ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 55457— 2013

ЛОШАДИ

Методы лабораторной диагностики гельминтозов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ «ВИГИС» Россельхозакадемии)

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 27 июня 2013 г. № 209-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). 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 формационном 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 (gost.ru)

© Стандартинформ, 2014

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЛОШАДИ
Методы лабораторной диагностики гельминтозов

Horses.
Methods for laboratory helminthosis diagnostics

Дата введения – 2014 – 07 – 01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на лошадей и устанавливает методы лабораторной диагностики гельминтозов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 12.1.019–2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 54001–2010 Удобрения органические. Методы гельминтологического анализа

ГОСТ Р 54627–2011 Животные сельскохозяйственные жвачные. Методы лаборной диагностики гельминтозов

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018–93 Система стандартов безопасности труда. Пожаро-взрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.4.011–89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация

ГОСТ 61–75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 244–76 Натрия тиосульфат кристаллический. Технические условия

ГОСТ 4523–77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 22280–76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

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 по стандартизации в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 54627.

4 Общие положения

Общие положения методов лабораторной диагностики гельминтозов лошадей – по ГОСТ Р 54627 (раздел 4).

Издание официальное

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

6.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы – по ГОСТ Р 54627 (раздел 6) со следующим дополнением.

Устройство для сбора личинок и мелких нематод из фекалий (звездочка).

Кислота уксусная по ГОСТ 61, раствор 3 %-ный.

Натрий лимоннокислый по ГОСТ 22280.

Гематоксилин.

Краска Романовского–Гимза.

Сыворотка крови лошади.

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

7 Подготовка к исследованиям

Подготовку к исследованиям проводят по ГОСТ Р 54627 со следующими дополнениями.

7.1 Отбор и подготовка проб фекалий

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

Точечные пробы фекалий от живых лошадей берут из прямой кишки (10 г) или только что выделившегося испражнения.

В сопроводительном документе, направляемом с пробой в лабораторию, также указывают конюшню и число животных в конюшне.

При индивидуальном обследовании жеребцов-производителей, конематок и особо ценных спортивных лошадей номера на упаковке и в описи должны строго соответствовать.

7.2 Отбор и подготовка проб почвы, приготовление растворов по ГОСТ Р 54627.

7.3 Приготовление комбинированного раствора сернокислого магния и тиосульфата натрия плотностью 1,3 г/см^3

Раствор 1. 1000 г магния сернокислого 7-водного по ГОСТ 4523 растворяют в 1 дм^3 горячей дисстилированной воде по ГОСТ 6709. Через 24 ч раствор фильтруют в чистую стеклянную посуду.

Срок хранения раствора 1 в стеклянной колбе – не более 30 дней.

Раствор 2. 2000 г натрия тиосульфата натрия по ГОСТ 244 растворяют в 1 дм^3 горячей дистиллированной воды по ГОСТ 6709. Через 24 ч раствор фильтруют в чистую стеклянную посуду.

Срок хранения раствора 2 в стеклянной колбе – не более 30 дней.

Раствор 3. Три части раствора 1 смешивают с тремя частями раствора 2, затем к шести частям получившейся смеси растворов добавляют одну часть дисстилированной воды. Ареометром проверяют плотность рабочего раствора, которая должна быть 1,3 г/см^3.

Срок хранения раствора 3 в стеклянной колбе – не более 30 дней.

8 Флотационные методы определения наличия яиц и личинок гельминтов

8.1 Для определения наличия яиц и личинок гельминтов лошадей применяют флотационные методы по ГОСТ Р 54627 (подразделы 8.1–8.4), а также комбинированный флотационный метод Бреза для диагностики нематодозов и цестодозов.

8.2 Комбинированный флотационный метод Бреза для диагностики нематодозов и цестодозов

Анализируемую пробу массой 3 г в ступке заливают 10–15 $см^3$ комбинированного раствора сернокислого магния и тиосульфата натрия по 7. 2.1, растирают пестиком до гомогенного состояния, доливают комбинированным раствором до 45–50 $см^3$, размешивают стеклянной палочкой и процеживают через металлическое сито с ячейкой диаметром 0,3–0,5 мм в чистый стакан и отстаивают в течение 10–15 мин.

Затем снимают капли поверхностной взвеси из разных мест легким прикосновением металлической петли диаметром 0,8 см, переносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

9 Седиментационные методы диагностики трематодозов

Для диагностики фасциолеза и других гельминтозов лошадей применяют седиментационный метод последовательного промывания по ГОСТ Р 54627 (подразделы 9.1–9.2).

10 Комбинированные (седиментационно-флотационные) методы

Для определения гельминтозов лошадей применяют комбинированные (седиментационно-флотационные) методы Дарлинга, Щербовича и Вишняускаса по ГОСТ Р 54627 (раздел 10), а также метод Бреза со следующим уточнением.

Приготовленную в ступке водную суспензию из 3 г фекалий лошадей процеживают через сито в чистую стеклянную центрифужную пробирку вместимостью 10–15 $см^3$ и центрифугируют с частотой вращения 2000– 3000 об/мин в течение 2–3 мин. После этого надосадочную жидкость осторожно сливают, а к осадку добавляют 10 $см^3$ одного из флотационных растворов: натрия хлористого (метод Дарлинга), магния сульфата (метод Щербовича), комбинированного раствора магния сульфата и тиосульфата натрия (метод Бреза), хорошо размешивают и снова центрифугируют в том же режиме. После чего металлической петлей снимают по три капли поверхностной взвеси из каждой пробирки, переносят на предметное стекло и препарат исследуют под микроскопом.

11 Гельминтолярвоскопические методы диагностики нематодозов

Для диагностики диктиокаулеза лошадей применяют гельминтолярвоскопические методы Бермана-Орлова и Шильникова (упрощенный метод Бермана) по ГОСТ Р 54627 (раздел 11) со следующим уточнением.

Для исследования по методу Бермана-Орлова берут 10 г анализируемой пробы фекалий лошадей (ослов, пони).

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

Определение количества яиц нематод, цестод и трематод в фекалиях лошадей – по ГОСТ Р 54627 (раздел 12).

13 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.

14 Исследования павших животных на наличие гельминтов

Исследования павших животных на наличие гельминтов – по ГОСТ Р 54627 (раздел 14).

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

Исследование соскобов из объектов внешней среды на наличие яиц гельминтов – по ГОСТ Р 54627 (раздел 15).

16 Метод установления интенсивности инвазии

Проведение исследований методом установления интенсивности инвазии – по ГОСТ Р 54627 (раздел 16).

17 Метод исследование почвы на наличие яиц гельминтов

Исследования почвы на наличие яиц гельминтов проводят по ГОСТ Р 54627 (раздел 17).

18 Специальные методы исследований

18.1 Методы определения наличия личинок гельминтов в крови

18.1.1 Сущность методов

Методы исследования крови основаны на обнаружении личинок гельминтов, локализующихся в различных органах и тканях лошадей, но выделяющих своих зародышей в кровь. Эти методы используют на практике для диагностики филяриатозов – сетариоза лошадей (ослов, мулов) и парафиляриоза лошадей. Для этих целей используют венозную и периферическую кровь.

18.1.2 Методы исследования венозной крови с лимоннокислым натрием

18.1.2.1 Венозную кровь берут в соотношении 1:5, 1:7 или 1:10 с 3,8 %-ным раствором лимоннокислого натрия по ГОСТ 22280, центрифугируют, осадок микроскопируют.

18.1.2.2 Берут 20 $см^3$ венозной крови, цитрируют (на 10 $см^3$ крови добавляют 1 $см^3$ 3,8%-ного раствора лимоннокислого натрия), отстаивают в течение 20–25 мин. В результате образуется три слоя: нижний – эритроциты, средний (узкое беловатое кольцо) – лейкоциты, верхний – сыворотка. Химической пипеткой диаметром 1,0–1,5 мм берут содержимое среднего слоя, где концентрируются личинки, наносят две – три капли на предметное стекло, покрывают покровным и микроскопируют.

В цитрированной венозной крови при комнатной температуре личинки сохраняют жизнеспособность в течение одного – двух дней.

18.1.3 Метод исследования венозной крови с дистиллированной водой

Венозную кровь и дистиллированную воду берут в соотношении 1:5 или 1:10, центрифугируют, осадок микроскопируют. В результате гемолиза образуется менее обильный, чем при других методах исследования, осадок, личинки в воде остаются подвижными и легко обнаруживаются.

18.1.4 Метод Штаубли

3–4 $см^3$ венозной крови смешивают с 3–5- или 10-кратным количеством 3 %-ного раствора уксусной кислоты для растворения эритроцитов. Смесь центрифугируют, осадок микроскопируют на предметном стекле.

18.1.5 Метод Фюллеборна

Взятую венозную кровь отстаивают, сыворотку сливают в другую пробирку и центрифугируют в течение 10 мин. Осадок берут пипеткой и каплями наносят на предметное стекло для микроскопирования.

При исследовании на сетариоз венозную кровь лучше брать рано утром или ночью, так как концентрация микросетарий в крови в это время выше.

Личинок сетарий часто обнаруживают при исследовании периферической и венозной крови весной и летом, с ноября по февраль их обнаружить трудно.

При исследовании на парафиляриоз лошадей берут капли, вытекающие из ранок при «сечении», и готовят препараты «толстой капли». Для этого каплю венозной крови наносят на предметное стекло, покрывают покровным и микроскопируют. Для улучшения просмотра к капле венозной крови добавляют каплю обычной или дистиллированной воды. Для приготовления постоянного препарата толстую каплю размазывают другим стеклом, сушат, затем наливают дистиллированную воду для гемолиза эритроцитов; когда капля крови станет прозрачной, воду сливают. Препарат вновь сушат, фиксируют абсолютным спиртом в течение 20 мин.

Высушенный препарат красят гематоксилином, а затем при необходимости докрашивают краской Романовского–Гимза. В случае инвазии обнаруживают яйца и вышедшие личинки филяриат.

18.2 Исследование содержимого желудка

Содержимое желудка исследуют в основном на драшейоз и габронемоз лошадей, ослов и мулов, вызываемые нематодами, драшеей (*Drascheia megastoma*) и габронемами (*Habronema muscae, H. microstomum*). Паразиты локализуются в желудке.

Животное предварительно сутки выдерживают на голодной диете, затем вводят носо-пищеводный зонд по обычной методике, принятой в клинической диагностике. Убедившись, что зонд попал в желудок, откачивают шприцем желудочный сок, после этого вынимают зонд. Желудочным соком наполняют центрифужные пробирки, центрифугируют в течение 3–4 мин, осадок наносят на предметные стекла, покрывают покровными и микроскопируют. При заболевании находят яйца драшей и габронем.

18.3 Исследование соскобов с перианальных складок

Гельминтологическое исследование перианальных складок проводят при диагностике оксиуроза лошадей.

Для исследования готовят небольшие деревянные лопаточки с закругленными краями или обыкновенные спички. Смоченной в 50 %-ном растворе глицерина лопаточкой или спичкой делают соскоб с перианальных складок, с внутренней стороны корня хвоста и с кожи в области промежности. Соскоб переносят на предметные стекла в 2–3 капли смеси, состоящей из равных количеств глицерина и воды. Затем накрывают покровным стеклом и микроскопируют на наличие яиц оксиуры.

18.4 Исследование кожи

Исследования кожи проводят при диагностике онхоцеркоза и кожного габронемоза и драшейоза лошадей. При онхоцеркозе лошадей рекомендуется исследовать кусочки кожи. На месте экстирпации, в области холки, плеча или передней конечности, выбривают шерсть, кожу дезинфицируют. Выбритый участок кожи берут в складку и срезают бритвой или острыми ножницами небольшой кусочек кожи толщиной 3–4 мм и площадью 15–30 мм^2. Кусочек кожи помещают в пробирку с 2–3 см^3 физиологического раствора или же смеси физиологического раствора с сывороткой крови лошади в равных частях. Пробирку оставляют на несколько часов при комнатной температуре или ставят в термостат при температуре 35 °С–37 °С. После этого кусочки кожи удаляют, а жидкость, в которую выделились личинки онхоцерков, выливают частями на предметное стекло и микроскопируют.

18.5 Исследования травы

Траву исследуют на наличие личинок нематод (стронгилят пищеварительного тракта, диктиокаулюсов и других), а также на наличие адолескариев трематод (фасциол). Личинки нематод способны мигрировать в горизонтальном и вертикальном направлениях, но наибольшее их количество обнаруживается в прикорневой части стебля на расстоянии 3–5 см от корня, поэтому для исследования используют нижнюю часть растений. Собранные из разных участков пастбищ пробы травы объединяют путем перемешивания. Из объединенной пробы берут лабораторную пробу травы массой 1000 г. Ножницами разрезают на части и закладывают в аппарат Бермана (по частям) с теплой водой и оставляют на 2 ч. Пробирки с осадком центрифугируют при 1500– 2000 об/мин в течение 1–2 мин, затем верхний слой сливают, а осадок переносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

18.6 Дифференциация личинок паразитических и свободноживущих нематод

В почве и на траве встречаются свободноживущие нематоды и их личинки. Для отличия личинок свободноживущих нематод от паразитических применяют метод Корта. Суть метода заключается в действии формалина на личинки нематод, при котором личинки свободноживущих нематод погибают быстрее, чем паразитические. Личинки нематод помещают в чашку Петри или на часовое стекло в воду. При добавлении 40 %-ного формалина к жидкости с личинками нематод в соотношении 1:5, личинки свободноживущих нематод гибнут через 5–7 мин, паразитические остаются живыми в течение 15–20 мин, но подвижность их замедляется.

19 Метод исследования промежуточных хозяев нематод, цестод и трематод на зараженность

19.1 Исследования промежуточных хозяев нематод, цестод и трематод на зараженность – по ГОСТ Р 54627 (раздел 18) со следующим дополнением.

Личинки парафилярий лошадей развиваются в полости тела мухи семейства *Muscidae*, в жировом теле. Инвазионные личинки парафилярий находятся в головке, грудке и хоботке мухи-жигалки.

19.2 Особенности исследования комаров *Culicidae*

Собранных с животных комаров вскрывают иглами в капле физиологического раствора под стереоскопическим микроскопом. Личинки сетарий лошадей развиваются в грудке, а инвазионные находятся в хоботке комара.

19.3 Особенности исследования панцерных клещей *Oribatei*

Собранных из почвы несколько увлажненных участков пастбищ и лугов клещей исследуют в капле воды под стереоскопическим микроскопом, вскрывая их иглами. Цистициркоиды аноплоцефалят лошадей локализуются в полости тела клеща, они имеют шаровидную форму, в цисте находится сколекс с присосками и шейка.

Приложение А
(справочное)

Пример записи в журнале результатов гельминтологических исследований

А.1 Пример записи в журнале результатов гельминтологических исследований проб фекалий от лошадей, соскобов из объектов внешней среды, почвы, травы, промежуточных хозяев гельминтов, а также пробы крови, содержимого желудка, соскобов с перианальных складок и биопсия кожи приведен в таблице А.1.

Таблица А.1

№ п п	Дата поступления проб	Дата взятия проб	Вид животных и место отбора проб (хозяйство, населенный пункт, владелец)	Количество поступивших проб	Дата исследования проб	Метод исследования					Количество обнаруженных инвазионных элементов (по классам и видам), экз							Всего обнаружено инвазионных элементов, экз	Проведено культивирование	Погибло при культивировании (по видам), экз.	Количество инвазионных элементов гельминтов в стандартном объеме пробы, экз.	Должность, ФИО проводившего исследования
						овоскопия			лярвоскопия		трематоды	цестоды	нематоды									
						флотация	седиментация	комбинированный	Бермана	Шильникова	фасциолы	аноплоцефалята	паразкариды	стронгилята желудочно-кишечного тракта	диктиокаулюсы	оксиуры	онхоцерки					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

УДК 619:636.1:006.034 ОКС 11.220

Ключевые слова: лабораторная диагностика гельминтозов лошадей, методы определения яиц и личинок гельминтов, пробы фекалий, объекты внешней среды, промежуточные хозяева, экстенсивность и интенсивность инвазии, определение жизнеспособности яиц и личинок гельминтов

Подписано в печать 01.08.2014. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,40. Тираж 35 экз. Зак. 3188.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru