Утверждаю
Заместитель руководителя
Департамента ветеринарии
Минсельхозпрода России
В.В.СЕЛИВЕРСТОВ
11 июня 1999 г. N 13-7-2/598

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТОКСОПЛАЗМОЗА ЖИВОТНЫХ

С утверждением настоящих методических указаний на территории Российской Федерации не действуют "Методические указания по лабораторным исследованиям на токсоплазмоз животных", утвержденные ГУВ МСХ СССР 21.01.84.

Методические указания по лабораторной диагностике токсоплазмоза животных переработаны и дополнены Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией (В.А. Седов, В.Д. Певнева), Всероссийским государственным научно-исследовательским институтом контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (Б.А. Тимофеев), Всероссийским институтом экспериментальной ветеринарии (В.Т. Заблоцкий), Уральской государственной сельскохозяйственной академии (И.И. Вершинин).

1. Общие положения

1.1. Токсоплазмоз - протозойное заболевание животных и человека, вызываемое внутриклеточным паразитом (Toxoplasma gondii), протекает остро и хронически. Заболевание животных токсоплазмозом наблюдают в любое время года.

Болезнь регистрируется во всех странах мира.

1.2. Развитие возбудителя проходит в организме дефинитивного и промежуточного хозяев.

1.3. Дефинитивными хозяевами токсоплазмы являются кошка, рысь, оцелот, пума и другие кошачьи; промежуточными - домашние и дикие млекопитающие (грызуны, плотоядные, всеядные, насекомоядные, сумчатые, птицы, приматы и человек), известно около 350 видов.

1.4. Диагноз на токсоплазмоз ставят на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований (микроскопического, биологического, серологического и копрологического).

1.5. В лабораторию для исследования на токсоплазмоз направляют:

- от подозрительных животных (бесплодие невыясненной этиологии, аборты, рождение уродливых, нежизнеспособных плодов), пробы сывороток крови (1 - 2 куб. см нативной или консервированной 5%-ным раствором фенола (1 капля на 1 куб. см сыворотки) или сухой борной кислотой (2 - 4% к объему), мертворожденный или абортированный плод (от серопозитивного или серосомнительного животного) целиком или его паренхиматозные органы, головной мозг, глаза и кусочки плаценты;
- от павших или вынуждено убитых - сердце, легкие, печень, селезенку, почки, лимфатические узлы и головной мозг;
- от кошек - пробы фекалий.

1.6. Отобранный патологический материал и пробы фекалий во влагонепроницаемой таре доставляют в лабораторию в день отбора, сыворотку крови - не позднее 2 дн. с момента взятия, абортированный или мертворожденный плод - не позднее 12 ч после аборта или рождения. Через сутки после смерти процент обнаружения возбудителя резко снижается.

1.7. Лабораторные исследования на токсоплазмоз включает:

- обнаружение эндозоитов, цист в патологическом материале и ооцист токсоплазмы в фекалиях методом световой микроскопии;
- выделение эндозоитов или цист токсоплазмы на белых мышах с последующей дифференциацией возбудителей;
- обнаружение специфических антител в РСК согласно "Наставления по применению набора для диагностики токсоплазмоза животных", утвержденного Департаментом ветеринарии 04.12.97.

2. Микроскопическое исследование

gost.e-ecolog.ru

2.1. Из патологического материала делают по 2 мазка. При исследовании абортированного плода делают мазки из сердца, легких, печени, почек, селезенки, лимфатических узлов, мышц глаза и экссудата грудной и брюшной полостей.

Жидкий материал наносят стерильной пипеткой на предметное стекло, размазывают и сушат на воздухе. Экссудат грудной и брюшной полостей предварительно центрифугируют при 2000 об./мин. в течение 15 мин. и мазки готовят из осадка. При исследовании плаценты делают разрез котиледона и делают мазки-отпечатки.

2.2. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют этиловым спиртом в течение 10 - 15 мин., окрашивают по Романовскому (1 - 2 капли краски азур-эозина на 1 куб. см дистиллированной воды pH 7,0 - 7,2) в течение 30 - 60 мин. (зависит от качества краски), промывают дистиллированной водой, высушивают на воздухе и исследуют под иммерсионной системой микроскопа.

2.3. При микроскопии препаратов эндозоиты токсоплазмы имеют форму дольки апельсина (полумесяца) с заостренным передним концом. Цитоплазма эндозоитов окрашивается в голубой цвет различной интенсивности, ядро - в красный или красно-фиолетовый.

В клетках разных органов путем размножения эндозоитов (до нескольких десятков) формируются псевдоцисты, не имеющие собственной оболочки. Наличие эндозоитов характерно для острой стадии токсоплазменного процесса.

В мазках из головного мозга, сетчатки глаза и мышечных органах обнаруживают цисты шарообразной формы около 100 мкм в диаметре, окружены плотной оболочкой. В них могут находиться сотни и тысячи цистозоидов. Цисты могут быть и вне клеток. Наличие цист характерно для хронического течения токсоплазмоза.

2.4. Результат микроскопического исследования считают положительным при обнаружении в мазках эндозоитов или цист токсоплазмы.

3. Биологическое исследование

3.1. Для биологической пробы используют тот же материал, что и для микроскопического исследования. Возбудитель выделяют методом слепых пассажей на белых мышах.

3.2. Материал растирают в ступке со стерильным песком и заливают физиологическим раствором в соотношении 1:3 или 1:5. Плаценту предварительно обрабатывают тампонами, смоченными дезинфицирующим раствором, подсушивают сухими стерильными тампонами, затем вырезают кусочки размером 0,5 x 0,5 см, фламбируют их на пламени горелки и растирают в ступке. В полученную суспензию добавляют антибиотики из расчета 1000 ЕД пенициллина и 0,05 г стрептомицина на 1 куб. см суспензии. Суспензию выдерживают 1 ч при комнатной температуре. Перед заражением суспензию встряхивают, когда частички осядут на дно, набирают надосадочную жидкость и вводят 2 - 3 белым мышам весом 20 - 23 г внутрибрюшинно или подкожно в дозе 0,5 - 1 куб. см. Суспензию можно набирать шприцом через стерильный ватный тампон. Место инъекции обрабатывают 7%-ной настойкой йода на 96° этиловом спирте.

3.3. С целью обогащения материала цистами применяют метод искусственного переваривания в желудочном соке. Патологический материал (кусочки внутренних органов, плаценты, мышц) тщательно измельчают, 50 г фарша помещают в колбу емкостью 1 куб. дм и заливают 10 объемами (по массе) искусственного желудочного сока следующего состава: пепсин - 1,3 г, натрий хлорид - 2,5 г, кислота соляная концентрированная - 3,5 куб. см, вода дистиллированная - 500 куб. см. Колбу помещают в термостат при 36 °С на 1 или 1,5 часа, периодически встряхивая.

Полученную массу центрифугируют при 2000 об./мин. в течение 15 мин.

Надосадочную жидкость осторожно сливают, осадок промывают стерильным физиологическим раствором, ресуспендируют в двойном объеме этого же раствора и после добавления антибиотиков выдерживают 1 ч при комнатной температуре и вводят внутрибрюшинно 2 - 3 белым мышам в дозе 1 куб. см.

3.4. При наличии в материале токсоплазм животные гибнут в течение 7 - 10 дней. У павших от токсоплазмоза мышей в брюшной полости образуется экссудат, в котором содержится большое количество эндозоитов токсоплазмы. Возбудитель обнаруживают также в мазках-отпечатках из печени, селезенки, легких, почек, лимфатических узлов.

3.5. Если в указанные сроки белые мыши, зараженные исходным материалом, не заболевают, их убивают на 10-й день, из паренхиматозных органов готовят суспензию (см. п. 3.2), которой заражают 2 - 3 белых мышей (второй пассаж). Если мыши не гибнут, аналогично проводят третий пассаж. При вскрытии

мышей могут обнаружить в экссудате и паренхиматозных органах эндозоитов, а в головном мозге - цисты токсоплазмы.

3.6. Для подавления резистентности белых мышей во втором и третьем пассажах им рекомендуется вводить гидрокортизон внутримышечно в дозе 0,05 куб. см 1 раз в день в течение 3 дн. подряд перед заражением.

3.7. Результат исследования считают положительным в случае обнаружения и дифференциации токсоплазм в патологическом материале.

3.8. Токсоплазм необходимо дифференцировать от саркоцист, безноитий, лейшманий, неоспор, энцефалитозоон. Дифференциация основана на изучении морфологии возбудителей, их локализации, патогенности для белых мышей, круга хозяев. При определении возбудителя пользуются таблицей.

МОРФОЛОГИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

Возбудитель	Форма одиночных паразитов	Локализация	Патогенность для белых мышей	Хозяин
Токсоплазма	В виде дольки апельсина (полумесяца); овальная, удлиненная	Внутри и вне клеток нервной, соединительной ткани, внутренних органов, мышц, глаза	Высокая со смертельным исходом	Человек, млекопитающие, птицы
Микросаркоциста	Сосискообразная, банановидная	Внутри клеток мышц сердца, скелетных	Слабая	Млекопитающие, птицы
Беноития	Овальная, грушевидная, серповидная	Вне клеток крови, соединительной ткани	Слабая	Крупный и мелкий рогатый скот, кролик, мышь, морская свинка
Лейшмания	Овальная, круглая	Вне клеток паренхиматозных органов, соединительной ткани	Высокая	Человек, собака, кошка, верблюд, грызуны, обезьяны
Неоспора	Круглая, в виде полумесяца	Вне клеток нервной, соединительной ткани	Слабая	Собака, кошка, крупный рогатый скот, овца, лиса, грызуны
Энцефалитозоон	Овальная	Внутри клеток почти, нервной, соединительной ткани	Слабая	Грызуны, домашние и некоторые лабораторные животные

Таблица I. Ооцисты кокцидий кошек и собак. Оригинал.
Микрофото автора. х 1000

(не приводится)

4. Копрологические исследования

4.1. Фекалии кошки исследуют методом Дарлинга или другим флотационным методом. Пробу свежих фекалий (1 г) помещают в стаканчик, заливают небольшим количеством воды, тщательно размешивают палочкой, доливая воду до объема 30 см!

Затем взвесь фильтруют через ситечко, переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют в

течение 1 - 2 мин., после чего надосадочный слой сливают, к осадку добавляют смесь равных частей насыщенного раствора натрия хлорида и глицерина (уд. масса равна 1,20). Содержимое размешивают и вновь центрифугируют при том же режиме. Проволочной петлей снимают с поверхностной пленки 3 капли, переносят на предметное стекло и исследуют под малым (8 х 10) увеличением микроскопа. При отсутствии глицерина можно использовать один насыщенный раствор натрия хлорида (400 - 420 г на 1 куб. дм горячей воды) или флотационный раствор аммония нитрата из расчета 1500 г на 1 куб. дм горячей воды (уд. масса 1,30). Наилучшей флотационной способностью растворы обладают при температуре 20 - 22 °С.

4.2. В положительных случаях обнаруживают неспорулированные ооцисты токсоплазмы. Ооцисты слегка овальной или почти круглой формы, величиной 10 х 12 мкм. Оболочка ооцисты состоит из двух бесцветных слоев. Полярные гранулы и микропиле отсутствуют. Цитоплазма заполняет почти всю ооцисту.

4.3. Ооцисты токсоплазмы необходимо дифференцировать от ооцист цистоизоспоры (изоспоры плотоядных), спороцист саркоспоридий (саркоцист), ооцист некоторых видов безноитий (таблицы I и II) и яиц гельминтов.

Дифференциация основана на морфологии возбудителей с учетом величины, формы, структуры спорулированной ооцисты и срока споруляции. При определении пользуются таблицей.

Возбудитель	Величина (мкм)	Форма	Срок споруляции (дн.)	Структура спорулированной ооцисты
Ооциста неспорулированная токсоплазмы	10 - 12	овальная	2 - 5	Имеется 2 спороцисты с остаточными телами, в спороцисте по 4 спорозита
Ооциста неспорулированная безноитий	12 - 17	Круглая, овальная	2 - 3	Имеет 2 спороцисты с 2 спорозоитами
Ооциста неспорулированная тоизоспоры (изоспоры плотоядных)	20 - 38	Яйцевидная	0,5 - 2	Имеется 2 спороцисты с крупными остаточными телами, в каждой спороцисте по 4 спорозоита
Спороциста спорулированная саркоспоридий	9 - 16	Овальная	-	Спороциста с 4 спорозоитами

Таблица II. Ооцисты и спороцисты саркоспоридий собак и кошек. Оригинал. Микрофото автора

(не приводится)

5. Результат исследования считают положительным при обнаружении в препаратах исследованных материалов эндозоитов, цист или ооцист токсоплазмы.

6. Результаты реакции (РСК) считают положительными при задержке гемолиза эритроцитов не менее чем на +++ в разведении 1:5.

Сыворотки крови от животных, которые дают сомнительную (++ или +) реакцию, подлежат повторному исследованию в РСК через 30 дн. после первого исследования. Двукратную сомнительную реакцию считают положительной.

7. Животных, положительно реагирующих в РСК на токсоплазмоз, считают подозрительными по заболеванию и в дальнейшем поступают согласно инструкции.

8. Сроки исследования:

микроскопического, серологического, копрологического - до 3 дн.;

биологического - до 30 дн.

gost.e-ecolog.ru