

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ
УКРАЇНИ
ЖИТОМИРСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
АГРОЕКОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра паразитології, ветеринарно-
санітарної експертизи та зоогієни**

**Методичні рекомендації
«Гельмінтологічне дослідження об'єктів
навколишнього середовища»**

Спеціальність «Ветеринарна медицина»



Житомир - 2015

Методичні рекомендації розроблені:
кандидатом ветеринарних наук, асистентом
кафедри паразитології, ветеринарно-санітарної
експертизи та зоогієни Бахур Т. І.,
кандидатом ветеринарних наук, асистентом
кафедри паразитології, ветеринарно-санітарної
експертизи та зоогієни Згозінською О. А.

Рецензент: кандидат ветеринарних наук, доцент
Радзиховський М. Л.

Розглянуті і схвалені на засіданні кафедри
паразитології, ветеринарно-санітарної експертизи та
зоогієни

Протокол № 11 від 4 березня 2015 р.

Зав. кафедри

Ю. Ю. Довгій

Розглянуті і схвалені на засіданні методичної
ради факультету ветеринарної медицини ЖНАЕУ

Протокол № 5 від 12 березня 2015 р.

Голова методичної ради професор

Ю. Ю. Довгій

ЗМІСТ:

Вступ	4
1. Загальна характеристика гельмінтологічних методів дослідження	4
1.1. Гельмінтоскопічний метод	4
1.2. Копроовоскопічні методи	5
1.2.1. Методи флотації	6
1.2.2. Методи седиментації	11
1.2.3. Комбіновані седиментаційно-флотаційні методи	13
1.3. Методи гельмінтоларвоскопії	16
2. Гельмінтологічні методи дослідження об'єктів довкілля	19
2.1. Дослідження проб ґрунту та зіскрібків із об'єктів тваринницьких приміщень	19
2.2. Дослідження проб гною і стічних вод з тваринницьких ферм та комплексів	22
2.3. Дослідження проб грубих і соковитих кормів	24
2.4. Дослідження проб води	26
3. Визначення життєздатності яєць та личинок гельмінтів	28
Контрольні питання	32
Список рекомендованої літератури	33

Вступ

Забруднення об'єктів навколишнього середовища яйцями та личинками гельмінтів є одним із факторів передачі інвазії тваринам та людині. Дослідження, направлені на визначення рівня забрудненості ґрунту, води, кормів для сільськогосподарських тварин, дають можливість своєчасно і правильно діагностувати і прогнозувати спалахи інвазійних хвороб.

Такий методологічний підхід в екологічному обґрунтуванні діагнозу і прогнозу інвазій має важливе значення при розробці та проведенні лікувально-профілактичних заходів щодо недопущення розповсюдження яєць та личинок гельмінтів.

1. Загальна характеристика гельмінтологічних методів дослідження

В залежності від цільового призначення гельмінтологічні дослідження тварин поділяються на:

1). Гельмінтоскопічні методи (*helmins* – гельмінт, *skopeo* – дивлюся), направлені на виявлення гельмінтів або їх члеників чи фрагментів;

2). Копроовоскопічні (*kepros* – фекалії, гній, *ovum* – яйце, *skopeo* – дивлюся) об'єднують методи дослідження, за допомогою яких виявляють яйця гельмінтів;

3). Гельмінтоларвоскопічні (*helmins* – гельмінт, *larva* – личинка, *skopeo* – дивлюся) забезпечують виявлення личинок гельмінтів.

1.1. Гельмінтоскопічний метод

Даний метод використовується при дослідженні матеріалу з метою виявлення статевозрілих чи юних гельмінтів або їх фрагментів. Матеріалом для дослідження частіше бувають фекалії тварин, вміст шлунку, змиви кон'юнктивальних мішків, зскрібки шкіри з місць ураження гельмінтами та інше.

Використання гельмінтоскопічного методу ґрунтується на здатності деяких видів гельмінтів самовільно покидати організм дефінітивного хазяїна, або після проведення діагностичної дегельмінтизації та виявлення паразитів чи їх фрагментів, частіше у фекаліях тварин.

Діагностична дегельмінтизація проводиться при підозрі на той чи інший гельмінтоз. Для цього виділяється невелика група тварин (велика рогата худоба, коні та інші по 3–5 гол., а вівці, свині – по 8–10 гол.) і проводиться їх дегельмінтизація відповідним антигельмінтиком. Через добу чи раніше збирають фекалії тварин і досліджують методом гельмінтоскопії. У м'ясоїдних тварин і птиці гельмінти починають відходити уже через декілька годин після застосування препарату.

Метод ефективний у відношенні гельмінтозів, збудники яких паразитують у шлунку і кишечнику, особливо при цестодозах тварин. Такі дослідження проводяться протягом 3–5 днів після дегельмінтизації. За цей

час одночасно вивчають побічну дію антигельмінтиків на організм тварин та їх ефективність.

Самовільне відходження гельмінтів чи їх фрагментів з фекаліями тварин у довкілля частіше спостерігається у цестод. При дослідженні фекалій в одних випадках виявляють гельмінтів або їх фрагменти (членики) неозброєним оком, в інших - застосовують гельмінтоскопічний метод.

Із спеціальних способів гельмінтоскопії ефективним є послідовне промивання фекалій. Для цього від великих тварин збирають свіжі фекалії, перемішують їх і ділять на 10 частин. Для дослідження беруть одну частину фекалій, кладуть у велику банку або відро, розбавляють 10-тикратною кількістю води і ретельно розмішують паличкою. Після 10–15-тихвилинного відстоювання верхній шар рідини зливають, а осад знову змішують з водою і відстоюють. Періодичне промивання і відстоювання фекалій повторюють до прояснення верхнього шару рідини. Востаннє зливають верхній шар рідини, а осад невеликими порціями переглядають у кюветах з чорним та білим дном. Виявлених гельмінтів збирають за допомогою пінцетів, препарувальних голок чи пензликів, переглядають під мікроскопом, після чого переносять у рідину для консервування. Щоб виявити дрібних гельмінтів осад додатково досліджують окремими частками за допомогою бінокулярної або штативної лупи з 10–20-тикратним збільшенням.

Поряд з цим існує метод “відсіювання” гельмінтів чи їх фрагментів. Для цього використовується набір із 2–4 металевих сит із різним діаметром отворів. Фекалії кладуть на верхнє сито і промивають водою. При цьому частина фекалій промивається водою, а гельмінти різної величини, в залежності від діаметру отворів у ситах, затримуються на них. В подальшому проводиться їх мікроскопічне дослідження.

1.2. Копроовоскопічні методи

Всі методи копроовоскопії ґрунтуються на різниці питомої ваги яєць гельмінтів з одного боку і рідини, яка використовується для дослідження – з іншого. В залежності від співвідношення питомої ваги цих компонентів розрізняють такі методи копроовоскопії:

1). Флотації (від англ. *flotation* – спливання) яєць гельмінтів у поверхневий шар рідини при обробці проб фекалій розчинами солей, питома вага яких вища, ніж щільність яєць;

2). Седиментації (від лат. *sedimentum* – осад) яєць гельмінтів, щільність яких вища, ніж питома вага рідини;

3). Комбіновані – ґрунтуються на послідовній обробці проб фекалій седиментацією і флотацією чи, навпаки, флотацією та седиментацією.

Крім того, до копроовоскопічних методів дослідження фекалій відноситься спосіб нативного мазка.

1.2.1. Методи флотації

Запропонована велика кількість модифікацій методу флотації для виявлення яєць гельмінтів з метою постановки зажиттєвого діагнозу, які відрізняються між собою технікою виконання та складом флотаційних розчинів. Для приготування флотаційних розчинів використовується хлорид кальцію (С. Boss, 1906), хлорид натрію та хлорид амонію (З. Д. Гинсбург, 1911), хлорид натрію (F. Fulleborn, 1920), рідке скло (Schuchman, Kiefer, 1922), гліцерин і цукор (Kaida, 1922), нітрат амонію (Г. А. Котельников, В. М. Хренов, 1984) або суміші різних солей хлориду натрію і нітрату амонію, сульфату магнію і нітрату натрію, сульфату цинку і хлориду натрію (Р. Т. Сафиуллин, 2001), сульфату цинку і нітрату амонію (Д. Г. Латипов і др., 2003).

У ветеринарній та медичній практиці використовується декілька модифікацій флотаційного методу.

Стандартизований метод флотації з розчином нітрату свинцю (азотнокислого свинцю) за Г. О. Котельниковим та В. М. Хреновим. Застосування флотаційного розчину з питомою вагою 1,5 дає можливість виявити яйця фасціол (питома вага 1,31–1,35), дикроцелій (питома вага 1,3), парамфістом та інших гельмінтів із значно меншою питомою вагою – аскарідат, стронгілат (включаючи метастронгілід), трихурисів, стронгілоїдесів, аноплоцефалат (монієзій та капсули тизанієзій) теній, акантоцефал.

При флотації з розчином нітрату свинцю яйця гельмінтів звільняються від неперетравлених решток і спливають на поверхню флотаційного розчину, який вільний від часток фекалій. Завдяки прозорості поверхневого шару рідини, яйця гельмінтів швидко виявляються. Методика флотації виконується у 2 варіантах.

Звичайна флотація. Пробу фекалій 3 г кладуть у склянку, заливають невеликою кількістю, щойно приготовленого розчину нітрату свинцю і ретельно розмішують паличкою. Одночасно з помішуванням додають розчин порціями, до об'єму 50 мл. Великі частини фекалій, які спливають на поверхню, швидко видаляють паличкою або шматочком паперу. Потім суміш фільтрують через чисте ситечко у другу склянку. З метою збільшення виявлення яєць гельмінтів в першу склянку наливають 5–7 мл флотаційного розчину, і, сполоснувши її, пропускають розчин через фільтр у другу склянку. Профільтровану суміш про дослідженні на фасціольоз, дикроцеліоз і парамфістоматози залишають для відстоювання на 15–20 хв., при інших гельмінтозах – не менше 10 хв. Потім за допомогою дротяної петлі беруть 3 краплі рідини, з різних місць поверхневого шару, переносять на предметне скло для мікроскопії при малому збільшенні з метою виявлення яєць гельмінтів. Дротяну петлю перед дослідженням кожної проби послідовно промивають водою у двох склянках. Воду в склянках міняють після дослідження 50 проб.

Щоб не допустити швидкого висихання та кристалізації крапель на предметному склі в теплий період року і при високій вологості, або коли

готується велика кількість препаратів для мікроскопії, до кожної краплі, знятої з поверхневого шару суміші, додається крапля гліцерину і води в співвідношенні 1:1. При набутті практичних навиків можна проводити мікроскопічні дослідження всієї поверхні суміші у склянці за допомогою МБС.

Слід враховувати, що яйця фасціол і парамфістом у флотаційному розчині нітрату свинцю та хлориду цинку деформуються. При цьому яйця фасціол набувають форми півмісяця або овалу з тупими кутами, проте, завдяки золотистому чи коричневому кольору їх легко виявити. Яйця парамфістом також набувають форми овалу з тупими кутами, але вони сірого кольору. Після додавання до краплі суміші дистильованої води форма яєць гельмінтів відновлюється.

Флотація з центрифугуванням. Пробу фекалій 3 г кладуть у склянку, заливають розчином нітрату свинцю і розмішують як при звичайній флотації. Суміш фільтрують через фільтр з діаметром отворів 0,5×0,5 мм у центрифугальну пробірку об'ємом 50 мл і центрифугують 1–2 хв. при 1000–1500 обертів на хвилину. Потім пробірку накривають знежиреним предметним склом так, щоб його поверхня доторкнулась до суміші в пробірці. Якщо рівень рідини нижче країв пробірки, то завчасно піпеткою доливають флотаційний розчин під поверхневий шар суміші, щоб отримати випуклий меніск. Через 5 хв. предметне скло знімають з пробірки і проводять мікроскопічні дослідження.

Стандартизований метод флотації з розчином нітрату амонію (гранульована або хімічно чиста аміачна селітра NH_4NO_3) за Г. О. Котельниковим та В. М. Хреновим. Дана методика має високу діагностичну ефективність, а, крім того, нітрат амонію проявляє незначні коагуляційні властивості. Тому, поверхневий шар суміші менш забруднений неперетравленими рештками, ніж при роботі з флотаційними розчинами інших солей.

Техніка виконання така ж, як звичайної флотації. Профільтровану суміш залишають для відстоювання на 10 хвилин. За даною методикою виявляють яйця збудників аскарозу, трихурузу, езофагостомозу і метастронгілозу свиней, неоаскарозу, трихурузу, монієзіозу, тизанієзіозу і стронгілятозів органів травлення жуйних тварин, параскарозу, стронгілідозів та ціатостомідозів коней, токсикарозу і токсикарозу м'ясоїдних тварин, аскаридіозу і гетеракозу птиці та стронгілоїдозу всіх видів тварин.

Метод флотації з насиченим розчином хлориду натрію (кухонної солі). Дана методика є менш ефективною ніж метод флотації з розчинами нітрату свинцю, нітрату амонію та ін. Питома вага насиченого розчину кухонної солі невисока – 1,18–1,20. Тоді як питома вага інвазійних яєць аскарисів становить 1,10–1,14, а незапліднених – 1,26. У яєць стронгілят органів травлення м'ясоїдних і свиней питома вага не перевищує 1,064–1,092, проте, у трихурисів досягає 1,16–1,22. Отже, під дією цього розчину спливає менша кількість яєць аскарисів, трихурисів та більша –

стронгілат. До того ж, флоатація яєць гельмінтів відбувається повільно – 45–60 хвилин.

Дана методика (спосіб Фюллеборна) широко використовується у лабораторній практиці для діагностики аскарідатозів, стронгілатозів органів травлення та естронгілоїдозів тварин. Для ефективного виявлення яєць цих нематод після фільтрації суміші по стінці склянки піпеткою додається 1–2 краплі розчину мила зеленого та спирту етилового у співвідношенні 1:1. Мильно-спиртовий розчин сприяє переміщенню яєць гельмінтів та концентрації їх у центрі поверхневої рідини. Взяття крапель з центру поверхневої рідини дає можливість виявити їх навіть при низькій інтенсивності інвазії.

Спосіб ефективний для діагностики тизанієзюзу овець (Н. Х. Шевченко, 1958). Капсули тизанієзій, в яких знаходяться яйця, спливають на поверхню рідини за 10–15 хвилин. Найбільш об'єктивні результати отримують тоді, коли суміш фекалій і розчину хлориду натрію після флоатації залишають на 5–6 годин, а потім її перемішують і витримують у спокої 10 хв. При цьому частинки фекалій осідають на дно склянки, а капсули тизанієзій і яйця монієзій спливають на поверхню рідини.

Яйця авітелін жуйних тварин, як і тизанієзій, знаходяться в капсулах. У навколишнє середовище тварини виділяють з фекаліями цілі членики гельмінтів або капсули з яйцями. Коли членики розриваються, виходять капсули з яйцями, а при порушенні цілісності капсул – самі яйця. Тому, при дослідженні проб фекалій методом Фюллеборна можна виявити яйця авітелін, проте, знімати краплі з поверхневої рідини необхідно через 30 хв. В той час як яйця монієзій спливають уже через 10–15 хв. (Е. Шинаев, Я. Нікольний, П. Вібе. 1974).

Метод флоатації з розчином нітрату натрію (NaNO_3). Завдяки високій питомій вазі розчину забезпечується висока його флоатаційна спроможність. Техніка виконання – як звичайної флоатації. Краплю рідини для дослідження можна знімати через 5–10 хвилин. Недоліком даного способу є те, що поверхневий шар суміші дуже забруднений фекаліями. Тому, відшукати яйця гельмінтів, особливо при низькій інтенсивності інвазії, складно. Метод використовують при дослідженні на аскарроз, трихуроз, езофагостомоз і стронгілоїдоз свиней, стронгілатози органів травлення, трихуроз та стронгілоїдоз жуйних тварин.

Метод флоатації з розчинами тіосульфату натрію та карбонату калію. Флоатаційні розчини мають високу флоатаційну здатність при питомій вазі, відповідно, 1,27 і 1,4.

При дослідженні на дикроцеліоз запропонований метод з центрифугуванням (Д. З. Болховітін, 1958). Для цього пробу фекалій вагою 1 г ретельно розмішують у фарфоровій ступці з 15 мл розчину тіосульфату натрію (питома вага 1,35–1,41). Суміш фільтрують у центрифугальну пробірку і центрифугують 3 хв. при 1000–1200 об./хв. Потім знімають

краплю поверхневого шару рідини і переносять на предметне скельце для мікроскопії.

За даним методом з питомою вагою розчину 1,27 виявляють яйця метастронгілід. При використанні тіосульфату натрію з питомою вагою 1,15–1,25 за методом звичайної флотації виявляють яйця тизанієзій. Капсули з яйцями збудника спливають на поверхню рідини через 10–15 хв. За даним методом діагностують ехінуріоз водоплавної птиці.

Метод флотації з розчином карбонату калію (K_2SO_3) за З. В. Вольфом.

Запропонований для зажиттєвої діагностики дикроцеліозу і еуритремозу жуйних тварин. Пробу фекалій вагою 0,5 г розмішують в 10 мл 60 % розчину карбонату калію, фільтрують у другу склянку, а через 15 хв., знімають краплю з поверхневого шару рідини для мікроскопії. За даним методом яйця гельмінтів деформуються, змінюється їх колір, що ускладнює їх диференціацію.

В зарубіжній літературі є повідомлення про широке використання методу флотації за способом австралійського гельмінтолога Мак Мастера (Mc.Master). Методика ґрунтується на використанні насиченого розчину хлориду натрію і камери Мак Мастера. За недостатністю флотаційної здатності розчину кухонної солі в інших країнах використовують розчини сульфату цинку, йодмеркурату калію та інших солей і камеру Мак Мастера, в основному для визначення кількісних показників.

Метод флотації з розчином йодмеркурату калію (йодортутний калій) з питомою вагою 1,44 використовують для діагностики цестодозів і трематодозів тварин. Метод виконується за двома способами: звичайної флотації та з центрифугуванням суміші.

За способом звичайної флотації суміш відстоюють 10 хв., а потім знімають краплю поверхневої рідини для мікроскопії.

У Франції для діагностики фасціольозу використовують спосіб з центрифугуванням суміші. Для цього профільтровану суміш проб фекалій з розчином йодмеркурату калію розливають у пробірки і накривають покривними скельцями так, щоб вони торкалися рідини. Після центрифугування упродовж 3,5 хв. при 1500 об./хв. покривні скельця знімають і поміщають на предметні для проведення мікроскопії. Недоліком цього способу є те, що розчин деформує яйця фасціол.

Для діагностики інших гельмінтозів у тій же Франції запроваджений метод флотації з 33 %-им розчином сульфату цинку (питома вага 1,18). Для підвищення ефективності метод флотації проводиться з центрифугуванням. Профільтровану суміш проби фекалій розливають у пробірки об'ємом 10 мл і накривають покривними скельцями так, щоб вони торкалися рідини. Після центрифугування упродовж 7–10 хв., при 2000–2500 об./хв. покривні скельця знімають і поміщають їх на предметні для проведення мікроскопії. За даним методом спливають не всі яйця фасціол. Збільшення щільності розчину сульфату цинку не забезпечує підвищення діагностичної ефективності. В порівняльних дослідах по випробуванню

розчинів сульфату магнію і сульфату цинку з питомою вагою, відповідно, 1,2 і 1,44 було встановлено, що флотаційна здатність другого розчину вдвічі нижча від першого.

Пробірочний метод з розчином нітрату натрію. Пробу фекалій 4 г розмішують у 60 мл флотаційного розчину нітрату натрію, фільтрують через чайне сито в іншу склянку, а потім виливають у пробірку об'ємом 24 мл до утворення випуклого меніска, накривають покривним скельцем і залишають для відстоювання на 4–12 хв. Потім покривне скельце знімають і поміщають на предметне для мікроскопії. За даним методом виявляють при питомій вазі розчину – 1,27–1,38 яйця анкілостом і токсокар собак, нематодірусів овець, параскарисів коней; при питомій вазі розчину 1,22–1,32 – яйця теній собак; при питомій вазі розчину 1,11–1,38 – яйця стронгілат коней. При питомій вазі розчину 1,22–1,27 виявляють ооцисти кокцидій. Підвищення питомої ваги розчину призводить до інтенсивного забруднення поверхневого шару рідини і швидкого утворення кристалів внаслідок випаровування води. За даним методом виявляють лише 3–7% яєць гельмінтів, які є в пробі фекалій.

Метод А. Снепехели і Л. Урбани (1934). В якості флотаційної рідини використовують розчин із 10 г йодистої ртуті, 7,4 г йодистого натрію і 26,5 мл води, Питома вага такого розчину 1,4–1,45. Метод запропонований для дослідження на фасціольоз за способом звичайної флотації.

Метод Тейшера (1957, 1959). В якості флотаційної рідини використовують комбінований розчин (сульфат цинку 80 г , цукор 25 г та 100 мл води). Пробу фекалій 2,5 г змішують з 37,5 мл води, фільтрують через сито і додають 37,5 мл флотаційної рідини. Суміш обережно перемішують паличкою і залишають для відстоювання на 6–8 год. Потім знімають краплю поверхневого шару рідини і переносять на предметне скельце для мікроскопії. Метод рекомендований для діагностики фасціольозу. За даними Латіпова Д.Г. та ін., (2003) використання в якості флотаційної рідини комбінованого розчину з хлориду цинку (на 1 л води 2 кг $ZnCl_2$), хлориду натрію (на 1 л води 420 г $NaCl_2$), цукру (на 1 л води 1,67 кг $C_{12}H_{22}O_{14}$) у співвідношенні 2:1:1 забезпечувало виявлення 98,2% яєць дикроцелій і 60,2 % яєць фасціол. Копроовоскопічні дослідження проводили за способами звичайної флотації та центрифугування. При цьому поверхнева плівка після відстоювання чи центрифугування залишалася чистою, а нанесені краплі на предметне скельце не кристалізувалися впродовж 3-ох годин.

Комбінований розчин із сульфату натрію і нітрату амонію (на 1 л води відповідно 960 і 500 г) забезпечував виявлення 90 % яєць трихурисів свиней при дослідженні способом звичайної флотації, а розчин із хлориду цинку і хлориду натрію (на 1 л води, відповідно, 2000 і 400 г) – 70 % (Сафіуллін Р. Т. 2001).

Спосіб копрологічної діагностики гельмінтозів і еймеріозів, розроблений співробітниками кафедри паразитології, ветеринарно-

санітарної експертизи та зоогієни Житомирського національного агроекологічного університету. До проби досліджуваного матеріалу (фекалій, ґрунту, піску, корму тощо) масою 3 г додають 30 см³ (1:10) флотаційної рідини (35 %-ий розчин цукру та Люголя 1:5) питомою вагою 1,15. Суміш фільтрують у центрифужну пробірку та центрифугують 5 хв. за 1500 об./хв. Для ідентифікації яєць гельмінтів мікроскопічно досліджують 3 краплі з поверхневої плівки розчину за малого збільшення ($\times 120$).

1.2.2. Методи седиментації

Метод седиментації використовують при діагностиці гельмінтозів, збудники яких виділяють яйця з великою щільністю. Вони більш трудомісткі ніж методи флотації, що пов'язано зі складністю відмивання яєць гельмінтів в осаді досліджуваної суміші.

Метод Ерліха (S. Erlich, 1927) запропонований для дослідження на фасціольоз. Пробу фекалій 5 г ретельно перемішують у склянці з 10-кратною кількістю води, суміш фільтрують через шар марлі у чашку Петрі до її наповнення. Фільтрат відстоюють 10 хв. Потім надосадову рідину зливають, а осад досліджують у чашці Петрі під мікроскопом при малому збільшенні.

За модифікацією Р. С. Шульца, З. А. Раєвської і Л. А. Лосева (1930) після осадження яєць гельмінтів проводять центрифугування осаду і мікроскопію на предметному склі. Яйця гельмінтів виявляються краще на скельці ніж у чашці Петрі.

Методика була удосконалена Г. О. Котельниковим і В. М. Хреновим (1980) та Г. О. Котельниковим (1981), що забезпечило підвищення її ефективності у 1,5 раза.

Стандартизований метод послідовних промивань. Пробу фекалій 3 г поміщають у склянку і заливають водою при постійному перемішуванні до об'єму 50 мл. Суміш фільтрують через шар марлі або ситечко в іншу склянку і залишають у спокої на 5 хв. (до утворення осаду). Потім верхній шар рідини зливають, знову додають таку ж кількість води і відстоюють 5 хв. Так промивають декілька разів, доки поверхневий шар рідини не буде прозорим. В останній раз поверхневий шар рідини зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії з метою виявлення яєць гельмінтів. З метою підвищення діагностичної ефективності запропоновано поверхневий шар рідини не зливати, а відсмоктувати спринцівкою, опускаючи наконечник на 1,5–2 см вище від осаду (Г. Г. Нікулін). Метод рекомендований для діагностики фасціольозу, парамфістоматозів, дикроцеліозу, еуритреозу та інших гельмінтозів жуйних тварин. Даний метод є менш ефективний ніж метод седиментації з целофановими плівками. До того ж, за даним методом, та при дослідженні осаду в чашці Петрі, складно виявити яйця гельмінтів у рідині, яка коливається, а тим більше при низькій інтенсивності інвазії.

Метод М. В. Демидова (1963). Пробу фекалій від овець (3 г), а від великої рогатої худоби (5 г) переносять до склянки об'ємом 200–250 мл,

заливають насиченим розчином хлориду натрію, ретельно перемішують паличкою із скла до отримання рівномірної суміші і залишають для відстоювання на 15–20 хв. Потім чайною ложкою знімають з поверхні грубі часточки корму, а рідину відсмоктують спринцівкою, залишаючи над осадом 20–30 мл. До осаду наливають 200–250 мл води, розмішують паличкою і фільтрують через шар марлі в іншу склянку. Фільтрат залишають для відстоювання на 15 хв. Потім рідину відсмоктують спринцівкою, а 15–20 мл осаду переносять у конусоподібну склянку об'ємом 30–40 мл. При цьому великі склянки ополіскують, а змиви виливають у конусоподібну склянку. Суміш у конусоподібній склянці відстоюють 5 хв., а потім рідину відсмоктують спринцівкою. Таке промивання проводять декілька разів. Після останнього зливання рідини осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

Метод І. П. Горшкова запропонований для діагностики драшюзу і габронемозу коней. Пробу фекалій 150–300 г переносять на металеве сито або марлю з великою лійкою (верхній діаметр 15–20 см). Попередньо лійку закріплюють у штативі, до нижнього кінця приєднують гумову трубку довжиною 10–15 см з металевим затискачем на кінці. Фекалії заливають водою при температурі 38–39°C, розмішують і залишають для відстоювання на 4–24 години. Потім затискач обережно послаблюють, а рідину випускають у центрифугальну пробірку і центрифугують 3 хв. Після цього верхній шар рідини зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

Метод П. П. Горячева (1949) запропонований для діагностики опісторхозу людей і м'ясоїдних тварин. Враховуючи, що яйця опісторхів мають велику щільність (1,38–1,46) та є невеликими за розмірами (0,026–0,030 мм завдовжки і 0,010–0,015 мм завширшки), необхідно на першому етапі досліджень використовувати розчини солей з питомою вагою, які забезпечують флотацію неперетравлених частинок корму та звільнення від них. Другий етап досліджень включає седиментацію яєць опісторхів. При цьому яйця гельмінтів опускаються на дно склянки, а неперетравлені частинки корму спливають. Отже, осад, який досліджують, залишається чистим.

В циліндр, діаметром 2,5–3 см та висотою 18–20 см, наливають 80–100 мл 20–22 % розчину нітрату калію (KNO_3) або насиченого розчину хлориду натрію ($NaCl$). Пробу фекалій вагою 0,5–1 г ретельно розмішують у склянці з 20–25 мл дистильованої води і обережно фільтрують через металеве сито або шар марлі у циліндр, уникаючи перемішування суміші фекалій з флотаційним розчином. Для цього кінець лійки, через який фільтрують фекалії, занурюють у флотаційний розчин на 0,25–0,5 см. Відбувається повільна дифузія між розчином солі та дистильованою водою з фекаліями. В результаті чого яйця гельмінтів повільно осідають на дно циліндра. Через 2–3 години поверхневий шар рідини відсмоктують піпеткою із циліндра, а розчин, що залишився, переносять в центрифугальну пробірку і центрифугують 1–2 хв. при 1500–2000 об./хв.

або залишають у спокої на 10–20 год. Після цього осад переносять піпеткою на предметне скло для мікроскопії. Метод можна використовувати при дослідженні на клонорхоз, метагоніоз та інші трематодози проте, вона трудомістка, потребує багато часу, а у розчині солей яйця гельмінтів деформуються.

Для дослідження жуйних тварин на трематодози запропонований подібний метод з використанням насиченого розчину хлориду натрію для флоатації решток корму та седиментації важких яєць трематод.

У звичайну пробірку наливають 6–8 мл насиченого розчину хлориду натрію і ставлять у штатив під кутом 30°. Пробу фекалій вагою 1–2 г ретельно розмішують у фарфоровій ступці з 10–15 мл води кімнатної температури, а потім фільтрують у пробірку через лійку з двома шарами марлі. Важливо щоб суміш із фарфорової ступки повільно стікала по стінках лійки у пробірку, в результаті чого суміш буде знаходитися у поверхневому шарі розчину солі. В подальшому проводять відстоювання проби від 30 хв. до 1,5 години. За цей період важкі яйця трематод опускаються на дно пробірки, а рештки корму будуть знаходитись у поверхневому шарі. Після відстоювання поверхневий шар рідини зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

Метод Река (1962) рекомендований для діагностики фасціольозу, парамфістоматозів, дикроцеліозу та стронгілятозів органів травлення. Пробу фекалій вагою 4 г від великої рогатої худоби і 2 г від овець та кіз кладуть у фарфорову ступку додають, відповідно, 75 та 70 мл води і ретельно розмішують. Суміш фільтрують у склянку об'ємом 20 мл, Піпеткою з гумовою грушею відсмоктують з різних шарів рідини 20 мл суміші, переносять у пробірку і залишають у спокої на 3 хвилини. Потім поверхневий шар рідини відсмоктують, а до осаду (0,3 мл) додають 1–2 краплі 1 %-го розчину метиленового синього і переносять на предметне скло для мікроскопії.

1.2.3. Комбіновані седиментаційно-флоатаційні методи

Метод ґрунтується на цілковито протилежних способах седиментації та флоатації при обробці проб фекалій, його називають ще седиментаційно-флоатаційним або, навпаки, флоатаційно-седиментаційним. В результаті комбінації протилежних способів обробки проб фекалій досягається збагачення осаду чи поверхневого шару рідини яйцями гельмінтів та звільнення досліджуваної суміші від зайвих решток, які заважають мікроскопії, Застосування подвійного центрифугування суміші фекалій – спочатку з водою, а потім з флоатаційним розчином – сприяє у першому випадку швидкому осадженню яєць гельмінтів в результаті дії доцентрової сили, а в другому – їх спливанню за рахунок відцентрової сили. Отже, комбінований метод, за результатами досліджень, більш ефективний та має переваги над іншими флоатаційними чи седиментаційними методами.

Комбінований метод вперше був запропонований американським паразитологом Дарлінгом (1911). В подальшому на підставі цього методу розроблені інші методи та їх модифікації.

Метод Дарлінга. Пробу фекалій ретельно розмішують у склянці з водою, (води необхідно брати стільки, щоб суміш помістилась в центрифугальній пробірці). Суміш центрифугують 1–2 хвилини, при 1500 об./хв., потім поверхневий шар рідини зливають, а до осаду додають флотаційний розчин (насичений розчин хлориду натрію і гліцерину в рівних частинах). Питома вага такої рідини становить 1,205 при температурі 18°C. Вміст пробірки ретельно розмішують і знову центрифугують. При такій обробці проби фекалій яйця гельмінтів спливають на поверхню рідини, їх знімають металевою петлею і переносять на предметне скло для мікроскопічного дослідження. Метод рекомендовано для діагностики аскаридадозів та інших гельмінтозів.

Стандартизований метод за Г. О. Котельниковим і В. М. Хреновим виконується у двох варіантах.

Варіант 1. Модифікація з розчином нітрату свинцю (питома вага 1,5). Пробу фекалій 3 г ретельно розмішують з водою у склянці об'ємом 50 мл. Суміш фільтрують через фільтр з отворами 0,5×0,5 мм в центрифугальні пробірки об'ємом 50 мл і центрифугують 1–2 хв. при 1500–2000 об./хв. Надосадову рідину зливають, а до осаду додають 50 мл свіжого розчину нітрату свинцю і знову центрифугують у тому ж режимі. Потім пробірку накривають знежиреним предметним склом так, щоб його поверхня торкалася суміші. Якщо рівень рідини нижче краю пробірки, то попередньо доливають розчин під поверхневий шар, щоб отримати випуклий меніск. Через 5 хв. предметне скло знімають, перевертають його догори стороною, яка торкалася суміші, і проводять мікроскопію. Методика рекомендована для діагностики фасціольозу, парамфістоматозів, дикроцеліозу, а також для виявлення яєць стронгіліат, аскаридат, монієзій та інших гельмінтів.

Варіант 2. Модифікація з розчином нітрату амонію (питома вага розчину 1,3). Обробку проби фекалій проводять тим же способом, як і в першому варіанті. Потім суміш фекалій і води фільтрують через металеве сито з отворами 0,5×0,5 мм в іншу склянку і залишають у спокої на 5 хв. Поверхневий шар зливають, залишають осад з таким об'ємом рідини, щоб вона помістилася в центрифугальній пробірці. Осад ретельно розмішують, переносять в центрифугальну пробірку і центрифугують 1–2 хв., при 1000–1500 об./хв. Воду зливають, а до осаду додають розчин нітрату амонію, ретельно розмішують і знову центрифугують в тому ж режимі. Потім з поверхневого шару суміші знімають три краплі, переносять на предметне скло для мікроскопії. Методика рекомендована для діагностики метастронгільозу свиней, стронгілятозів органів травлення, трихурозів і аскаррозів та стронгілоїдозів у різних видів тварин. Запропонований метод з розчином нітрату амонію ефективний для виявлення яєць цестод.

Модифікація за Й. А. Щербовичем (1936, 1949, 1952). В якості флотаційних рідин запропоновані розчини: сульфату магнію (англійська сіль), тіосульфату натрію і нітрату натрію.

Пробу фекалій величиною з грецький горіх кладуть у склянку, додають води 40–60 мл (співвідношення фекалій до води 1:15) і ретельно розмішують. При постійному змішуванні суміш фільтрують через металеве сито або шар марлі в іншу склянку і залишають у спокої на 1–2 хв. Поверхневий шар рідини зливають, залишають об'єм, рівний об'єму центрифугальної пробірки. Суміш переносять у центрифугальну пробірку і центрифугують 1–2 хв. при 1500 об./хв. Потім рідину зливають, а до осаду додають один з флотаційних розчинів, ретельно розмішують і знову центрифугують при тому ж режимі. Після центрифугування за допомогою металеві петлі знімають три краплі поверхневого шару і переносять на предметне скло для мікроскопії.

При використанні розчину сульфату магнію виявляються яйця метастронгілід, трихурисів, аскарисів, стронгілят органів травлення. При використанні розчину сульфату натрію і нітриту натрію виявляють яйця макраканторинхусів, теній м'ясоїдних тварин (О. Ф. Носик), спірурат птиці (Ю. П. Петров).

Метод для діагностики опісторхозу м'ясоїдних тварин за Г. О. Котельниковим та О. О. Вареничевим. В якості флотаційної рідини за даною методикою, використовуються розчин хлориду цинку з питомою вагою 1,82 або розчин нітрату кадмію з питомою вагою 1,73 (розчин готують із розрахунку 250 г солі на 100 мл теплої води), або розчин йодиду калію з питомою вагою 1,71. Дана методика ґрунтується на звичайному відстоюванні і промиванні водою осаду фекалій у склянці та центрифугуванням два рази – перший раз з водою з метою осадження яєць, а другий – з флотаційним розчином з метою флотації яєць гельмінтів.

Пробу фекалій вагою 5 г кладуть у конусоподібну склянку об'ємом 50 мл і додають 5–7 мл денатурованого спирту або 1–1,5 г кальцинованої соди для кращого відокремлення яєць опісторхісів від фекалій. При постійному помішуванні додають воду до повного об'єму. Суміш фільтрують через металеве чи капронове сито або капронову тканину в іншу склянку і залишають у спокої на 5 хв. Потім поверхневий шар води зливають, залишають невелику кількість і знову додають воду до об'єму 50 мл. Після відстоювання впродовж 5 хв. надосадову рідину зливають і залишають об'єм, рівний об'єму центрифугальної пробірки. Суміш переносять до центрифугальної пробірки і центрифугують 1,5–2 хв. при швидкості 1000 об./хв. Надосадову рідину зливають, а до осаду додають флотаційний розчин, ретельно перемішують і знову центрифугують у тому ж режимі. Після цього дротяною петлею знімають з поверхневого шару 3 краплі рідини і переносять на предметне скло, додають до кожної краплі по краплі гліцерину, розведеного водою 1:1, накривають покривним склом і проводять мікроскопічні дослідження. Методика забезпечує 100 %

ефективність виявлення яєць опісторхісів. Для дослідження однієї проби необхідно не більше 15 хв.

Модифікація за Р. В. Сковронським (1962) запропонована для діагностики фасціольозу. Пробу фекалій вагою 20 г ретельно розмішують у склянці з 10-тикратною кількістю води, фільтрують через металеве сито в іншу склянку і залишають у спокої на 5 хв. Потім воду зливають, а до осаду знову додають воду і відстоюють 5 хв. Після цього воду зливають, залишаючи об'єм, рівний об'єму центрифугальної пробірки. Осад переносять у центрифугальну пробірку і центрифугують 0,5–1 хв. при 1500 об./хв. Поверхневий шар рідини зливають, а до осаду додають розчин тіосульфату натрію з питомою вагою 1,28 (розчин готують із розрахунку: 1:1). Замість зазначеного розчину можна використовувати розчин нітрату натрію або сірчанокислу магнезії. Центрифугують 0,5–1 хв., при 1500 об./хв., а потім дротяною петлею знімають з поверхневого шару рідини три краплі і переносять на предметне скло для мікроскопії. Яйця фасціол під дією солей флотаційних розчинів деформуються.

1.3. Методи гельмінтоларвоскопії

Ларвоскопія (*larva* – личинка, *skopeo* – дивлюся) використовується з метою виявлення личинок гельмінтів та визначення їх виду при діагностиці гельмінтозів — диктіокаульозу травоядних, протостронгільозу і мюллеріозу овець і кіз, елафостронгільозу оленів та інших стронгілятозів, рабдитатозів, філяріатозів і шистосоматозу тварин.

Методичні вказівки щодо проведення ларвоскопії. В теплий період року досліджувати проби фекалій на диктіокаульоз необхідно в день їх відбору, оскільки при температурі повітря 20°C та вище, личинки легневих гельмінтів можуть розвиватися уже через 14–17 год. При збільшенні часу від відбору фекалій до їх дослідження у фекаліях розвиваються личинки стронгілят шлунково-кишкового тракту, що ускладнює визначення їх до виду. При виявленні в досліджуваному матеріалі на предметному склі великої кількості рухливих личинок нематод їх приводять у стан нерухомості. Для цього або підігрівають предметне скло, або у пробірку з осадом додають 2–3 краплі розчину із 2 частин рідини Барбагалло, 2 частин дистильованої води і 1 частини 5 %-го розчину йоду. Після цього осад ретельно змішують і переносять на предметне скло для мікроскопії. Личинки стають нерухомими, а структура їх не порушується.

Для диференціації личинок диктіокаул від інших личинок до осаду у пробірці або на предметне скло додають 1–2 краплі 0,1 %-го розчину метиленового синього. Осад ретельно розмішують і через 20–30 секунд проводять мікроскопію. При цьому личинки диктіокаул від овець фарбуються в яскраво-бузковий колір, а личинки диктіокаул від телят – в світло-бузковий колір. Личинки інших нематод не фарбуються. Рештки корму фарбуються в зелений колір, а рідина – в блакитний. Якщо у личинок диктіокаул закінчилася линька, то фарбується тільки кутикула і чохлик.

Личинки диктіокаул від телят рухаються в'яло, вони мають 8-подібну форму, а личинки стронгілят шлунково-кишкового тракту є більш активними, і за розмірами – в 2 рази більші за личинок диктіокаул.

При температурі повітря 40°C і вище у личинок диктіокаул знижується рухлива активність. Тому, при дослідженні фекалій проби необхідно охолоджувати до 20–25°C або досліджувати рано вранці, щоб активізувати личинок. До того ж, при масовій линьці личинок сповільнюється їх вихід у воду, що необхідно враховувати при дослідженнях.

Личинки диктіокаул від овець знаходяться на поверхні фекальних кульок, тому при дослідженні не слід порушувати їх структуру.

Проби фекалій для дослідження необхідно брати вагою 5–20 г. При збільшенні ваги проби фекалій кількість виділених личинок зменшується.

Метод Бермана і Орлова використовують для діагностики диктіокаульозу, протостронгілідозів та інших нематодозів тварин. Для дослідження проб фекалій за даним методом використовують апарат, що складається з лійки, гумової трубки довжиною 10–15 см, сполученої верхнім кінцем з лійкою, та затискача, закріпленого на нижньому кінці гумової трубки. Пробу фекалій (10 г) загортають у марлю і поміщають у лійку. Попередньо лійку заливають теплою водою (35–38°C). Апарат з пробною фекалій від овець і кіз залишають у спокої при кімнатній температурі на 3–5 год., від великої рогатої худоби – на 12 год., від коней – на 8–12 год. За цей час личинки гельмінтів виходять із проби фекалій у воду і опускаються по гумовій трубці до перекриття її затискачем. Потім затискач на трубці послаблюють, а рідину, що втікає, збирають у пробірку і центрифугують 2–3 хв. при 1500 об./хв. Після цього верхній шар рідини зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії. Личинки гельмінтів рухливі і добре виявляються у рідині.

Метод Бермана, модифікований І. А. Щербовичем (1952), використовують для діагностики диктіокаульозу тварин. Пробу фекалій (5–10 г) загортають у марлеву серветку розміром 8×8 см, а кінці її з'єднують дротом. Фекалії у підвішеному стані поміщають у склянку, наповнену водою при температурі не вище 35°C. Проби від овець і коней витримують у спокої 3 години, а від великої рогатої худоби – 12–16 год. Після відстоювання проби фекалій витягують із склянки, а воду зливають, залишаючи таку кількість осаду, яка необхідна для наповнення центрифугальної пробірки. Проби центрифугують 1 хв. при 1000 об./хв. Після чого рідину з пробірки зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

Прискорена діагностика диктіокаульозу овець і кіз за Г. О. Котельниковим та В. М. Хреновим. Метод ґрунтується на збудженні рухливої активності личинок гельмінтів під дією розчину сульфату цинку та одночасної флотації личинок у поверхневий шар рідини. Така ларвоцидна дія розчину виявлена у відношенні до личинок стронгілят шлунково-кишкового тракту тварин та стронгілоїдесів.

Пробу фекалій вагою 5 г кладуть у склянку з насиченим розчином сульфату цинку (сірчаноокислий цинк) і ретельно перемішують упродовж 1–2 хв. Через 5–10 хв. пробу фекалій витягують, а суміш у склянці залишають для відстоювання на 10–15 хв. Потім з поверхневого шару суміші знімають 3 краплі і переносять на предметне скло для мікроскопії.

Седиментаційний метод за Г. О. Котельниковим, А. І. Корчагіним та В. М. Хреновим використовують для діагностики легеневих гельмінтозів тварин. В основі методу лежить принцип дії на личинок нематод відцентрової та доцентрової сил. Враховуючи, що личинки нематод знаходяться на поверхні фекалій овець чи кіз, то при центрифугуванні під дією відцентрової сили вони звільняють фекалії, а під дією доцентрової сили осідають на дно пробірки.

Пробу фекалій (3–5 г) кладуть у пробірку з водою, температура якої 25–26°C. Пробірку центрифугують 2 хв. при 1500 об./хв. Потім фекалії виймають пінцетом із пробірки, воду зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії. Діагностична ефективність даного методу досягає 100 % та перевищує метод Бермана і Орлова в 4,5 рази.

Метод Вайда використовують для діагностики легеневих гельмінтозів дрібних жуйних тварин. На предметне або годинникове скло кладуть декілька кульок фекалій тварин і додають невелику кількість води при температурі 40°C. Через 40 хв. фекалії видалають і проводять мікроскопію рідини, що залишилася на склі. Ефективність методу не перевищує 70 %.

Метод Вайда, модифікований В.І.Гайворонським. Попередньо в пробірку, висотою 15 см та діаметром 16 мм, вставляють мідний дріт з 5–6 завитками спіралі діаметром 10 мм і заливають водою при температурі 40°C. В пробірку кладуть 8–12 кульок фекалій від овець чи кіз і ставлять в штатив. Через 3–6 год фекалії за допомогою дроту витягують із пробірки, воду зливають, а осад переносять на годинникове скло для мікроскопії.

Модифікації методу Бермана і Орлова для діагностики стронгілоїдозу.

1). Пробу фекалій (5 г) кладуть в склянку, добавляють 15–20 мл води при температурі 40°C і ретельно розмішують. Через 20–30 хв. рідину зливають в центрифугальну пробірку і центрифугують 1–2 хв. при 1000 об./хв., або залишають у спокої на 10–15 хв. Потім надосадову рідину зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

2). Пробу фекалій (20 г) кладуть у серветку з марлі і переносять у склянку з теплою водою. Через 1,5 години фекалії видалають, а рідину центрифугують 1–2 хв. при 1000 об./хв. Після цього над осадову рідину зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

2. Гельмінтологічні методи дослідження об'єктів доквілля

Зараження тварин та людей більшістю збудників гельмінтозів відбувається в навколишньому середовищі, де накопичуються інвазійні яйця та личинки гельмінтів. Для тварин це: приміщення, ґрунт, гній, пасовища, водойми, предмети догляду, корми.

Таким чином, гельмінтологічні дослідження об'єктів доквілля проводять з метою:

1. вивчення епізоотології гельмінтозів;
2. визначення ступеня забрудненості об'єктів доквілля збудниками гельмінтозів;
3. вивчення строків розвитку та виживання яєць і личинок гельмінтів;
4. проведення ветеринарно-санітарного контролю за об'єктами доквілля;
5. вивчення ефективності антигельмінтиків, дезінвазійних препаратів та оздоровчих заходів у цілому.

2.1. Дослідження проб ґрунту та зскрібків із об'єктів тваринницьких приміщень

Проби з поверхні ґрунту (1–3 см) поблизу тваринницьких приміщень, територій помешкань людей, пасовищ, городів та полів, у які вносили гній відбирають ложкою, совочком або шпателем, а з глибини 10–60 см – лопатою або буром Некрасова. З кожної ділянки, яка підлягає дослідженню, відбирають одночасно проби ґрунту по 50 г з різних місць, від 5 до 10 наважок по діагоналі. Відстань між місцями взяття проб не більше 10 м. Після ретельного перемішування наважок ґрунту відбирають середню пробу 100–200 г, яку переносять у банку з притертою пробкою. В банку вкладають етикетку із зазначенням місця взяття, глибини, характеру ґрунту (відкритий, затемнений чи освітлений сонцем), наявність рослинності та інших факторів.

Зскрібки з підлоги, стін, станків, предметів догляду за тваринами та проходів тваринницьких приміщень і вигульних двориків для тварин відбирають шпателем або совочком. Зскрібки з підлоги роблять в різних місцях по двох діагоналях. Відстань між взяттям зскрібків повинна бути не більше 5 м. Якщо тварини утримуються в станках, то в кожному із них беруть зскрібки по одній діагоналі, але не менше з трьох місць. Проби зскрібків, взяті з одного приміщення та з одних і тих же об'єктів, об'єднують і ретельно перемішують. Для дослідження відбирають від загальної кількості 15–25 г зскрібків окремо із кожного об'єкта тваринницького приміщення чи вигульного дворика.

Метод Романенко М. О. (1968) і Гуджабідзе Г. Ш. (1969). Пробу ґрунту 25 г переносять у центрифугальну пробірку об'ємом 250 мл (якщо пробірка об'ємом 80–100 мл, то беруть 15 г ґрунту) і заливають 3 % розчином натрієвого або калієвого лугу у співвідношенні 1:1. Вміст пробірки ретельно перемішують за допомогою електромішалки або палички

зі скла і залишають у спокої на 20–30 хв., а потім центрифугують 5 хв. при 800 об./хв. В подальшому надосадову рідину зливають, а ґрунт промивають від 1 до 5 разів водою, в залежності від типу ґрунту (для піщаного і супіщаного достатньо одного разу, а для чорнозему і глинистого ґрунту – від 2 до 5 разів) до отримання прозорої надосадової рідини. Потім до проби, після останнього зливання води, додають 150 мл (45 мл для пробірки об'ємом 100 мл) насиченого розчину нітрату натрію (питома вага 1,38–1,40), ретельно розмішують і центрифугують. Пробірки переносять в штатив і доливають флотаційний розчин до рівня на 2–3 мм нижче країв пробірки та накривають предметним склом. Обов'язково залишають простір 10 мм між склом і краєм пробірки для внесення піпеткою флотаційного розчину, щоб він торкався до нижньої поверхні предметного скла. Після цього предметним склом закривають повністю центрифугальну пробірку. Через 20–25 хв., скло знімають, перевертають нижню поверхню доверху, наносять краплю 50 %-го розчину гліцерину і проводять мікроскопію. На місце предметного скла кладуть інше, яке також переглядають під мікроскопом.

Ефективність методу від 59,6 % до 83,1 % (в середньому 73,0 %). Даним методом виявляються яйця аскарисів, трихурисів, стронгілят, у яких питома вага коливається в межах від 1,064 до 1,185. Для виявлення яєць інших гельмінтів (фасціол, парамфістом, дикроцелій, макраканторинхусів), у яких питома вага перевищує показник 1,3 використовують флотаційний розчин нітрату свинцю або суміш двох розчинів – нітрату амонію та хлориду цинку у співвідношенні 2:1,3 щільністю 1,5.

Метод дослідження проб ґрунту та зскрібків об'єктів тваринницьких приміщень за О. І. Корчагіним (1985). Пробу ґрунту вагою 20–25 г, а зскрібків об'єктів тваринницьких приміщень – 10–15 г, переносять у центрифугальні пробірки об'ємом 250 г (якщо пробірки об'ємом 150 г, то, відповідно, зменшують вагу досліджуваного матеріалу і розчину) і додають 80–100 мл 3 %-го розчину їдкого натру чи калію. Суміш ретельно перемішують і центрифугують 3–5 хв. при 1000 об./хв. Надосадову рідину зливають, а до осаду додають 150 мл води, ретельно перемішують і знову центрифугують при тих же показниках. Надосадову рідину знову зливають, а до осаду додають один із флотаційних розчинів нітрату амонію (гранульована аміачна селітра) чи нітрату натрію. Суміш ретельно перемішують, фільтрують через шар марлі в іншу пробірку і знову центрифугують при тих же показниках. Потім пробірки переносять у штатив і доливають флотаційний розчин до рівня на 2–3 мм нижче вінця пробірки.

Предметні скельця, розміром 60×50 мм, протирають гліцерином і накривають ними пробірки, залишаючи щілину 5–7 мм. через яку піпеткою доливають флотаційний розчин, щоб він торкався до нижньої поверхні скельця. Через 20–25 хв. предметні скельця знімають і, не перевертаючи, переносять на інше скло більшого розміру, на поверхню якого нанесена

сітка, яка забезпечує швидке виявлення та підрахунок яєць гельмінтів, що підвищує ефективність мікроскопії.

За іншим варіантом після центрифугування суміші з флотаційним розчином пробірки переносять у штатив і через 20–25 хв. із кожної пробірки знімають за допомогою дротяної петлі по 3 краплі поверхневої плівки на предметне скло для мікроскопії.

У США з метою виявлення яєць токсакар використовують флотаційні розчини сульфату цинку чи сульфату магнію у суміші з 5 %-им розчином йодиду калію.

Дослідження проб ґрунту з метою виявлення яєць опісторхісів за Г. О. Котельниковим і Л. О. Кузьменко. Пробу ґрунту вагою 15 г переносять до центрифугальної пробірки об'ємом 150 мл і заливають 3 %-им розчином їдкою калію чи натру у співвідношенні 1:1. Пробу ретельно перемішують і ставлять в шютель-апарат на 40–60 хв. Потім пробу залишають у спокої на 20–25 хв., а після цього центрифугують 5 хв. при 800 об./хв. Надосадову рідину зливають, а осад промивають водою від 1 до 5 разів. Після останнього зливання води до осаду додають 100 мл розчину хлориду цинку (щільність 1,5), ретельно перемішують і центрифугують при тих же показниках. Пробірки переносять у штатив і накривають предметними скельцями, обробленими гліцерином, залишаючи отвір, куди добавляють флотаційний розчин, щоб він доторкався до нижньої поверхні скельця. Після цього скельцем повністю закривають отвір пробірки. Через 25–30 хв. скельця знімають, перевертають нижню поверхню доверху і проводять мікроскопію. Із однієї пробірки досліджують 3–4 скельця. На другому і третьому скельцях виявляється більша кількість яєць опісторхісів, проте, вони під час дослідження деформуються.

Дослідження ґрунту з метою виявлення личинок гельмінтів.

Метод Бермана. Пробу ґрунту вагою 20–40 г загортають у марлю і переносять на металеве ситечко або ситечко для молока, яке знаходиться у лійці апарату Бермана. Лійку заповнюють водою, при температурі 40°C до повного занурення проби ґрунту у воду і залишають у спокої на 3–4 години. Можна апарат Бермана із пробою ґрунту помістити в термостат при температурі 37°C. За цей час живі личинки гельмінтів під дією тепла виходять із ґрунту і опускаються на дно пробірки апарату Бермана. Після цього пробірку відокремлюють від лійки, поверхневий шар рідини зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії. Ефективність дослідження підвищується, коли рідину у пробірці перемішують, переносять у центрифугальну пробірку і центрифугують 3 хв. при 1000 об./хв. Надосадову рідину зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

Метод В. С. Борисенко (1979). Використовують з метою виявлення у ґрунті личинок *Strongiloides stercoralis*. Пробу ґрунту вагою 20 г загортають у марлю, переносять до склянки і заливають теплою водою. Через 1.5 години (за цей час личинки виходять із ґрунту у воду) пробу викидають, а осад переносять до центрифугальної пробірки, центрифугують

3 хв. при 1000 об./хв. Надосадову рідину зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії. Спосіб не поступається за ефективністю методу Бермана.

Метод Гнедіної. Пробу ґрунту вагою 10 г переносять до склянки, заливають водою, ретельно перемішують паличкою зі скла і залишають у спокої на 5 хв. Після цього поверхневий шар рідини зливають в іншу склянку, а до осаду додають нову порцію води і знову відстоюють 5 хв. Промивання ґрунту проводять декілька разів, доки вода у склянці над осадом не буде прозорою. Потім воду, якою промивали ґрунт, переносять до центрифугальної пробірки і центрифугують 3 хв. при 1000 об./хв. Надосадову рідину зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

Дослідження проб ґрунту та піску на вміст яєць гельмінтів також доцільно проводити за «Способом копрологічної діагностики гельмінтозів і еймеріозів» (див. розділ 1.2.1).

2.2. Дослідження проб гною і стічних вод з тваринницьких ферм та комплексів

Проби гною та стічних вод досліджують з метою виявлення яєць і личинок гельмінтів, встановлення їх виду та визначення епізоотичної ситуації, а після знезараження його та перед внесенням у ґрунт сільськогосподарських угідь – виживаємість інвазійних елементів і ступінь забруднення ними довкілля. Проби гною з тваринницьких ферм та комплексів, в залежності від технології виробництва тваринницької продукції, відбирають в такій послідовності: спочатку гній, який надходить із виробничої зони (рідкий – вологість 96–98 %, напіврідкий – вологість 85–87 % та тверда фракція); а потім гній, який отримують після біологічного очищення (просвітлена рідка та тверда фракції).

Проби гною із резервуарів-накопичувачів (рідка фракція) та буртів (тверда фракція) відбирають за допомогою відбірника А. О. Черепанова із 3–5 місць, верхнього, середнього і нижнього шарів. Разовий об'єм однієї середньої проби рідкого гною складає 10 л, напіврідкого – 1 л. Після біологічного очищення рідкої фракції – 10 л, а при високому ступеню очищення – 20–30 л, твердої фракції – 1 кг.

Проби гною великих об'ємів (10–30 л) відбирають відрами і залишають у спокої на 30 хв. Після відстоювання поверхневий шар рідини зливають, а осад переносять на марлю, складену в 2 шари, і промивають водою. Отриманий фільтрат відстоюють, поверхневий шар рідини зливають, а осад переносять у літрові банки зі скла та наносять етикетки із зазначенням місця взяття проби. В теплий період року у проби додають 3–4 краплі толуолу і зберігають у холодильнику при температурі 3–4°C.

Проби твердої фракції відбирають із буртів і переносять до емкостей, які герметично закриваються.

Проби стічної води відбирають в такій кількості: до потрапляння води до очисних споруд – 2–3 л, після механічного очищення – 3–5 л, після

проходження стічної води через біологічні ставки чи поля фільтрації або поля зрошення – 10–15 л. Проби стічної води необхідно брати через кожну годину протягом доби порціями по 0,5–1 л. Потім, після ретельного перемішування, відбирають для дослідження 3–4 проби від кожного вищенаведеного об'єму.

Періодичність взяття проб гною така: із буртів – 1 раз на місяць; рідку фракцію гною та стічну воду після біологічного очищення – 1 раз на декаду.

Достовірні показники забруднення гною яйцями і личинками гельмінтів отримують при 3-ох разовому взятті проб, протягом 2–3 діб.

Дослідження проб гною від великої рогатої худоби. В гноєві від великої рогатої худоби виявляють яйця неоскарисів, стронгілят, трихурисів, моніезій, фасціол, парамфістом, дикроцелій та личинки інших гельмінтів. Для їх виявлення проби гною досліджують методом послідовних змивів. З метою прискорення промивання осаду можна використовувати центрифугування. Осад після промивання переносять на предметне скло для мікроскопії.

Дослідження проб гною від свиней. Пробу рідкого гною витримують у холодильнику 24–48 год., надосадову рідину зливають, а осад в кількості 25–30 мл переносять у склянку об'ємом 250 мл, заливають флотаційним розчином нітрату амонію до утворення випуклого меніску і накривають покривним скельцем. Через 30–45 хв. скельце знімають для мікроскопії.

Пробу твердої фракції гною вагою 20 г розділяють на 6 частин, переносять до склянок і додають до кожної по 40 мл флотаційного розчину нітрату амонію, ретельно перемішують і фільтрують через шар марлі у склянку об'ємом 250 мл. Останню доливають флотаційним розчином до утворення випуклого меніску, накривають покривним скельцем і витримують у спокої 30–45 хв. Після цього скельце знімають і проводять мікроскопію.

Дослідження проб твердої та рідкої фракцій гною за методом А. А. Черпанова (1972). Для дослідження відбирають проби гною (твердої фракції вагою 100 г, а рідкої – 500–1000 г). Пробу твердої фракції змішують з невеликою кількістю води, розтирають у фарфоровій ступці і фільтрують через два шари марлі. Фільтрат переносять до центрифугальної пробірки і центрифугують 3 хв. при 1500 об./хв. Надосадову рідину зливають, а до осаду додають розчин нітрату натрію і знову центрифугують. Потім у пробірки доливають флотаційний розчин до утворення випуклого меніску, накривають покривними скельцями, які знімають через 20 хв. для мікроскопії. Рідку фракцію гною після фільтрації досліджують цим же методом.

Дослідження проб стічної води за методом М. О. Романенко (1982). Пробу стічної води 1 л переносять у циліндр зі скла об'ємом 1200–1500 мл, додають один із коагулянтів: сульфат алюмінію, сульфат заліза чи сульфат міді в дозі 0,5–0,6 г і ретельно розмішують. При взаємодії

коагулянту з стічною водою відбувається хімічна реакція з утворенням осаду, що забезпечує осідання яєць гельмінтів на дно склянки. Через 40–50 хв. розчин у склянці просвітлюється. В подальшому піпеткою відсмоктують надосадову рідину, а осад переносять до центрифугальної пробірки і центрифугують 3 хв. при 1000 об./хв. Після цього воду зливають, а до осаду додають 2–4 мл 1–3%-го розчину хлористоводневої кислоти для його розчинення. Суміш ретельно розмішують, центрифугують, надосадову рідину зливають, а осад досліджують за методом М. О. Романенко та Г. Ш. Гуджабідзе (дослідження ґрунту).

Слід відмітити, що коагулянт можна додавати до проби стічної води під час транспортування або зберігання проб.

Проби осаду стічної води (вміст 97–98 %) відбирають кружкою або чашкою на 100 мл з 5–10 місць, переносять у склянки об'ємом 1 л, закривають притертою пробкою. В лабораторії від загальної проби відбирають 100–150 мл рідини, переносять до центрифугальної пробірки, об'ємом 250 мл (при об'ємі пробірки 84 мл беруть 30–45 мл рідини) і центрифугують 5 хв. при 1000 об./хв. Після цього воду зливають, а до осаду додають таку ж порцію чистої води, ретельно розмішують і знову центрифугують. Таким способом промивають осад 2–3 рази, а після останнього зливання води до осаду додають 3–5 г чистого піску і досліджують за методом М. О. Романенко (1968) і Г. Ш. Гуджабідзе (1969) «Дослідження ґрунту з метою виявлення яєць гельмінтів». Цим же методом досліджують проби напіврідкої (85–87 % води) та твердої фракцій (менше 70 % води).

2.3. Дослідження проб ґрубих і соковитих кормів

Проби трави і сіна досліджують з метою виявлення личинок стронгілат та адолескаріїв фасціол і парамфістом. Для дослідження беруть траву з пасовищ, яку зрізають на відстані 3–5 см від поверхні ґрунту. Потім траву розрізають на частини. Для дослідження використовують 200–500 г нижньої частини рослин, яку подрібнюють, переносять у лійку апарата Бермана і заливають водою при температурі 37°C. Необхідно використовувати лійку з верхнім діаметром 50 см. Через 1–2 години пробірку від'єднують від гумової трубки апарата Бермана, рідину переносять до центрифугальної пробірки і центрифугують 1–2 хв. при 1500 об./хв. Поверхневий шар рідини зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

Проби сіна відбирають у місцях його зберігання і проводять аналогічні дослідження.

Для виявлення адолескаріїв фасціол і парамфістом проводять відбір трави в біотопах молюсків – проміжних хазяїв трематод. На території Лісостепової зони України адолескаріїв фасціол виявляють з кінця червня до вересня на траві зволжених ділянок пасовищ, а також на рослинах, які виступають над поверхнею води. Масовий вихід церкаріїв парамфістом із молюсків та їх розвиток до стадії адолескаріїв відбувається у серпні. У вересні церкаріїв фасціол та парамфістом із молюсків не виходять.

Адолюскарії знаходяться на рослинах або на нижній поверхні листя поодинокі або групами. Вони легко виявляються неозброєним оком або при використанні лупи. Молоді адолюскарії фасціол – молочно-білого кольору, в подальшому вони набувають жовтого, а потім – темно-коричневого кольору.

В лабораторії, за допомогою голки та скальпеля, адолюскаріїв із зібраних рослин переносять на предметне скло у краплю фізіологічного розчину. Якщо адолюскаріїв підігріти до температури 37–38°C, то при мікроскопії всередині цист личинки активно рухаються. Добре видно ротовий та черевний присоски, кишечник, екскреторний міхур, що свідчить про життєздатність адолюскаріїв.

Адолюскарії парамфістом мають темний або коричневий колір, напівсферичну форму. Личинка всередині цисти має такі ж органи, що і личинка фасціол. Проте, черевний присосок – дуже великий, а ротовий – рудиментований.

З метою виявлення на пасовищах адолюскаріїв фасціол використовують **метод В. В. Горохова**. Методика досить проста і ефективна у виявленні неблагополучних щодо фасціольозу пасовищ. Враховуючи, що церкарії фасціол спроможні інцистуватися на листях та стеблах рослин і навіть на поверхні води, автором запропоновані скельця розміром 18×13 см і товщиною 1,5 мм, які виставляють вертикально в біотопах малого ставковика. Нижню частину скельць занурюють у ґрунт водоймища на 2–3 см, а над поверхнею води залишають 1–2 см поверхні скла. Церкарії, які активно рухаються у воді, зустрічають на своєму шляху скельця, до поверхні якого і кріпляться та інцистуються. В подальшому розвивається стадія адолюскарія. Дотримуючись особистої гігієни, скельця через 7 діб знімають для перегляду, а на їх місце, при необхідності, встановлюють інші. При наявності на поверхні скельць білих плям їх переглядають за допомогою лупи чи мікроскопу.

Загальновідомо, що розвиток і виживання яєць геогельмінтів перебувають у прямій залежності від абіотичних, у меншій мірі від біотичних факторів зовнішнього середовища. Одним з основних факторів передачі інвазії служить корм. Тому важливим етапом боротьби з гельмінтозами тварин є **визначення впливу температури повітря на розвиток та виживання яєць і личинок гельмінтів у грубих та соковитих кормах**. Для цього доцільно застосовувати методику, запропоновану співробітниками кафедри паразитології, ветеринарно-санітарної експертизи та зоогієни Житомирського національного агроекологічного університету **Фещенко Д. В. та Згозінською О. А.**

Точкові проби сіна відбирають вручну з різних місць валків (n=5) і на різній глибині. Таким чином з кожного валка беруть по 1 пробі сіна. 5 точкових проб складають у об'єднану, зразки перемішують та виділяють середню пробу.

Середні проби силосу (n=5) складають з проб, узятих з різних місць зберігання силосної маси та по всій товщині шару.

Середні проби сіна і силосу пакують у поліетиленові пакети для подальшого гельмінтологічного дослідження у лабораторії. Визначення виживання яєць і личинок гельмінтів проводять, використовуючи спосіб кількісного гельмінтоларвоскопічного дослідження. Для цього беруть комплект звичайних, бажано прозорих, поліпропіленових стандартних стаканчиків для гарячих і холодних продуктів об'ємом 100–150 мл, внутрішній діаметр дна яких – 4–4,5 см. Кожний комплект стаканчиків складається із зовнішнього і внутрішнього. На дні внутрішнього стаканчика роблять дрібні отвори діаметром 0,8 мм (сітку). У зовнішній стаканчик наливають 30,0 мл теплої води температурою 40°C. На дно внутрішнього стаканчика розміщують досліджувану пробу корму (5 г) і опускають його в перший до тих пір, аби розкладений шар корму лише стикався із теплою водою, а не занурювався в неї. Такий рівень занурення корму у теплу воду фіксується металевою паличкою (голкою від одноразових шприців), вставленою в стінку відповідної висоти внутрішнього стаканчика. Щоб вода в стаканчику швидко не вихолоджувалась і був стандартизований її температурний режим у різні періоди року і в різних умовах лабораторії, стаканчики з досліджуваними пробами ставлять у термостат при температурі 40°C або (за його відсутності) на кришку великого стерилізатора, в який попередньо наливають теплу воду відповідної температури і витримують протягом двох годин. За цей час внаслідок підсихання верхньої і зволоження нижньої частин корму личинки переходять в активний стан і мігрують у теплу воду. Вони не здатні плавати й осідають на дно зовнішнього стаканчика. Через 2 год. внутрішній стаканчик обережно виймають. Половину об'єму води із зовнішнього стаканчика виливають у першу центрифужну пробірку, а залишок рідини змішують із осадом і виливають у другу центрифужну пробірку. Для збереження втрати личинок дно зовнішнього стаканчика ополіскують чистою водою першої пробірки. Пробірки центрифугують при 1000 об./хв. протягом 2 хв. Після цього рідину із пробірок відбирають, а осад ресуспендують у 1 мл надосадової рідини. Проводять мікроскопію осаду (підрахунок личинок в одній краплі очної піпетки (0,05 мл) або в 1 мл суспензії, отриманої з 5 г корму).

Вміст яєць гельмінтів у кормах визначають за «Способом копрологічної діагностики гельмінтозів і еймеріозів» (див. розділ 1.2.1).

2.4. Дослідження проб води

Проби води для дослідження відбирають біля берегів відкритих водойм і на їх середині з поверхні та з різної глибини. З поверхні води відбирають проби в кількості 0,5–1 л, через кожні 3–5 хв., упродовж однієї години. Із колодязів та водогонів проби води відбирають три рази на день – вранці, в обід та ввечері. Одна проба повинна становити 20–25 л. При вивченні динаміки забрудненості води яйцями та личинками гельмінтів проби відбирають кожної пори року (І. М. Локтева та ін., 2005).

Метод З. Г. Василькової. Пробу води переносять у лійку Гольдмана і пропускають через фільтр з діаметром отворів 3–5 мкм або фільтрують за допомогою насоса Камовського. Після фільтрації фільтри переносять на предметні скельця для мікроскопії. З метою підвищення ефективності виявлення яєць гельмінтів роблять зскрібок із фільтра, який переносять на предметне скло у краплю 50 %-го розчину гліцерину, накривають покривним скельцем для проведення мікроскопії.

Воду можна фільтрувати через лійку Гольдмана з використанням паперового фільтру з подальшим дослідженням осаду. Замість паперового фільтру можна використовувати тканину – ситцеву, бавовняну, бязеву або шовкову. Тканину складають у два шари і кріплять за допомогою гумових кілець до нижнього краю металевої лійки. Після фільтрації води фільтр знімають з лійки, вирівнюють на рівній поверхні кювета і за допомогою предметного скла роблять зскрібки, які переносять у краплю 50 %-го розчину гліцерину для мікроскопії. Якщо осад на фільтрі густий, то його переносять у склянку з розчином нітрату натрію (щільність 1,38–1,4) і досліджують за методом флоатації. Після взяття зскрібків чи самого осаду фільтр переносять на предметне скло, вирівнюють і переглядають під малим збільшенням мікроскопу з метою виявлення яєць гельмінтів.

При відсутності лійки Гольдмана і фільтрів пробу води відстоюють протягом однієї доби, потім осад відбирають піпеткою, переносять до центрифугальної пробірки і центрифугують 1–2 хв. при 1500 об./хв. Після цього надосадову рідину зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії.

Дослідження проб води з метою виявлення фуркоцеркарів трематод. В кровноносній системі тварин паразитують орієнтобільхарції, а у водоплавної птиці – більхарції, тріхобільхарції, дендритобільхарції та інші трематоди із родини шistosоматид. Фуркоцеркарії, після виходу із моллюсків, плавають у воді, ведуть досить активний спосіб життя та агресивно нападають на тварин і людей. Частіше їх виявляють влітку у воді закритих водойм, серед заростей водних рослин, де живуть проміжні хазяї трематоди. Дослідники виявляли сотні тисяч фуркоцеркаріїв в 100 мл води. У тварин та людей вони викликають церкаріози – хвороби, що проявляються розчисуванням шкіри, «водяною коростою», дерматитами, підвищенням температури тіла, головними болями, порушенням сну та загальним пригніченням. Якщо не настає суперінвазії, то хвороба може проявлятися протягом тижня.

У США для виявлення фуркоцеркаріїв використовують метод фільтрації. До проби води при помішуванні додають формалін, для попередження злипання фуркоцеркаріїв, і фільтрують через шар нейлонової тканини (розмір отворів 50 мкм). Під дією формаліну, після фільтрації води, зафіксовані церкарії залишаються на тканині. В подальшому зскрібок переносять із тканини на предметне скло для мікроскопії.

3. Визначення життєздатності яєць та личинок гельмінтів

Під час мікроскопії виявляють яйця гельмінтів неправильної форми з непрозорим вмістом або з розірваними оболонками чи з гранулами та вакуолями всередині. Такі та інші ознаки деформації яєць гельмінтів свідчать про їх нежиттєздатність. Всередині таких яєць личинки гельмінтів розвиватися не будуть. Іноді виявляються аномальні, потворні яйця гельмінтів, проте, личинки всередині їх розвиваються нормально. В таких випадках необхідно визначити життєздатність яєць гельмінтів та здатність личинок розвиватися всередині їх до інвазійної стадії.

Життєздатність онкосфер бичачого і свинячого ціп'яків та інших тенід визначають за здійсненням рухів зародками при дії на них травних ферментів. Для цього яйця гельмінтів або онкосфери поміщають на годинникове скло, додають шлунковий сік собаки чи штучний дуоденальний сік (панкреатин – 0,5 г, харчова сода – 0,09 г і дистильована вода – 5 мл) та ставлять у термостат при температурі 38°C на 4 год. При цьому живі зародки звільняються від оболонок, а мертві – ні. Крім того, оболонки живих онкосфер розчиняються в підкисленому пепсині чи у лужному розчині трипсину через 6–8 год., при температурі в термостаті 38°C.

Якщо яйця тенід помістити в 1 %-ий розчин сірнистого натрію чи в 20 % розчин гіпохлориду натрію або в 1 % розчин хлорної води, а потім – в термостат при температурі 36–38°C, то живі та зрілі зародки звільняються від оболонок і не змінюються протягом доби. Незрілі та мертві онкосфери зморщуються або, навпаки, набухають, збільшуються в об'ємі, а потім лізуються впродовж 2 годин. Живі зародки тенід також активно рухаються в суміші 1 % розчину хлориду натрію, 0,5 % розчину бікарбонату натрію та жовчі при температурі в термостаті 36–38°C.

Життєздатність яєць монієзій визначають шляхом перенесення їх у краплю теплового водного розчину жовчі (1:20). При цьому у живих онкосфер гачки активно рухаються, а у мертвих – рух відсутній. При різкій зміні температури, від 5 до 40°C, у живих яйцях карликового ціп'яка простежується рух онкосфери.

Для визначення життєздатності яєць опісторхісів запропонований критерій розташування мікро- і макрогранул під час мікроскопії з відкритим конденсором мікроскопа. При цьому для живих яєць опісторхісів характерні ознаки: внутрішній вміст гомогенний; мікро-, макрогранули не контактують між собою; виявляється порожнина між стінкою личинки і шаралупою яйця. В мертвому яйці мікро- і макрогранули зливаються попарно та об'єднуються у вакуолі, виявляють деструкцію яйця.

Життєздатність яєць нематод, всередині яких розвиваються личинки, визначають за їх рухливою активністю та структурою. Для цього яйця нематод кладуть на предметне скло у краплю води і переносять на столик мікроскопа з підігрівом (можна використовувати столик Морозова).

Краплю води з яйцями гельмінтів підігрівають до температури 37–38°C і визначають рухливість личинок, які знаходяться всередині яєць або які вийшли із яєць, наприклад, личинки стронгілят, зібраних на пасовищах. Мертві личинки нематод – нерухомі.

Життєздатність зрілих яєць аскаридат, трихурат та оксіурат визначають легким надавлюванням препарувальної голки на покривне скло, під яким не предметному склі знаходяться яйця гельмінтів. При цьому живі личинки здійснюють активні рухи всередині яєць. Одночасно визначають розвиток личинок до інвазійної стадії за такими ознаками: у личинок аскаридат помітний чохлик, який на головному кінці відокремлений від тіла личинки; у личинок трихурат, які знаходяться у яйцях, на головному кінці добре видно стилет при великому збільшенні мікроскопа. Личинки, які загинули всередині яєць чи поза яйцевими оболонками розпадаються на фрагменти. Всередині вони мають зернисту структуру, їх тіло мутне, непрозоре з вакуолями, а кутикула має розриви.

У яєць деяких нематод, в тому числі аскаридат і трихурат, зовнішня оболонка яєць пігментована, що ускладнює проведення мікроскопії. Щоб визначити стан личинок в таких яйцях В. І. Винокуров (1986) рекомендує використовувати 20 % розчин гідропериту в суміші з 20 % розчином соляної кислоти. (4 частини розчину і 1 частина кислоти). При перенесенні яєць гельмінтів на предметне скло в краплю такої суміші через 1 год. оболонки яєць просвітлюються, всередині них добре видно личинок.

Життєздатність адолескаріїв фасціол, яких збирають з рослин та інших, об'єктів довкілля, визначають на предметному склі у фізіологічному розчині з використанням мікроскопа зі столиком для нагрівання. Під час нагрівання личинка всередині цисти активно рухається.

Життєздатність адолескаріїв парамфістом визначають за одним з наступних способів:

1). Адолескарії парамфістом переносять в розчин такого складу: трипсин – 0,4 г, сода харчова – 1 г, хлорид натрію – 0,8 г, вода дистильована – до 100 мл і 20 % від об'єму – свіжа жовч від великої рогатої худоби. В такому розчині через 1,5–2 год. виявляють при мікроскопії, активний рух личинок всередині цисти. Живі адолескарії парамфістом активно рухаються при витримуванні їх упродовж 2–3 год. в розчині пепсину, а потім – у розчині трипсину без додавання жовчі.

2). Адолескарії парамфістом кладуть у чашку Петрі і заливають 0,4–0,6 % розчином сірчастого натрію, який готують на 0,85 % розчині хлориду натрію. Чашки Петрі ставлять у термостат на 20–30 хв. при температурі 37–38°C. Через 10–15 хв. личинки парамфістом, якщо вони живі, активно рухаються всередині цисти, а через 20–25 хв. виходять із них і рухаються на дні чашки Петрі. Життєздатні личинки парамфістом можуть жити в такому розчині до 48 год.

Визначення життєздатності яєць та личинок гельмінтів шляхом їх фарбування. Мертві тканини яєць та личинок гельмінтів значно краще і швидше фарбуються, ніж живі. Така особливість використовується для

визначення життєздатності яєць та личинок гельмінтів. Проте, деякі фарби краще сприймаються живими, ніж мертвими тканинами. Отже, для розпізнавання живих і мертвих яєць та личинок гельмінтів використовують декілька способів.

1). Фарбування метиленовим синім ґрунтується на тому, що жива клітина чи тканина редує метиленову синь в безколірну лейкобазу, а мертва не редує. Завдяки цьому живі клітини та тканини не фарбуються, а мертві фарбуються метиленовим синім. Для фарбування яєць та личинок гельмінтів використовують: суміш із метиленового синього – 0,05 г, їдкого натру – 0,5 г та кислоти молочної – 15 мл. При фарбуванні яєць гельмінтів концентрацію фарби збільшують у два рази, бо яйця знаходяться у краплі води і при змішуванні фарби з водою концентрація першої зменшується. Яйця гельмінтів з краплею води переносять на предметне скло, додають краплю фарби і, через деякий час, проводять мікроскопію. Якщо личинка фарбується в синій колір, то яйце мертво. Інколи в мертвому яйці зародок не фарбується, це пов'язано з тим, що після загибелі останнього волокниста оболонка яйця не втратила своєї функції, і фарба не проникає всередину овоскопічного елемента.

Метиленовим синім швидко фарбуються яйця тенід та яйця тих гельмінтів, оболонки яких безколірні.

2). Фарбування яєць гельмінтів розчином сафраніну в розведенні 1:3000. При нанесенні 3–4 крапель розчину сафраніну на препарат нежиттєздатні яйця гельмінтів фарбуються за 2–3 хв. в червоний колір, а живі – фарби не сприймають. (А. С. Березкін, 1976).

3). З метою визначення життєздатності яєць опісторхісів та онкосфер бичачого ців'яка спочатку їх фарбують розчином толуїдинового синього 1:1000 (мертві онкосфери бичачого ців'яка можна фарбувати і розчином бриліанткрезилового синього 1:10000). Після фарбування яйця і онкосфери гельмінтів промивають чистою водою і додатково фарбують сафраніном (1:10000, 10–20%-го розчину спирту). Спирт витісняє першу фарбу з оболонки яєць і онкосфер, а сафранін фарбує в червоний колір. В результаті цього живі яйця і онкосфери фарбуються в червоний колір, а у мертвих зародок набуває синього кольору, оболонка залишається червоною (В. Н. Дроздов, 1961).

Визначення життєздатності яєць та личинок гельмінтів за способом біологічної проби. При використанні цього способу необхідно мати достатню кількість інвазійних елементів (яєць і личинок) та лабораторних тварин, заздалегідь відомих, як дефінітивних чи проміжних хазяїв гельмінтів. Необхідно також враховувати індивідуальну резистентність дефінітивних та проміжних хазяїв, яка обумовлена генотипом. Інтенсивніше заражаються тварини, які мають імунний дефіцит та ті тварини, раціон яких наближений до природної годівлі. Необхідно також враховувати специфічність гельмінтів до тих або інших дефінітивних чи проміжних хазяїв.

Для визначення життєздатності яєць гетероксенних гельмінтів використовують відповідних проміжних хазяїв – не уражених збудниками інвазійних хвороб (попередньо проводять їх дослідження на наявність личинкових стадій гельмінтів). Доцільно для дослідів використовувати проміжних хазяїв, яких отримували в лабораторних умовах. Вони більш стійкі до умов навколишнього середовища, і робота з ними дає, в більшості випадків, позитивні результати. Слід відмітити: якщо проміжні хазяї, які за попередніми дослідженнями були уражені личинками того ж виду гельмінта, якими будуть заражатися експериментально, то їх зараження буде ускладнене або взагалі неможливим. Спрацьовує принцип Гаузе: якщо два види гельмінтів локалізуються і паразитують в одному органі, то один з них частіше витісняє іншого, не дає йому інтенсивно розвиватися. Отже, два види гельмінтів з однаковими вимогами не можуть існувати разом.

Для визначення життєздатності адолескаріїв фасціол, метацеркаріїв дикроцелій, опісторхів, метагонімусів та інших трематод проводять зараження лабораторних тварин (золотистих хом'яків, білих мишей і шурів, морських свинок, кроликів та інших). Особливо добре розвиваються трематоди в організмі золотистих хом'яків. Для зараження лабораторних тварин, виявлених на рослинах адолескаріїв фасціол, зскрібають у воду і вводять піпеткою, через рот всередину, не менше 25–30 екземплярів на тварину. Якщо тварини заразилися, то яйця фасціол виявляють у фекаліях кроликів через 2 місяці, морських свинок – через 50 діб, мишей – через 35–40 діб.

Для зараження лабораторних тварин яйцями аскарид необхідно мати не менше 80–100 овоскопичних елементів на тварину. При зараженні мишей яйця гельмінтів задають всередину через рот піпеткою з водою. Через 6–7 діб проводять забій мишей і дослідження печінки та легень. Для цього органи подрібнюють ножицями і поміщають в апарат Бермана. Через 2–3 години личинки виходять із шматочків печінки та легень і опускаються на дно пробірки. Осад із пробірки переносять в центрифугальну пробірку і центрифугують 1,5–2 хв. зі швидкістю 1000 об./хв. Після цього надосадову рідину зливають, а осад переносять на предметне скло для мікроскопії. При дослідженні печінки, якщо яйця були інвазійні, виявляють личинок аскарид білуватого кольору з темним вмістом в ділянці кишечника, довжиною 0,23–0,3 мм, шириною 0,011–0,017 мм. При дослідженні легень виявляють подібних личинок, проте їх довжина досягає 0,65–1,12 мм. Якщо при дослідженні печінки чи легень личинки не виявляються, значить тварини не заразилися, що свідчить про нежиттєздатність яєць гельмінтів, або вони були не інвазійними.

Для підвищення приживаємості личинок моноксенних нематод в лабораторних умовах проводять зниження у тварин імунної резистентності. Це досягається шляхом введення в організм тварин імуносупресорів із групи кортикостероїдів. Наприклад, преднізолон, особливо гідрокортизон, розведений у стерильній дистильованій воді і введений внутрішньом'язово дослідним мишам чи морським свинкам у дозі 60–80 мг/кг маси тіла,

збільшує приживаємість личинок трихінел при експериментальному зараженні за рахунок зменшення вмісту в крові тварин кількості Т-клітин та пригнічення їх реакції на антиген гельмінтів (Е. В. Переверзева, 1981; Д. А. Гемірбенів та ін., 1987).

Контрольні питання:

1. Опишіть основні принципи дії флотації, седиментації та комбінованих флотаційно-седиментаційних методів копроовоскопії.
2. Основні принципи приготування флотаційних розчинів.
3. Різновиди флотаційних, седиментаційних та комбінованих флотаційно-седиментаційних методів.
4. Основні методики гельмінтоларвоскопії. Який їх принцип дії?
5. Методика відбору проб ґрунту, зіскрібків із об'єктів тваринницьких приміщень, гною, стічних вод, грубих і соковитих кормів та води для гельмінтологічних досліджень.
6. Методи гельмінтологічного дослідження ґрунту та зіскрібків із об'єктів тваринницьких приміщень, принцип їх дії.
7. Методи гельмінтологічного дослідження гною та стічних вод, принцип їх дії.
8. Методи гельмінтологічного дослідження грубих і соковитих кормів, принцип їх дії.
9. Методи гельмінтологічного дослідження води, принцип їх дії.
10. Опишіть основні методики визначення життєздатності яєць гельмінтів.

Список рекомендованої літератури:

1. Атлас гельмінтів тварин / І. С. Дахно, А. В. Березовський, В. Ф. Галат [та ін.] – К.: Ветінформ, 2001. – 118 с.
2. Березанцев Ю. А. Гельминтологическая копрологическая диагностика / Ю. А. Березанцев, Е. Г. Автушенко // Л.: Медицина. – 1976. – С. 102-171.
3. Давыдов О. Н. Глистные инвазии человека, приобретаемые от животных / О. Н. Давыдов // К.: Фирма «ИНКОС», 2006. – С. 76–78.
4. Дахно І. С. Екологічна гельмінтологія / І. С. Дахно, Ю. І. Дахно. – Суми, 2010. – 220 с.
5. Дахно І.С. Ефективність копроовоскопічних методів діагностики нематодозів коней / І.С. Дахно, Л.М. Лазоренко // Наук. вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – Львів, 2010. – Т. 12. – №2 (44). – Ч.1. – С. 71–73.
6. Довгій Ю. Ю. Методика культивування яєць *Toxocara canis* у лабораторних умовах / Ю. Ю. Довгій, Т. І. Бахур // Ветеринарна медицина України. – 2012. – № 8 (198). – С. 20–21.
7. Довгій Ю. Ю. Порівняльна ефективність копроовоскопічних методів діагностики інвазійних хвороб тварин / Ю. Ю. Довгій, Д. В. Фещенко, Т. І. Бахур та ін. // «Вісник ЖНАЕУ» – 2012. – № 1. – Т. 3. – Ч. 1. – С. 54–57.
8. Догель В. А. Общая паразитология / В. А. Догель // Л.: Изд-во ЛГУ, 1962 – 463 с.
9. Дубина И. Н. Гельминтозы собак: монография / И. Н. Дубина // Витебск: УО ВГАВМ, 2006. – 200 с.
10. Калинина О.И. Биология гельминтов и профилактика гельминтозов : уч. пособие / О.И. Калинина. – Владивосток: Изд-во ТГЭУ, 2005. – 80 с.
11. Котельников Г. А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды / Г. А. Котельников // М.: Колос, 1984. – 125 с.
12. Котельников Г. А. Диагностика гельминтозов животных / Г.А. Котельников // М.: Колос, 1974. – С. 240.
13. Найпоширеніші інвазійні хвороби свійських тварин в Україні / Ю. Ю. Довгій, О. А. Дубова, Т. І. Бахур та ін. – Житомир: Полісся, 2012. – 272 с.
14. Никитин А. Ф. Лабораторная диагностика паразитарных болезней / А. Ф. Никитин, Д. Т. Жоголев, Ю. Ф. Захаркив и др. // Мед. технологии. — М.: Интермедика, 1998. – Т. 1. – С. 327–388.
15. Павлов А. В. Биологическое загрязнение окружающей среды и здоровье человека / Павлов А. В., Романенко Н. А., Хижняк Н. И. // К.: Здоровье, 1992. – 325 с.
16. Паразитология и инвазионные болезни животных [Акбаев М.Ш., Водянов А.А., Косминков Н.Е. и др.]. – М.: Колос, 1998. – 743 с.
17. Патент України на корисну модель № 66145, МПК (2011.01), А61D99/00 Спосіб копрологічної діагностики гельмінтозів і еймеріозів / Ю.Ю. Довгій, Д.В. Фещенко, В.А. Корячков, О.А. Згозінська, Т.І. Бахур, О.В. Стахівський; заявник та власник Житомирський національний агроекотологічний університет. – № у 2011 06852; заявл. 31.05.2011; опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.

18. Романенко Н. А. Санитарная паразитология / Н. А. Романенко // Москва, 2001. – 168 с.
19. Трухачев В.И. Научные основы экологической паразитологии / В.И. Трухачев, В.П. Толоконников, И.О. Лысенко. – Ставрополь: Изд-во СтГАУ «АГРУС», 2005. – 413 с.
20. Фещенко Д.В. Сравнительная эффективность флотационных копроовоскопических методов диагностики нематодозов животных / Д.В. Фещенко, Т.И. Бахур, О.А. Згозинская // Мат. IV междунар. конф. «Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса»: Сборник науч. тр. ФГБНУ ВНИИОК, Ставрополь, 2015. – Т.1. - № 8. – С. 550–552.
21. Klei T.R. Laboratory diagnosis / T.R. Klei // Veter. Clin. N. America: Equine Pract. – 1986. – Vol. 2. – № 2. – P. 381–393.

