ОСТ 9388-022-00008064-2000

СТАНДАРТ ОТРАСЛИ
Методы лабораторной диагностики нематодозов свиней

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1. РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом гельминтологии им. К.И. Скрябина (Исполнитель Р.Т. Сафиуллин)

2. ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Департаментом ветеринарии Минсельхоза Российской Федерации 2000 года.

3. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Утвержден Департаментом ветеринарии МСХ РФ 08 августа 2000 г.

ОСТ 9388-022-00008064-2000

СОДЕРЖАНИЕ

1. Область применения

1.1. Методы отбора проб

2. Методы исследований

2.1. Методы определения наличия яиц нематод в фекалиях

2.2. Методы определения количества яиц в фекалиях

2.3. Метод определения мигрирующих личинок аскарисов из легких и печени

2.4. Метод исследования павших животных

2.5. Метод исследования соскобов из объектов внешней среды на наличие яиц нематод

2.6. Метод установления интенсивности инвазии

2.7. Метод исследования почвы на наличие яиц нематод

2.8. Метод исследования промежуточных и дополнительных хозяев нематод на зараженность.

ВВЕДЕНИЕ

Настоящий стандарт разработан в связи с изменением требований Госстандарта России к нормативным документам и необходимостью унификации применяемых в ветеринарной практике методов исследований для повышения их информативности и достоверности получаемых в разных условиях результатов.

Целесообразность разработки стандарта отрасли обусловлена также требованиями обязательной стандартизации методов лабораторной диагностики паразитозов животных и в частности нематодозов свиней.

ОСТ 9388-022-00008064-2000

СТАНДАРТ ОТРАСЛИ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НЕМАТОДОЗОВ СВИНЕЙ

Дата введения 2006 г.

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий стандарт распространяется на методы лабораторной диагностики нематодозов свиней, предназначенный для ветеринарных лабораторий, научно-исследовательских и учебных ветеринарных учреждений.

1.1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

Диагностические обследования свиней проводят в порядке плановых мероприятий в рациональные сроки или вынужденно, для определения благополучия стада, фермы, хозяйства, а также с целью контроля проведения оздоровительной работы.

1.1. Для проведения диагностических исследований отбирают пробы фекалий от животных, пробы патологического материала, соскобы объектов внешней среды, а также пробы промежуточных и дополнительных хозяев нематод.

1.2. Пробы фекалий берут от живых и павших животных.

1.2.1. От живых животных пробы фекалий (3 г) берут из прямой кишки животного или только что выделившиеся испражнении. В последнем случае берут верхнюю часть фекалий, не соприкасающуюся с полом или почвой. Чтобы не занести яйца или личинок гельминтов из фекалий инвазированного животного, руку после взятия пробы тщательно моют.

Пробы берут от 10% поголовья группы, но не менее чем от 30 животных каждой возрастной группы. От основных свиноматок и хряков-производителей пробы берут от каждого животного.

1.2.2. От павших животных фекалии берут из прямой кишки в количестве, указанном в п. 1.2.1.

1.2.3. Отобранные пробы фекалий упаковывают в полиэтиленовый пакет или пергаментную бумагу на краю которых ставят номер пробы или в хорошо закрывающийся сосуд.

В лабораторию доставляют пробы не более суточной давности со времени взятия. До проведения исследований пробы хранят в холодильнике при температуре 2–4°С для задержки развития личинок нематод, а для консервирования добавляют 2,5%-ный раствор бихромата калия.

1.3. Пробы патологического материала отбирают при вскрытии павших или вынуждено убитых животных.

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

1.4. Для определения загрязненности объектов внешней среды яйцами и личинками нематод необходимо брать из разных мест от 3 до

10 соскобов (по 3 г) с пола станков, проходов, стен станков, кормушек и смывы с предметов ухода за животными (скребки, метла). Отобранные соскобы объектов внешней среды упаковывают для отправления в лабораторию как указано в п. 1.2.3.

1.5. Для определения зараженности промежуточных и дополнительных хозяев личинками нематод необходимо в летние месяцы в местностях, неблагополучных по метастронгилезу и аскаридатозам из разных мест отобрать 10–20 экз. дождевых червей /олигохет/. Отобранные пробы помещают в пробирки, закрывают пробками и доставляют в лабораторию в день отбора.

1.6. Отправляемым в лабораторию отобранным пробам прилагают сопроводительный документ, в котором указывают:

хозяйство (отделение, ферму, цех, участок);

количество животных в отделении, цехе, участке;

систему содержания;

возраст и пол животного;

категорию упитанности;

заболеваемость и смертность;

продолжительность заболевания;

на какой гельминтоз исследовать;

дату отбора проб и отправления для исследования.

При индивидуальном обследовании основных свиноматок и хряков-производителей номера или клички их на упаковке и в описи должны строго соответствовать.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Методы определения наличия яиц нематод в фекалиях

Метод основан на определении с помощью микроскопа наличия яиц нематод аскарисов, трихоцефал, эзофагостом,стронгилоид и метастронгил всплывающих на поверхность флотационного раствора с исследуемым материалом.

2.1.1. Аппаратура, посуда, материалы и реактивы

2.1.1.1. При проведении исследования используют:

микроскоп с окулярным микрометром марки МБИ-3 по ГОСТ 8284-78 или других марок;

центрифугу лабораторную с пробирками ТУ 10-23-07-99 или других марок с частотой вращения 2000 об/мин;

весы лабораторные по ГОСТ 24104-80;

набор ареометров АОН-1 по ГОСТ 18481-81;

сита с ячейками размером 0,5-1 мм²;
стаканы пластмассовые вместимостью 30 см³ по ГОСТ;
стаканы стеклянные вместимостью 50—150 см³ по ГОСТ 10394-75;
чашки стеклянные лабораторные по ГОСТ 10973-75;
стекла предметные по ГОСТ 9284-75;
стекла покровные по ГОСТ 6672-75;
пипетки градуированные вместимостью 50 см³ по ГОСТ 20292-75;
посуду лабораторную фарфоровую по ГОСТ 91-9147-73;
воронки стеклянные по ГОСТ 8613-75;
вату гигроскопическую медицинскую по ГОСТ 5556-81;
марлю медицинскую по ГОСТ 9412-93;
перчатки хирургические резиновые по ГОСТ 3-88;
штатив для пробирок;
петли металлические с диаметром 8—9 мм;
кюветы;
спиртовки СЛ-1 по ГОСТ 25336-82;
пипетки глазные;
натрий хлористый по ГОСТ 4333-77;
нитрат аммония (гранулированный или обычный) по ГОСТ 14702-79;
магний сернокислый по ГОСТ 4523-77;
глицерин по ГОСТ 6259-75;
формалин технический по ГОСТ 1625-75;
формальдегид по ГОСТ 1625-89

2.1.2. Подготовка к исследованию

2.1.2.1. Приготовление флотационных растворов.

По методу Фюллеборна в качестве флотационной жидкости применяют насыщенный раствор натрия хлористого, который добавляют из расчета 420 г на 1 л кипящей дистиллированной воды. Раствору дают остыть, затем фильтруют через воронку с ватой или двухслойной марли в чистую склянку. Плотность определяют с помощью ареометров и она должна быть 1,18—1,19 г/см³.

По методу Котельникова-Хренова в качестве флотационной жидкости используют насыщенный раствор аммиачной селитры (гранулированной или обычной), приготовленный путем добавления 1500 г селитры на 1 л кипящей дистиллированной воды. После остывания раствор фильтруют в чистую посуду, а его плотность должна быть 1,28—1,29 г/см³.

При использовании комбинированного флотационного раствора применяют смесь натрия хлористого и нитрата аммония, которые добавляют на 1 л кипящей дистиллированной воды в количестве 250 и

550 г соответственно. Остывший раствор фильтруют в чистую посуду, проверяют плотность, которая должна быть 1,27–1,28 г/см³.

По методу Щербовича в качестве флотационной жидкости используют раствор магния сульфата, который добавляют на 1 л дистиллированной воды в количестве 920 г. Плотность приготовленного раствора после остывания должна быть 1,28–1,29 г/см³.

2.1.3. Проведение исследования

Из доставленных в лабораторию проб фекалий для исследования стандартизированным методом овоскопии отбирают пробы массой 1 г. Вначале для отбора проб необходимо взвесить их, чтобы натренироваться в определении массы по величине пробы, а в дальнейшем можно использовать стандартный объем.

2.1.3.1. При исследовании по методу Фюллеборна пробу массой 1 г заливают в ступке 3–5 см³ насыщенного раствора натрия хлористого, 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, удельный вес которых меньше веса насыщенного раствора натрия хлористого, всплывают на поверхность и концентрируются на поверхностной пленке. В дальнейшем, прикосновением металлической петли к разным местам поверхностной взвеси снимают три капли раствора и наносят на предметное стекло и исследуют под микроскопом. Для не допущения быстрого высыхания и кристаллизации капель на предметных стеклах, к ним необходимо добавлять по небольшой капле 50%-ного водного раствора глицерина. Накрывать исследуемую каплю при массовых исследованиях покровным стеклом необязательно, как и не обжигать петлю после каждого переноса раствора на предметное стекло, достаточно лишь промыть ее несколькими резкими движениями в стаканчике с водой, но в начале и конце исследования следует обжигать над пламенем спиртовки.

При определении наличия яиц нематод под микроскопом пользуются соответствующим атласом яиц гельминтов.

Данный метод в лабораторной практике применяется для диагностики аскариоза, эзофагостомоза и стронгилоидоза свиней.

2.1.3.2. По методу Котельникова-Хренова техника выполнения такая же, что и предыдущего метода (флотация по методу Фюллеборна), но отличается временем отстаивания после фильтрования жидкости и оно составляет 10–15 мин.

Применяют для выявления возбудителей аскариоза, трихоцефалеза, эзофагостомоза, стронгилоидоза и метастронгилеза свиней.

2.1.3.3. При использовании комбинированного флотационного раствора натрия хлористого и нитрата аммония техника выполнения исследования схожа с предыдущими методами (Фюллеборна, Котельникова-Хренова), но отличается временем отстаивания. При использовании данного метода профильтрованную взвесь оставляют для флотации на 10–15 мин.

Используют для диагностики возбудителей аскариоза, эзофагостомоза, трихоцефалеза и стронгилоидоза.

2.1.3.4. При исследовании по методу Щербовича пробу массой 1 г заливают в ступке 5 см^3 воды, тщательно размешивают добавляя воду до 15 см^3. 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 и 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 см^3 флотационного раствора магния сульфата, тщательно перемешивают до получения взвеси и опять центрифугируют в течение 2 мин. Затем металлической петлей снимают из каждой пробирки по три капли поверхностной взвеси, переносят на предметное стекло и препарат исследуют под микроскопом.

Метод наиболее эффективен для диагностики метастронгилеза и трихоцефалеза. С успехом можно использовать и для диагностики других нематодозов свиней.

2.2. Метод определения количества яиц нематод в фекалиях

2.2.1. Аппаратура, материалы и реактивы.

2.2.1.1. При проведении исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, отмеченные в п. 2.1.1 и дополнительно одну из счетных камер: Горяева, или ВИГИСа.

2.2.2.Проведение исследования

2.2.2.1. Взвешивают 1 г фекалий и размешивают в ступке с 15 см^3 воды и тщательно гомогенизируют. Полученную суспензию фильтруют через сито, 10 см^3 фильтрата помещают в центифужную пробирку и центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин в течение 2 мин. Затем жидкость из пробирки сливают, а к осадку добавляют 10 см^3 флотационного раствора, тщательно перемешивают и используют для заполнения счетной камеры Горяева. При отсутствии счетной камеры допускается использование предметного стекла, на которое наносят 0,15 см^3 суспензии и накрывают покровным стеклом. В дальнейшем запол-

ненную камеру или предметное стекло с 0,15 см³ суспензии выдерживают в течение 2 мин, чтобы яйца нематод могли подняться к поверхности, и под микроскопом подсчитывают количество яиц нематод. Полученное число, умноженное на 100 будет показывать содержание яиц нематод в 1 г фекалий. Допускается, для более точного определения количества яиц использование нескольких камер (2–3).

2.2.1.1. При использовании счетной камеры ВИГИСа 1 г фекалий размешивают в ступке с небольшим количеством флотационного раствора аммиачной селитры (5 см³) и тщательно перемешивают пестиком. По мере размешивания добавляют 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 0,5 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 МБИ при увеличении 7×8, МБС – 8×4 и лучше при искусственном освещении. Для установления количества яиц в 1 г фекалий делают расчет по числу обнаруженных яиц в одной, или двух или же во всех четырех ячейках. Для подсчета яиц в 1 г фекалий необходимо число яиц, выявленных в ячейке, умножить на 30, в двух ячейках – на 15, а в четырех – на 7,5.

2.2.3. *Обработка результатов*

2.2.3.1. У домашней свиньи обнаружение единичных яиц нематод до (100 яиц) в 1 г фекалий свидетельствует о субклиническом течении гельминтозов и об их постоянном выделении в окружающую среду.

Наличие 101–500 яиц нематод в 1 г фекалий свидетельствует:

для аскариоза поросят – о заражении низкой степени, а для взрослых свиней – о заражении средней степени;

для трихоцефалеза, стронгилоидоза и метастронгилеза – о заражении средней степени,

для эзофагостомоза поросят – о заражении средней степени, а для взрослых свиней о низкой степени инвазии.

Наличие 501–1000 яиц нематод в 1 г фекалий свидетельствует:

для аскариоза поросят – о заражении средней степени, а для взрослых свиней – признак сильного заражения;

для трихоцефалеза, стронгилоидоза и метастронгилеза – о сильном заражении;

для эзофагостомоза молодняка свиней – о сильном заражении, а для взрослых свиней – о средней степени инвазии.

Наличие 1001–2000 яиц нематод в 1 г фекалий свиней свидетельствует:

для аскариоза поросят и эзофагостомоза взрослых свиней – признак сильного заражения, а для других нематодозов – признак очень сильного заражения.

Наличие 2001–4000 и более яиц нематод в 1 г фекалий свидетельствует:

для аскариоза поросят и эзофагостомоза взрослых свиней – признак очень сильного заражения.

2.3. Метод определения мигрирующих личинок аскарисов из легких и печени

Метод основан на выявлении мигрирующих личинок аскарисов из печени и легких вынужденно убитых или павших поросят аппаратом Бермана с последующим просмотром под микроскопом.

2.3.1. Аппаратура и материалы

2.3.1.1. Для проведения исследования применяют:

ножницы по ГОСТ 21239-77;

пинцеты по ГОСТ 21241-77;

чашки лабораторные стеклянные по ГОСТ 10973-75;

марлю медицинскую по ГОСТ 9412-93;

стекла предметные по ГОСТ 9224-75;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709-72;

аппарат Бермана.

2.3.2. Проведение исследования

2.3.2.1. Легкие и печень поросят разрезают на мелкие кусочки, завертывают в марлевые салфетки и закладывают в аппарат Бермана по отдельности. Заливают водой температурой 38–40°С и отстаивают в течение 3–6 часов. После чего из пробирок надосадочную жидкость сливают, а осадок исследуют под микроскопом с целью обнаружения личинок аскарисов.

2.3.3. Обработка результатов

2.3.3.1. При обнаружении единичных личинок аскарисов (до 10) заболевание миграционной стадией аскариоза рассматривается как вторичный фактор, который не играет главную роль в падеже поросят. При обнаружении 10 и более личинок аскарисов в легких и печени и исключении других инфекционных заболеваний, аскариоз, вызванный миграционной стадией инвазии, считают причиной падежа поросят.

2.4. Метод исследования павших животных

Сущность метода заключается на установлении характерных патологоанатомических изменений и самих нематод в органах свиней при патологоанатомическом вскрытии животных. При этом у животных исследуют паренхиматозные органы и желудочно-кишечный тракт, обращая внимание на характер изменений, локализацию, количество и размер нематод.

2.4.1. Аппаратура, материалы и реактивы

2.4.1.1. Для проведения исследования применяют:

ножницы по ГОСТ 21239-77;

пинцеты по ГОСТ 21241-77;

чашки лабораторные стеклянные по ГОСТ 10973-75;

пипетки глазные;

натрий хлористый по ГОСТ 4233-77;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709-72;

лупу бинокулярную или микроскоп.

2.4.2. Проведение исследования

2.4.2.1. **АСКАРИОЗ.** При разрезе слизистая тонкого отдела кишечника воспалена. Аскарисов обнаруживают в тонком отделе кишечника, иногда в протоках печени и поджелудочной железы. В случае большого скопления аскарисов обнаруживают закупорку или разрыв кишечника, протоков печени и поджелудочной железы. Аскарисы крупные нематоды белого цвета, длиной 10–50 см. В легких и печени находят точечные и пятнистые кровоизлияния, в легких отмечают пневмонию, а печень покрыта множественными беловатыми очагами величиной 1–5 мм и на разрезе полнокровная.

ТРИХОЦЕФАЛЕЗ. При продольном разрезе толстого отдела кишечника у поросят отмечают катарально-дистрофический колит, проктит. Иногда наблюдают дистрофию паренхиматозных органов, отек легких и катаральный лимфаденит. Трихоцефалы – белого цвета, длиной 20–53 мм, имеют тонкий длинный головной конец, задний конец тела толстый и короткий. Трихоцефал находят в просвете толстого отдела кишечника, чаще в слепой кишке, внедрившихся головным концом в слизистую оболочку кишок.

ЭЗОФАГОСТОМОЗ. На слизистой слепой и ободочной кишок характерно появление мелких, плотных на ощупь узелков величиной 0,2–0,5 мм с желтоватым пятнышком в центре. Слизистая в этих местах утолщена, гиперемирована. Нередко узелки наполнены зеленовато-серой гнойной массой. В поздние сроки на месте узелков остается рубцовая ткань в виде белых плотных пятнышек. Кроме того, наблюдают отек кишечной

стенки, отложения густого вязкого экссудата или гнойно-некротических масс. Взрослые эзофагостомы – серо-белого цвета, длиной 7–14 мм. Взрослых особей при вскрытии находят в просвете толстого отдела кишечника, а эзофагостомозные узелки на слизистой оболочке.

СТРОНГИЛОИДОЗ. Трупы павших поросят ниже средней упитанности или истощены. Кожа складчатая, местами уплотнена, гиперемирована, нередко экзематозна и пронизана кровоизлияниями. Легкие в период миграции личинок несколько увеличены, полнокровны. Местами отмечают лобулярные пневмотические очаги, катаральный бронхит. В кишечнике острое катаральное воспаление, пятнистые кровоизлияния, эрозии и язвы. Брыжеечные лимфоузлы набухшие, покрасневшие, иногда с точечными кровоизлияниями. В печени и почках при остром течение нередко зернистая дистрофия. Стронгилоиды мелкие нематоды, серо-белого цвета, длиной 2,1–6 мм. Половозрелых стронгилоид находят в просвете тонкого отдела кишечника.

МЕТАСТРОНГИЛЕЗ. Легкие увеличены, отмечают бронхит, альвеолярную эмфизему, ателектазы, фокусы, характерные для пневмонии. При вскрытии бронхов метастронгил часто находят в задних и средних долях легких. Слизистая оболочка бронхов набухшая и покрасневшая. Отмечают узелковые поражения легких величиной до конопляного зерна серого цвета и плотной консистенции. Взрослые метастронгилы белого цвета, длиной до 5 см.

Обнаруженных при вскрытии нематод собирают с помощью пинцета в чашки Петри, промывают физиологическим раствором, подсчитывают и идентифицируют используя соответствующий определитель.

2.4.3. Обработка результатов

2.4.3.1. При обнаружении единичных нематод заболевание аскариозом, эзофагостомозом, трихоцефалезом, стронгилоидозом и метастронгилезом рассматривается как вторичный фактор, который не играет основную роль в падеже животных. При установлении большого количества отмеченных нематод (10 и более) и исключении других инфекционных заболеваний эти гельминтозы считают причиной падежа животных.

2.5. Метод исследования соскобов из объектов внешней среды на наличие яиц нематод

Сущность метода заключается в обнаружении и подсчете количества яиц нематод в 1 г обследуемой пробы, определении степени загрязнения объектов внешней среды инвазионными элементами и тяжести течения гельминтоза.

2.5.1. Аппаратура, материалы и реактивы

2.5.1.1. При проведении исследования используют аппаратуру, материалы и реактивы, указанные в п. 2.1.1., и дополнительно одну из счетных камер: Горяева, или ВИГИСа;

гомогенезатор электрический.

2.5.2. Проведение исследования

2.5.2.1. Взятую для исследования пробу (соскоб) тщательно перемешивают и взвешивают 3 г пробы с погрешностью не более 0,02 г. Затем перекладывают в стакан с 30 см³ воды, ставят в холодильник, выдерживают в течение 12 ч и гомогенизируют 2 мин в электрическом гомогенезаторе с частотой вращения 2000 об /мин. Полученную суспензию фильтруют в течение 5 мин. После чего, жидкую часть сливают, к осадку добавляют 10 см³ флотационного раствора 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. Полученное число умножают на коэффициент 67, что представляет собой количество яиц нематод в 1 г обследуемой соскобы.

2.5.3. Обработка результатов

2.5.3.1. При определении видов нематод под микроскопом пользуются соответствующим атласом яиц гельминтов.

При установлении до 500 яиц нематод в 1 г обследуемого соскоба отмечают низкую загрязненность объектов внешней среды, что свидетельствует о низкой и средней зараженности свиней аскарисами, эзофагостомами, трихоцефалами, стронгилоидами и метастронгилами.

Наличие до 1000 яиц нематод в 1 г соскоба свидетельствует о средней загрязненности объектов внешней среды и о средней и высокой инвазированности свиней отмеченными нематодами.

Обнаружение свыше 1000 яиц нематод в 1 г соскоба показывает высокую загрязненность объектов внешней среды инвазионными элементами, достаточно высокую инвазированность свиней нематодами и недостаточную эффективность противогельминтозных мероприятий.

2.6. Метод установления интенсивности инвазии

2.6.1.Проведение исследования

2.6.1.1. Интенсивность инвазии яйцами нематод у свиней устанавливают подсчетом их количества в трех каплях обследуемой стандартной пробы (1 г) при микроскопии и делением полученного числа на 3.

2.6.2. Обработка результатов

2.6.2.1. Подсчитанное число яиц нематод свиней делят на 3. Полученное число будет показывать ориентировочную интенсивность нематодозной инвазии в 1 капле исследуемой пробы. Исходя из отмеченного для нематод свиней устанавливают следующую ориентировочную интенсивность инвазии:

для аскариоза и эзофагостомоза:

низкая инвазия – 1–10 яиц (+);

средняя инвазия – 11–30 яиц (++);

высокая инвазия – 31–100 яиц (+++);

очень высокая инвазия-свыше 100 яиц (++++).

для трихоцефалеза, стронгилоидоза и метастронгилеза: низкая инвазия – 1–10 яиц (+);

средняя инвазия – 11–20 яиц (++);

высокая инвазия – 21–30 яиц (+++);

очень высокая инвазия – 31–100 и выше яиц (++++).

При установлении интенсивности инвазии необходимо учитывать одновременное присутствие разных видов нематод и паразитических простейших.

2.7. Метод исследования почвы на наличие яиц нематод

Сущность метода заключается в выявлении степени загрязнения яйцами нематод почвы на разном удалении от животноводческих помещений, на пастбище и других местах с поверхности и различной глубине.

2.7.1. Аппаратура, материалы и реактивы

2.7.1.1. Для проведения исследования используют аппаратуру, материалы и реактивы указанные в п. 2.1.1. и дополнительно:

шпатель или лопаточку; электромешалку;

центрифугу с пробирками;

формалин технический по ГОСТ – 1625-75;

натрий азотнокислый по ГОСТ – 4168-79;

натрий едкий по ГОСТ – 4328-77;

калий едкий по ГОСТ – 24363-80;

2.7.2. Подготовка к исследованию

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 берут одновременно несколько проб (3–5) по 10-20 г каждая по диагонали. Взятые пробы помещают в банки с крышкой или целлофановые пакеты. Каж-

дая 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 3%-ным раствором формалина на изотоническом растворе натрия хлорида (жидкость Барбагалло). В холодильнике почву можно хранить не более месяца, время от времени аэрируя и увлажняя ее.

2.7.3. Проведение исследования

При исследовании по методам Романенко и Гуджабидзе пробы почвы 25 г помещают в центрифужные пробирки на 80–100 см³ и заливают 3%-ным раствором едкого натрия или калия в соотношении 1:1. Содержимое пробирок тщательно размешивают при помощи электромешалки или стеклянных палочек, отстаивают в течение 20–30 мин, затем центрифугируют 5 мин при 800 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а почву промывают водой от 1 до 5 раз в зависимости от типа почвы (для песчаных и супесчаных почв достаточно одной промывки, а для глинистых, суглинистых, черноземных – от 2 до 5 раз) до получения прозрачной надосадочной жидкости. После промывки к почве добавляют 45 см³ насыщенного раствора натрия нитрата, тщательно размешивают и центрифугируют 3 мин. При отсутствии натрия нитрата можно использовать раствор магния сульфата. После центрифугирования пробирки со смесью ставят в штатив и осторожно доливают раствор натрия нитрата до образования выпуклого мениска, а затем покрывают предметными стеклами размером 10×6 см, предварительно обезжиренными смесью спирта с эфиром (в соотношении 1:2) или прокипяченными в воде со щелочью или с одним из имеющихся стиральных порошков. Смесь в пробирках отстаивают 30 мин. Во время отстаивания яйца нематод всплывают на поверхность и прилипают к стеклу. Затем стекла снимают а на их место ставят чистые. На снятые стекла наносят несколько капель 50%-ного водного раствора глицерина, капли накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Затем просматривают вторые стекла.

2.7.4. Обработка результатов

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

2.8. Метод исследования промежуточных и дополнительных хозяев нематод на зараженность

Сущность метода заключается в выявлении и определении с помощью микроскопа или бинокулярной лупы инвазированных личинок метастронгил и аскарид у дождевых червей, которые являются соответственно промежуточными хозяевами метастронгил и резервуарными - аскаридат.

2.8.1. Аппаратура, материалы и реактивы

2.8.1.1. Для проведения исследования применяют:

ножницы по ГОСТ 21239-77;

пинцеты по ГОСТ 21241-77;

чашки лабораторные стеклянные по ГОСТ 10973-75;

стекла предметные по ГОСТ 9224-75;

марлю медицинскую по ГОСТ 9412-93;

пробирки лабораторные;

натрий хлористый по ГОСТ 4233-77;

кислота соляная по ГОСТ 3118-75;

пепсин по ТУ - 10.02.01.111.89;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709-72;

формалин технический по ГОСТ 1625-75;

аппарат Бермана;

термостат лабораторный;

лупу бинокулярную или микроскоп.

2.8.2. Проведение исследования

2.8.2.1. Собранных дождевых червей промывают водой и убивают, добавляя в пробирку несколько капель 1%-ного раствора формалина. Затем дождевого червя кладут на предметное стекло, разрезают ножницами кутикулу в передней четверти тела, отделяют пищевод, зоб, мускулистый желудок с окружающими кровеносными сосудами и помещают на предметное стекло, затем накрывают другим предметным стеклом, их сжимают и исследуют в раздавленном препарате под бинокулярной лупой или микроскопом.

Органы червей можно исследовать и биохимическим методом – путем переваривания в искусственном желудочном соке (пепсин – 5 г, соляная кислота концентрированная – 10 $см^3$, теплый физиологический раствор (43°С) – 1000 $см^3$. Органы червей размельчают на предметном стекле, заворачивают в марлевую салфетку, кладут в воронку аппарата Бермана, заливают теплым искусственным желудочным соком в соотношении 1:15 и ставят в термостат при 43°С на 1,5–2 часа. Затем пробирку

аппарата Бермана отсоединяют, отстаивают в течение 5—10 мин, надосадочную жидкость отстаивают, а каплю осадка помещают на предметное или часовое стекло и исследуют под микроскопом или лупой.

При микроскопии необходимо учитывать, что у инвазионной личинки метастронгил задний конец острый, передний — тупой, недалеко от хвостового конца имеется маленький кутикулярный шип; личинка аскариды — белого цвета, имеет пищевод, кишечник в виде трубки.

2.8.3. Обработка результатов

2.8.3.1. Результаты исследования считают положительными при обнаружении в обследуемых препаратах личинок нематод. Наличие в одной обследуемой пробе 10 и более личинок свидетельствует о высокой интенсивности инвазии у промежуточных и дополнительных хозяев нематод, обусловленной высокой зараженностью свиней метастронгилами и аскарисами.

gost.e-ecolog.ru