на 100, показывает содержание ооцист простейших в 1 г помета. Для более точного определения количества ооцист используют две–три камеры.

20.2 Определение количества ооцист простейших с помощью счетной камеры ВИГИСа

1 г помета размешивают в ступке с 5 см³ флотационного раствора аммиачной селитры и тщательно перемешивают пестиком. При осторожном размешивании добавляют флотационный раствор до объема 15 см³. Взвесь фильтруют через ситечко в чистый стакан с последующим отжимом содержимого в ситечко и тщательным размешиванием взвеси. Затем пастеровской пипеткой быстро переносят 0,15 см³ взвеси в одну из ячеек счетной камеры и оставляют на 2 мин, после чего подсчитывают количество ооцист простейших. При необходимости заполняют и другие ячейки взвесью пробы из того же стаканчика, но при этом каждый раз перед заполнением ячейки смесь перемешивают.

ГОСТ Р

Подсчет ооцист простейших в ячейке проводят с помощью микроскопа при искусственном освещении.

Для установления количества ооцист простейших в 1 г помета делают расчет по числу обнаруженных ооцист в одной, двух или четырех ячейках. Для этого число ооцист, выявленных в ячейке, умножают на 30, в двух ячейках – на 15, а в четырех – на 7,5.

20.3 Определение количества ооцист простейших с помощью счетной камеры Мак Мастера

Наличие ооцист в помете определяют флотационным методом с использованием насыщенного раствора натрия хлористого плотностью 1,18 г/см³, а их количество подсчитывают с использованием камеры Мак Мастера. При этом навеску фекалий 1 г помещают в стеклянный стаканчик, заливают 3-5 мл флотационного раствора и перемешивают палочкой до получения однородной массы и исчезновения комков, по мере размешивания добавляют раствор до объема 30 мл. Взвесь фильтруют через ситечко в другой стаканчик, осадок на ситечке отжимают палочкой. Затем пастеровской или любой другой микропипеткой быстро переносят 0,15 мл взвеси в каждую из шести ячеек камеры, накрывают крышкой и оставляют на 3-5 минут и за отмеченное время имеющиеся ооцисты поднимаются и прилипают к поверхности сетки камеры. При подсчете ооцист пользуются микроскопом МБС и увеличением $\times 100$ раз. Из каждой пробы подсчитывают количество ооцист в шести ячейках камеры и выводят среднюю за каждый исследуемый день. Поскольку для исследования отбирают пробу 0,15 мл исходной взвеси материала 1:29, то есть 1/200 от 30 мл, чтобы определить количество ооцист эймерий в 1 г фекалий, выявленное их количество в одной ячейке (среднее количество из шести) умножают на 200.

21 Методы определения жизнеспособности ооцист простейших

21.1 Метод световой микроскопии

Под большим увеличением микроскопа выявляют резко выраженные признаки гибели ооцист простейших:

- деформация оболочек;
- вакуолизация плазмы зародыша;
- прогибание оболочек внутрь и их разрушение;
- лизис ооцист, их склеивание;
- отсутствие споруляции.

22.2 Культивирование

Создают условия для развития зародышей у жизнеспособных ооцист простейших в процессе культивирования. Культивируют их в термостате при температуре 26 °С– 28 °С во влажной камере в чашках Петри по ГОСТ 25336. Собранные на предметные по ГОСТ 9284 и часовые стекла по ГОСТ 23932 или фильтры ооцисты простейших помещают в чашки Петри. На дно чашки для создания влажности кладут вату по ГОСТ 5556, смоченную в 2,5 %-ном растворе бихромата калия. Чашку закрывают крышкой и помещают в термостат. С целью определения сроков достижения инвазионной стадии часть ооцист кокцидий ежедневно подвергают исследованию под микроскопом.

В спорулированных ооцистах оценивают особенности споруляции:

- наличие остаточных тел в ооцисте и спороцистах;
- размер и форму спорозоитов.

В процессе споруляции в ооцисте формируются четыре спороцисты (у изоспор две спороцисты) и в каждой из них по два спорозоиота (у изоспор четыре спорозоиота). Такие ооцисты называют спорулированными или инвазионными. Они способны заражать восприимчивых животных, в организме которых происходит развитие эндогенных стадий. Для подтверждения инвазионных свойств ооцист кокцидий применяют метод биопробы на молодняке кур (цыплята).

22 Метод установления интенсивности инвазии

Интенсивность инвазии устанавливают подсчетом числа ооцист простейших в трех каплях анализируемой пробы массой 1 г при микроскопии и делением полученного числа на три в соответствии с таблицей А.1.

Полученное число показывает ориентировочную интенсивность протозоозной инвазии в одной капле анализируемой пробы.

Для более точной оценки содержания ооцист простейших в анализируемых пробах помета необходимо определить их количество в 1 г материала с использованием вышеотмеченных счетных камер (Горяева, ВИГИСа и Мак Мастера).

При установлении интенсивности инвазии учитывают одновременное присутствие разных видов паразитических простейших.

23 Метод исследования почвы на наличие ооцист простейших

ГОСТ Р

Исследования почвы на наличие ооцист простейших проводят по ГОСТ Р 57782 (раздел 12).

Для обнаружения ооцист простейших предметные стекла просматривают при увеличении 80–100 раз (окуляр 10х, объектив 8–10), а для определения степени развития, жизнеспособности и степени деформации – при увеличении в 400 раз (окуляр 10х, объектив 40). Подсчитанное в двух предметных стеклах количество ооцист простейших по видам дает характеристику степени загрязнения или обсемененности разных проб почвы ооцистами простейших.

Приложение А

(справочное)

Пример записи в журнале результатов паразитологических исследований

А.1 Пример записи в журнале результатов паразитологических исследований проб помета птиц, соскобов из объектов внешней среды, почвы, промежуточных хозяев гельминтов приведен в таблице А.1.

ГОСТ Р

ГОСТ Р

Таблица А.1

1	№ п.п.		2	Дата поступления проб	3	Дата взятия проб	4	Вид животных и место отбора проб (хозяйство, населенный пункт, владельцы)	5	Количество поступивших проб	6	Дата исследования проб	7	Метод исследования			8	Количество обнаруженных инвазионных элементов (по классам и видам), экз.						9	Всего обнаружено инвазионных элементов, экз.		10	Проведено культивирование		11	Получено при культивировании (по видам), экз.		12	Количество инвазионных элементов гельминтов и простейших в стандартном объеме проб, экз.		13	Должность, ФИО проводившего исследования		14	26
														овоскопия																										
														ларвоскопия																										
														трематоды																										
														цестоды																										
														нематоды																										

19

Библиография

- [1] РД-АПК 1.10.15.02-2008 Методические рекомендации по технологическому проектированию систем удаления и подготовки к использованию навоза и помета. - М.: Минсельхоз РФ
- [2] Ветеринарно-санитарные правила подготовки к использованию в качестве органических удобрений навоза, помета и стоков при инфекционных и инвазионных болезнях животных и птицы. Правила Минсельхоза РФ №13-7-2/1027. Утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 4.08.97
- [3] Котельников Г.А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды: Справочник. – М.: «Колос», 1983. – 208 с.
- [4] Крылов М.В. Определитель паразитических простейших. – СПб., 1996. – 602 с.
- [5] МУ 3.2.1022-2001 Методические указания. 3.2. Профилактика паразитарных болезней. Мероприятия по снижению риска заражения населения возбудителями паразитозов. – М.: Минздрав России, 2001
- [6] МУК 4.2.796-99 Методические указания. Методы санитарно-паразитологических исследований. – М.: Минздрав России, 2000
- [7] Санитарные эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 3.2.3215-14 «Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации» (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 22 августа 2014 г. №50)
- [8] Сафиуллин Р.Т. Паразитарные болезни птиц, средства и методы борьбы. – М., ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 2019. – 260 с.
- [9] Черепанов А.А. Атлас. Дифференциальная диагностика гельминтозов по морфологической структуре яиц и личинок гельминтов. – М.: Колос, 2001 – 77 с.

ГОСТ Р

УДК

ОКС

Ключевые слова:

лабораторная диагностика паразитозов птиц, методы определения яиц гельминтов и ооцист простейших, пробы фекалий, объекты внешней среды, промежуточные хозяева, экстенсивность и интенсивность инвазии, определение жизнеспособности
