Коколова Людмила Михайловна
Гаврильева Любовь Юрьевна
Слепцова Светлана Степановна

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ
ЯИЦ И ЛИЧИНОК СТРОНГИЛЯТ У ЛОШАДЕЙ
ТАБУННОГО СОДЕРЖАНИЯ В ЯКУТИИ**

Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени
М.Г. Сафронова – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федеральный исследовательский центр
«Якутский научный центр,
Сибирского отделения Российской академии наук»

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ ЯИЦ И ЛИЧИНОК
СТРОНГИЛ У ЛОШАДЕЙ ТАБУННОГО СОДЕРЖАНИЯ В
ЯКУТИИ**

(методическое пособие)

Якутск 2020

Методика определения численности яиц и личинок стронгилят лошадей табунного содержания в Якутии (методическое пособие) / Якут. НИИСХ. – Якутск, 2020. – с. 26

Методическое пособие разработали: Л.М. Коколова, доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией гельминтологии, Л.Ю. Гаврильева, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории гельминтологии, Слепцова С.С. аспирант лаборатории гельминтологии «Якутского научно-исследовательского института сельского хозяйства имени М.Г. Сафронова».

Изложена методика проведения исследований и определения численности яиц и личинок стронгилят лошадей табунного содержания.

Методическое пособие предназначено для проведения лабораторных исследований студентов, аспирантов, научных специалистов, практикующих ветеринарных работников, специалистов.

Рассмотрены и одобрены аттестационной комиссией обучения аспирантов ЯНИИСХ, НМС по ветеринарной медицине и Ученом Совете ЯНИИСХ (2020).

Рецензент – главный научный сотрудник лаборатории оленеводства и традиционных отраслей Якутского научно-исследовательского института сельского хозяйства имени М.Г. Сафронова – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Якутский научный центр, Сибирского отделения Российской академии наук», д.в.н. Винокуров Н.В.

Содержание

1.	Нормативные ссылки на действующие стандарты.....	4
2.	Общие положения и проведения лабораторной диагностики.....	5
3.	Требования безопасности и технические условия	6
4.	Термины и определения.....	8
5.	Отбор и подготовка проб фекалий для исследования	9
6.	Методы определения наличия яиц и личинок стронгилят.....	10
7.	Определение количества яиц стронгилят в фекалии лошадей.....	13
8.	Определение количество личинок стронгилят.....	15
9.	Практические предложения	22
10.	Использованная литература	25

1. Нормативные ссылки на действующие стандарты

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ Р 54001-2010 Удобрения органические. Методы гельминтологического анализа

ГОСТ Р 54627-2011 Животные сельскохозяйственные жвачные. Методы лабораторной диагностики гельминтозов

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

ГОСТ 12.1.018-93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

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

ГОСТ 61-75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 244-76 Натрия тиосульфат кристаллический. Технические условия

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

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии по стандартизации в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю "Национальные стандарты", который опубликован по состоянию на 1 января

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

2. Общие положения и проведения лабораторной диагностики

Общие положения методов лабораторной диагностики гельминтозов лошадей – по ГОСТ Р 54627 2011 Животные сельскохозяйственные жвачные. Методы лабораторной диагностики гельминтозов.[1]

Лабораторную диагностику гельминтозов животных проводят по показателям:

- экстенсивности инвазии;
- интенсивности инвазии;
- числа жизнеспособных яиц и личинок гельминтов определенных видов в количественном или процентном отношении к общему числу обнаруженных.

2.2 Численность обнаруженных яиц и личинок гельминтов соответствует требованиям стандарта ГОСТ Р 54627-2011. Группа С19.

2.3 По числу обнаруженных яиц и личинок гельминтов интенсивность инвазии у животных классифицируют в соответствии с таблицей 1.

3. Требования безопасности и технические условия

3.1 Сотрудники, выполняющие работу по отбору, доставке и анализу проб, должны иметь рабочую спецодежду: халаты, фартуки, перчатки, резиновую обувь по ГОСТ 12.4.011. Рабочие халаты подлежат обмену на чистые по истечении каждой рабочей недели. Спецодежду и обувь хранят в шкафах. Сотрудники должны быть обеспечены средствами и условиями для личной гигиены и обязаны соблюдать санитарно-гигиенические требования.

3.2 Требования безопасности при работе с химическими реактивами – по ГОСТ 12.1.007, с электрооборудованием – по ГОСТ Р 12.1.019. Требования пожарной безопасности – по ГОСТ 12.1.018. ГОСТ Р 51652-2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья.

Технические условия. Необходимо в лаборатории иметь шкаф вытяжной, холодильник электрический бытовой, любого класса, позволяющий поддерживать температуру от минус 6 °С до плюс 5 °С, по техническим характеристикам и условиям эксплуатации соответствующий требованиям ГОСТ 16317. Термостат электрический (типа ТС-1/80 СПУ или аналогичный), позволяющий поддерживать температуру от 5 °С до 60 °С с допустимой погрешностью $\pm 0,4^{\circ}\text{C}$. Центрифугу (типа ЦЛС-31 М со сменным ротором) с частотой вращения 1500-2500 об/мин. Микроскоп стереоскопический типа МБС, обеспечивающий 100-кратное увеличение. Осветитель к микроскопу ОИ-19 или аналогичного типа. Камеры счетные ВИГИСа. Столик нагревательный к микроскопу (столик Морозова). Весы с пределами допустимой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 5 мг и ± 10 мг по ГОСТ Р 53228.

Лабораторные инструменты: пинцеты анатомические, пинцеты хирургические, набор ареометров АОН-1 типа 1 (А1) с пределами измерений от 1,000 до 1,600 кг/см., аппарат Бермана, стаканы стеклянные вместимостью 30 см., петли металлические гельминтологические

диаметром 8-9 мм., штатив для пробирок лабораторный, столик с гнездами для воронок, кюветы эмалированные, кюветы почковидные, спиртовка СЛ-1 по ГОСТ 25336, часы песочные на 3-5 мин или сигнальные, металлические по ГОСТ 19126, ножницы анатомические, ножницы хирургические по ГОСТ 21239, прибор для уравнивания центрифужных пробирок вместимостью от 10 до 100 см ГОСТ Р 54627-2011, термометры технические стеклянные с пределами измерения температуры от 0°С до 100°С и от 100°С до 200°С по ГОСТ 28498, совки, портативные лопаты, пробоотборники, рН-метр, обеспечивающий измерение с погрешностью не более $\pm 0,01$ ед. рН., дозаторы пипеточные, термостат обеспечивающий поддержание температуры от 8°С до 35°С с допустимой погрешностью ± 2 °С, карандаши по стеклу (стеклографы), груши резиновые разных размеров, перчатки одноразовые, фартук клеенчатый, бумага фильтровальная по ГОСТ 12026, бумага пергаментная, емкости для отбора проб воды, органических удобрений, навоза, навозных стоков, осадков, пригодные для обеззараживания, из нейтральных материалов, канистры, ведра вместимостью 8-10 дм. ГОСТ Р 54627-2011, клеенка, полиэтиленовые пленка, пакеты, мешки, вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556, марля медицинская по ГОСТ 9412, стекла предметные размерами 25x75, 60x120 мм по ГОСТ 9284, стекла покровные размерами 18x18, 24x24 мм по ГОСТ 6672, чашки биологические Петри по ГОСТ 25336, стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 250, 400 и 1000 см. ГОСТ Р 54627-2011 и ГОСТ 25336, стаканы стеклянные 50-150 см. ГОСТ Р 54627-2011, чашки плоскодонные сферические вместимостью 1000 и 2500 см. ГОСТ Р 54627-2011, пипетки градуированные вместимостью 1-10 и 50 см. ГОСТ Р 54627-2011, воронки стеклянные по ГОСТ 25336, колбы конические вместимостью 50, 100 и 1000 см. ГОСТ 1770, стекла часовые разных размеров по ГОСТ 23932, цилиндры градуированные с носиком вместимостью 1, 25, 100, 200, 500 и 1000 см. ГОСТ Р 54627-2011 и ГОСТ 1770, палочки стеклянные, трубки резиновые длиной 20-30 см, банки

стеклянные с притертыми пробками разной вместимости (до 1000 см. ГОСТ Р 54627-2011, ступки и пестики фарфоровые разных размеров по ГОСТ 9147, эксикаторы с притертой крышкой, стаканы стеклянные высокие с носиком (ВН) вместимостью 50, 100 см. ГОСТ Р 54627-2011, стаканы аптечные вместимостью 50 и 100 см., пробирки центрифужные градуированные (ПЦГ) вместимостью 10 см. Вода дистиллированная по ГОСТ 6709, калий едкий по ГОСТ 24363, натрий хлористый по ГОСТ 4233, натрий хлористый, х.ч., на изотоническом растворе массовой долей 0,85% (для жидкости Барбагалло с 3%-ным формалином)., глицерин по ГОСТ 6259, хлорид цинка по ГОСТ 4529, формалин технический по ГОСТ 1625, кислота соляная по ГОСТ 3118, цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174, Цинк сульфат ГОСТ 4174-77, натрия тиосульфат по ГОСТ 244. х.ч., спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300, спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652, кислота молочная по ГОСТ 490, индикаторы бумажные для определения pH в диапазоне 6-8 ед. pH с интервалом деления 0,2, глицерин, Мелисептол рапид ГОСТ 12.1.007-76. Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

4. Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

4.1 гельминтозы: Паразитарные болезни животных, вызываемые гельминтами - паразитическими червями.

4.2 инвазия: Проникание в организм животного паразитов (гельминтов) с последующим развитием сложного патофизиологического процесса их взаимодействия.

4.3 интенсивность инвазии: Общее число яиц и личинок гельминтов, обнаруженных у обследованного животного, выраженное в экземплярах.

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

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

4.6 стронгилята. Яйца и личинки, относящий к классу нематода (Nematoda).

4.7 деляфондия. Яйца и личинки, относящий к классу нематода (Nematoda).

4.8 альфортия. Яйца и личинки, относящий к классу нематода (Nematoda).

4.9 трихонемотиды. Яйца и личинки, относящий к классу нематода (Nematoda).

5. Отбор и подготовка проб фекалий для исследования

Точечные пробы отбираются из фекалий животных, патологического материала, соскобов объектов внешней среды, промежуточных и дополнительных хозяев гельминтов. По 5 г от жеребят и 10 г от взрослых лошадей только что выделившегося испражнения. В последнем случае берут верхнюю часть фекалий, не соприкасающуюся с почвой и растительным покровом. Точечные пробы берутся от 50% поголовья табуна, но не менее чем от 30 животных каждой возрастной группы. От жеребцов берется от каждого животного. Отобранные точечные пробы фекалий упаковывается в герметичный сосуд, полиэтиленовый пакет или

пергаментную бумагу, на которых ставят номер пробы, дату, место. Отобранные точечные пробы доставляют в лабораторию в течение суток со времени взятия, до проведения испытаний в холодильнике при температуре 2 °С - 4 °С для задержки развития личинок нематод. При отборе точечных проб учитывают характерные патологоанатомические изменения и берут части кишечника, паренхиматозных органов. Для определения загрязненности объектов внешней среды яйцами и личинками нематод, отбирается из разных мест от трех до десяти соскобов (по 3 г) с объектов внешней среды также упаковывается в герметичный сосуд, полиэтиленовый пакет или пергаментную бумагу. Пробы доставляются в лабораторию в день отбора. Для определения зараженности лошадей яйцами и личинками нематод в летние месяцы в местностях, неблагополучных по гельминтозам, из разных мест отбираются фекалии. С сопроводительным документом, в котором указывают хозяйство (участок), число животных, содержания животных, возраст и пол, состояние животного, заболеваемость и смертность животных, продолжительность заболевания животных, наличие какого гельминтоза, дату отбора проб и отправления на исследование.

Все отобранные пробы, направляемые в лабораторию для испытаний, транспортируют в ящиках, имеющих гнезда для стандартной посуды, из лабораторных проб отбирают анализируемые пробы фекалий массой 1-5 г для проведения исследований методом овоскопии.

6. Методы определения наличия яиц и личинок стронгилят

Метод Фюллеборна для диагностики нематодозов анализируемую пробу массой 5 г заливают в ступке 3-5 см. тщательно размешивают пестиком или стеклянной палочкой и по мере размешивания добавляют раствор, доводя объем до 15 см. процеживают через сито в чистый стакан и отстаивают в течение 40 мин. За время флотации яйца нематод и цестод, удельный вес которых меньше веса насыщенного раствора хлористого

натрия, всплывают на поверхность и концентрируются на поверхностной пленке. Затем, прикасаясь металлической петлей к разным местам поверхностной взвеси, снимают три капли раствора и наносят на предметное стекло, и исследуют под микроскопом. Для недопущения быстрого высыхания и кристаллизации капель на предметных стеклах к ним добавляют по небольшой капле 50%-ного водного раствора глицерина. Металлическую петлю обжигают над пламенем спиртовки в начале и конце испытаний. При массовых исследованиях каплю на предметном стекле покровным стеклом не накрывают, а металлическую петлю промывают резкими движениями в стаканчике с дистиллированной водой. Флотационные методы основаны для определения наличия яиц нематод, личиночных стадий паразитических и свободноживущих нематод, а также члеников и половозрелых форм, всплывающих на поверхность флотационного раствора с исследуемого материала с помощью микроскопа.

Метод Котельникова-Хренова для диагностики нематодозов исследование проводится с помощью флотационного раствора нитрата аммония с изменением времени отстаивания после фильтрования жидкости до 10-15 мин.

Метод Бермана-Орлова для диагностики зараженности лошадей стронгилидами и трихонематидами 5 г анализируемой пробы фекалий заворачивают в кусочек марли и помещают в воронку на металлическое сито. Предварительно в воронку наливают дихлорированную воду температурой 40 °С. Заполненный анализируемой пробой фекалий и дистиллированной водой аппарат Бермана оставляют при комнатной температуре на 3 ч. Личинки нематод обладают термотропностью и благодаря этому перемещаются из анализируемой пробы фекалий в теплую воду и оседают на дно пробирки. Перед испытанием пробирки осторожно разъединяют с резиновой трубкой и быстрым движением, не встряхивая осадок на дне, сливают жидкость из пробирки до осадка. Так снимают все пробирки в аппарате и ставят их в штатив. Осадок разливают на часовые

или предметные стекла и микроскопируют. При осмотре под микроскопом личинки нематод подвижные, и их легко найти.

Комбинированный флотационный метод для диагностики нематодозов исследование проводят с помощью комбинированного флотационного раствора с изменением времени отстаивания после фильтрования жидкости до 10-15 мин.

Нами впервые применен Метод Mc.Master's для количественного исследования фекалий Метод Макмастера позволяет оценить количество гельминтов путем определения количество яиц нематод на грамм фекалий. Преимущество этой техники в том, что она быстра для подсчета яйца гельминтов освобожденных от посторонних примесей. Для этого:

1. Взвесьте 2 грамма фекалий.
2. Добавьте фекальный материал в 60 мл флотационного раствора $ZnSO_4$ в стакане *OVATECPlus*, fecal diagnostic devices. Энергично встряхиваем содержимое, чтобы оно распалось и гомогенизируйте образец фекалия. Вылейте $\frac{1}{2}$ содержимое через сито или обшитую марлей воронку во второй контейнер. Используя шпателем необходимо выжать как можно больше жидкости из материала, оставшегося в сите.
3. Сильно вращая, чтобы сохранить материал во взвешенном состоянии, из образа смеси с помощью пипетки и осторожно переноси ее в одну из камер Макмастера. Повторите процедуру, чтобы заполнить соседнюю камеру. Подождите 1-3 минут, чтобы яйца всплыли наверх, а мусор упал на дно камера.
4. Под 10-кратным увеличением подсчитайте яйца, которые попадают в сетку с обеих сторонкамера. (Не считайте яйца, выпавшие за пределы сетки.) Умножьте общее количество яиц в 2 камерах на 100; это количество яиц на грамм фекалий.

При определении наличия яиц и личинок нематод под микроскопом можно использовать соответствующий атлас яиц гельминтов лошадей.

Примечание – На препарате часто скапливается много личинок нематод, которых трудно дифференцировать из-за их подвижности. Для прекращения движения на предметное стекло с личинками нематод наносят 0,7 мл раствора Мелисептол рапид. Также личинки нематод можно обездвижить прибавлением двух-трех капель раствора, состоящего из двух частей жидкости Барбагалло, двух частей дистиллированной воды и одной части 5%-ного раствора йода. После этого осадок взбалтывают и выливают на стекло для микроскопирования. Личинки теряют подвижность без нарушения своей структуры.

7. Определение количества яиц стронгилят в фекалии лошадей

Для определения количества яиц нематод 1 г фекалий применяются счетная камера Горяева, счетная камера ВИГИСа, камера Макмастера и при отсутствии счетной камеры используется метод подсчета по капле пробы на предметном стекле.

Для подсчета яиц используя счетную камеру Горяева: 1 г фекалии тщательно размешивают в ступке, гомогенизируют дистиллированной водой. Полученную суспензию фильтруют через сито, и 10 см. фильтрат помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют с частотой вращения 2000 об/мин. в течение 2 мин. Затем жидкость из пробирки сливают, а к осадку добавляют 10 см. флотационного раствора хлористого натрия, тщательно перемешивают и делают подсчета яиц. Заполненную камеру Горяева или предметное стекло выдерживают в течение 2 мин, чтобы яйца нематод могли подняться к поверхности, и под микроскопом подсчитывают количество яиц нематод. Полученное число, умноженное на 100, показывает содержание яиц нематод в 1 г фекалий. Для более точного определения количества яиц используют две-три камеры.

Подсчет на камере ВИГИС: берем 2 г фекалий размешивают в ступке с 5 см. флотационного раствора аммиачной селитры и тщательно

перемешивают пестиком. По мере размешивания добавляют флотационный раствор и доводят до объема 15 см. Взвесь фильтруют через ситечко в чистый стакан с последующим отжимом содержимого в ситечко и тщательным размешиванием взвеси. Затем пастеровской пипеткой быстро переносят 0,5 см. взвеси в одну из ячеек счетной камеры и оставляют на 2 мин, после чего подсчитывают количество яиц нематод. При необходимости заполняют и другие ячейки взвесью пробы из того же стаканчика, но при этом каждый раз перед заполнением ячейки смесь перемешивают. Подсчет яиц нематод в ячейке проводят с помощью микроскопа при искусственном освещении. Для установления количества яиц в 1 г фекалий делают расчет по числу обнаруженных яиц в одной, двух или четырех ячейках. Для этого число яиц, выявленных в ячейке, умножают на 30, в двух ячейках – на 15, а в четырех – на 7,5.

С использованием метода подсчета по капле на предметном стекле, нанесенную 0,15 см. суспензию и накрываем покровным стеклом. Подсчет делается в поле зрения микроскопа. Полученное число при подсчете яиц нематод показывает ориентировочную интенсивность гельминтозной инвазии в одной капле анализируемой пробы.

На камере Макмастера под 10-кратным увеличением подсчитайте яйца, которые попадают в сетку с обеих сторон камеры (не считайте яйца, выпавшие за пределы сетки.) Умножьте общее количество яиц в 2 камерах на 100; это количество яиц на грамм фекалий.

По числу обнаруженных яиц и личинок гельминтов интенсивность инвазии у животных классифицируют в соответствии с таблицей 1.

Жизнеспособность обнаруженных яиц и личинок гельминтов определяют и подтверждают в соответствии с требованиями настоящего стандарта.

Таблица 1

Вид стронгилят	Интенсивность инвазии в зависимости от числа обнаруженных яиц гельминтов, экз./1 г фекалий			
	Низкая	Средняя	Высокая	Очень высокая
Стронгилюс <i>Strongylus equinus</i>	150-350	351-600*	601-1500	Св. 1500
Деляфондия <i>Delafondia vulgaris</i>	1-100	101-500*	501-1000	Св. 1000
Альфортия <i>Alfortia edentatus</i>	50-150	151-300*	301-1000	Св. 1000
Разные виды Трихонематид <i>Trichonematidae</i>	1-350	351-500*	501-1000	Св. 1000

- * у взрослых лошадей низкая интенсивность инвазии.

8. Определение количества личинок стронгилят

Культивирования личинок стронгилят от табунных лошадей при круглогодичном пастбищном содержании в условиях критически низких температур Якутии, отличающийся тем, находящиеся при температуре наружного воздуха -5°C и ниже до -55°C замерзшие пробы фекалий лошадей ставят в холодильник с температурой $+8^{\circ}\text{C}$ на 24 часа, затем выдерживают при комнатной температуре $+22^{\circ}\text{C}$ 12^о часов, после ставят в термостат при температуре $+28^{\circ}\text{C}$, тем самым обеспечивая плавный переход колебаний температур для снижения стресс-фактора на яйца гельминтов и дальнейшего развития личинок, для исследования культивированных личинок стронгилят используют пробирки объемом 5 мл, количество взвеси составляет 2,1 мл, что представляет собой 30 капель взвеси с личинками, для обездвиживания личинок стронгилят применяют 0,7 мл раствора Мелисептол рапид, затем одну каплю или 0,07 мл взвеси личинок наносят на предметное стекло и под большим увеличением микроскопа

подсчитывают количество личинок во взвеси для определения условной интенсивности стронгилятозной инвазии и для определения их родовой и видовой принадлежности. Этот способ позволяет эффективно определить условную интенсивность инвазии, выживаемость личинок, вероятность круглогодичной реинвазии лошадей, провести точный прижизненный диагноз.

Для определения интенсивности инвазии лошадей находящихся в круглогодичном пастбищном содержании, для определения развития и выживаемости яиц стронгилят при критически низких температурах -45°C ; -50°C ; -55°C , для использования культивированных личинок стронгилят в лабораторных опытах. Стронгиляты пищеварительного тракта лошадей – геогельминты. Цикл развития разных видов в общих чертах одинаков. В яйцах, выделившихся во внешнюю среду, при температуре $20-25^{\circ}\text{C}$ за 12-17 часов развиваются личинки 1-й стадии (Л-I), которые (в большинстве случаев) покидают яйцо, растут и созревают, превращаясь после двух линек в инвазионную стадию (Л-III) примерно за 4-5 суток. При пониженной температуре развитие продолжается несколько недель. Личинки Л-I и Л-II живут, как свободноживущие организмы, питаются органическими субстратами, Л-III - не питаются. Личинки способны мигрировать по листьям, стеблям растений и влажной почве. Дальнейшее развитие их в организме лошадей протекает неодинаково.

Известен способ культивирования личинок стронгилят по методу П.А. Величкина (1967), по этому методу свежие пробы фекалий весом 50 г помещают в чашки Петри, слегка увлажняют, закрывают крышкой и ставят в термостат при температуре 30°C на 7-10 дней. Начиная с 7 дня пробы берут по 5 г навески, заворачивают в марлю и помещают в воронки аппарата Бермана, в воронки заливается теплая вода (до $+35^{\circ}\text{C}$). Аппарат с пробами фекалий оставляют при комнатной температуре на 2-3 часа. За это время личинки нематод выпадают из пробы на дно воронки или до места

перекрытия трубки зажимом, осадок разливают на предметные стекла и микроскопируется.

Определение выживаемости яиц стронгилят и интенсивности выделения из них личинок стронгилят при содержании лошадей в экстремальных условиях Якутии, при критически низких температурах: -45°C; -50°C; -55°C и ниже при культивировании интенсивности выделения и выживаемости яиц стронгилят определяет сохранность жизнеспособности стронгилят и вероятность круглогодичной реинвазии лошадей.

До постановки проб фекалий в термостат при флотационном методе исследования проб фекалий по методу Фюллеборна обнаруживаем яйца стронгилят.

Исследование начинают при температурах воздуха -5°C; -10°C; -15°C; -25°C, опытные пробы фекалий (целыми комками) ставят в холодильник с температурой +8°C на 24 часов, затем переносят при комнатной температуре +22°C на 12 часов, переносят в термостат при температуре +28°C. При температуре наружного воздуха -25°C; -30°C; -35°C, замерзшие пробы фекалий ставят в холодильник с температурой +8°C на 24 часа, затем переносят при комнатной температуре +22°C на 12 часов, переносят в термостат при температуре +28°C. При температуре наружного воздуха -35°C; -40°C; -45°C, замерзшие пробы фекалий (комки) переносят в помещение с постоянной температурой -10°C на 24 часа, переносят в холодильник с температурой +8°C, выдерживают в течение 24 часа, затем переносят при комнатной температуре +22°C на 12 часов, после ставят в термостат при температуре +28°C. При температуре наружного воздуха -45°C; -50°C; -55°C замерзшие пробы фекалий (комки) переносят в помещение с постоянной температурой -15°C на 24 часа, переносят в холодильник с температурой +8°C, выдерживают в течение 24 часа, затем переносят при комнатной температуре +22°C на 24 часов, после ставят в термостат при температуре +28°C.

Яйца стронгилят сходны и невозможно определить виду, роду и семейству нематод они относятся. Яйца светло-серые с тонкой гладкой оболочкой, величиной $0,0750,120 \times 0,040-0,050$ мм, внутри зародыш в виде шаров дробления. Начиная с 5 дня после постановки в термостат, берут из проб фекалий навески по 5 г, закладывают в воронки Бермана для сбора инвазионных личинок в пробирки объемом 5 мл, который содержит 30 капель объема взвеси личинок - 2,1 мл. Одна капля взвеси личинок соответствует 0,07 мл. После образования в пробирках плотного осадка из личинок надосадочную жидкость осторожно удаляют. Исследуя надосадочную жидкость, определяют выживаемость яиц стронгилят. Живые личинки стронгилят находятся в движении или в искривленном, скрученном состоянии, что существенно затрудняет изучение их морфологии и оценку размеров. Поэтому был необходим способ обездвиживания личинок, который фиксирует их в прямом состоянии, не разрушая их морфологию и не осветляя, что позволяет осуществить исследования и возможность использования культивированных личинок для дифференциальной диагностики вида гельминта. Для обездвиживания живых личинок в 2,1 мл взвеси личинок добавляют 0,7 мл раствора Мелисептол рапид (содержащий в 100 грамме раствора - пропанол 50 грамм, дидецилдиметиламмоний хлорид - 0,075 грамм, неионные сурфактанты, отдушки).

Для определения интенсивности инвазии и подсчета личинок пробирки тщательно перемешивают, берут одну каплю – 0,07 мл взвеси, наносят на предметное стекло и под малым и большим увеличением микроскопа подсчитывают количество выделенных личинок. Данные по подсчету личинок используются как показатели условной интенсивности стронгилятозной инвазий табунных лошадей при круглогодичном пастбищном содержании в условиях критически низких температур Якутии. Постановка точного прижизненного диагноза стронгилятозной инвазии лошадей, определения выращенных инвазионных личинок до вида,

применение культивированных личинок для проведения лабораторных опытов.

Способ культивирования личинок стронгилят от табунных лошадей при круглогодичном пастбищном содержании в условиях критически низких температур Якутии, отличающийся тем, находящиеся при температуре наружного воздуха -5°C и ниже до -55°C замерзшие пробы фекалий лошадей ставят в холодильник с температурой $+8^{\circ}\text{C}$ на 24 часов, затем выдерживают при комнатной температуре $+22^{\circ}\text{C}$ 12 часов, после ставят в термостат при температуре $+28^{\circ}\text{C}$, тем самым обеспечивая плавный переход колебаний температур для снижения стресс-фактора на яйца гельминтов и дальнейшего развития личинок, для исследования культивированных личинок стронгилят используют пробирки объемом 5 мл, количество взвеси составляет 2,1 мл, что представляет собой 30 капель взвеси с личинками, для обездвиживания личинок стронгилят применяем 0,7 мл раствора Мелисептол рапид, затем одну каплю или 0,07 мл взвеси личинок наносят на предметное стекло и под большим увеличением микроскопа подсчитывают количество личинок во взвеси для определения условной интенсивности стронгилятозной инвазии и для определения их родовой и видовой принадлежности. Полученную суспензию фильтруют в течение 5 мин. Затем жидкую часть сливают, к осадку добавляют 10 см. флотационного раствора хлористого натрия и тщательно перемешивают путем встряхивания. После чего готовой взвесью наполняют счетную камеру или помещают 0,15 см. на предметное стекло, накрывают ее покровным стеклом, выдерживают в течение 2 мин и подсчитывают количество личинок нематод. Для определения числа личинок нематод в 1 г анализируемой пробы подсчитанное число личинок нематод умножают на коэффициент 67. Интенсивность инвазии в зависимости от числа обнаруженных личинок и зараженности животных оценивают в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Число личинок нематод в 1 г анализируемой пробы	Интенсивность инвазии в зависимости от числа обнаруженных личинок, экз./1 г фекалий
Менее 100	Низкая
От 100 до 350 включ.	Средняя
Св. 351-1000	Высокая

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

Пример записи в лабораторном журнале результатов гельминтологических исследований проб фекалий от животных, соскобов из объектов внешней среды, почвы, промежуточных и дополнительных хозяев гельминтов приведен в таблице 3.

Таблица 3

Лабораторный журнал

Результаты гельминтологических исследований проб фекалий от животных, соскобов из объектов внешней среды, почвы, промежуточных и дополнительных хозяев гельминтов

[illegible]

11. Практическое предложение

Сотрудники, выполняющие работу по отбору, доставке и анализу проб, должны иметь рабочую спецодежду, обеспечены средствами и условиями для личной гигиены и обязаны соблюдать санитарно-гигиенические требования.

Для диагностики зараженности лошадей стронгилидами и трихонематидами используется несколько методов лабораторных гельминтологических исследований: метод Фюллеборна, Метод Котельникова-Хренова, Метод Бермана-Орлова, Комбинированный флотационный метод и впервые для количественного подсчета применен Метод Mc.Master's.

Интенсивность инвазии устанавливают подсчетом числа яиц гельминтов в трех каплях анализируемой пробы массой 1 г при микроскопии с применением счетной камеры Горяева, с помощью счетной камеры ВИГИСа, использованием метода подсчета по капле пробы на предметном стекле, а также впервые применен метод количественного подсчета на камере Макмастера. Полученные числа показывают ориентировочную интенсивность гельминтозной инвазии в одной капле анализируемой пробы. При установлении интенсивности инвазии учитывают одновременное присутствие разных видов нематод.

В условиях Якутии наиболее патогенными представителями семейства Strongylidae являются наиболее часто встречаемые виды – *Strongylus*, *Delafondia vulgaris*, *Alfortia edentates*, *Trichonematidae*, они зарегистрированы у лошадей табунного содержания во всех коневодческих хозяйствах республики.

Жеребята заражаются уже за первые дни выпаса, в возрасте 1,0-1,5 мес. инвазия достигает до 100% поголовья молодняка. Сезонная и возрастная динамика зараженности показывает, что у молодняка в возрасте до 3-х лет в сентябре-октябре месяцы пик инвазии до 100%, яйца представителей

семейства Strongylidae выявляется во всех исследуемых пробах фекалий. Молодняк лошадей заражены деляфондиями до 65,8%, пик выделения яиц наблюдаем в октябре, альфорттиями до 80%, яйца в фекалиях появляются в середине декабря. Жеребята до 100% заражены трихонематидами, в конце июня наблюдаем пик выделения яиц. Исследование лошадей до 4-5 лет показали, что они инвазированы 100% стронгилидами и трихонематидами.

Источником распространения инвазии служат взрослое поголовье лошадей, а источником заражения конепастбища, территория конебазы [1,2,3]. На фоне отсутствия в хозяйствах плановых дегельминтизаций обеспечивается интенсивная контаминация пастбищ яйцами и инвазионными личинками, с наступлением тепла наблюдаем рост экстенсивности и интенсивности инвазии у всех возрастных категорий лошадей [4; 5].

Важнейшей мерой профилактики стронгилятозов и трихонематидозов является дегельминтизация с охватом всего поголовья табунных лошадей. Рекомендуем, проводить дегельминтизацию жеребят через 25-30 дней после рождения и второй раз осенью перед постановкой на зимний откорм. У взрослого поголовья дегельминтизацию необходимо проводить в год три раза, начинать лучше в марте, одновременно с началом весенней подкормки, вторую, перед выгоном на летние пастбища в конце мая, третью дегельминтизацию необходимо проводить после отъема жеребят от матерей в конце октября. Получено свидетельство база данных №201962100 «Технология профилактики и лечения стронгилятозов лошадей табунного содержания в Якутии» РФ от 25 июня 2019 г. (о государственной регистрации базы данных) [6].

Опыты проведения дегельминтизаций: индивидуальный метод с применением антигельминтных препаратов: *Эквисект* паста в дозе 0,2 мг/кг по действующему веществу (ДВ) путем нанесения на корне языка и инъекционный с применением препарата *Ивермектин* в дозе 0,2 мг/кг по действующему веществу (ДВ), групповой метод с применением препарата

Альбен гранулы в смеси с сухим кормом в утреннее кормление лошадям два дня подряд в дозе 5 мг/кг (0,1 мг/кг по ДВ).

Таблица 4

Антигельминтная эффективность Эквисекта, Альбена, Ивермектина при стронгилятозах лошадей табунного содержания

№№	Препарат	Доза (мг/кг, мл/кг), способ введения	Количе ство голов в опыте	Свободны от гельминт ов после дегельми нтизации, гол.	Среднее кол-во яиц гельминтов в 1 г фекалий, до $M \pm m$	Среднее кол-во яиц гельминт ов в 1 г фекалий, после $M \pm m$	Интенс эффектив ность, %
1	Эквисект	0,2 внутри	10	10	$34,3 \pm 2,9$	0	100
2	Эквисект	0,35 внутри	10	10	$20,2 \pm 1,6$	0	100
		-	10	0	$38,9 \pm 3,4$	$36,7 \pm 2,9$	-
1	Альбен	0,4 внутри	10	9	$17,9 \pm 1,3$	$1,4 \pm 0,14$	92,2
2	Альбен	0,5 внутри	10	8	$26,7 \pm 2,3$	$1,1 \pm 0,1$	95,8
		-	10	0	$27,5 \pm 2,1$	$24,8 \pm 3,7$	-
1	Ивермектин	0,2 в/м	10	8	$32,5 \pm 2,5$	$0,8 \pm 0,02$	97,5
2	Ивермектин	0,35 в/м	10	8	$23,9 \pm 1,7$	$0,7 \pm 0,8$	97
	Контроль	-	10	0	$35,8 \pm 2,6$	$34,8 \pm 2,9$	-

Применение антигельминтных препаратов Эквисект паста, Альбен гранулят, Ивермектин инъекционный показали положительный результат (таблица 4).

Использованная литература

1. Гаврильева Л.Ю. Основные стронгилятозы лошадей табунного содержания Якутии и мероприятия по борьбе с ними.//Л.Ю. Гаврильева Автореферат дисс. ... канд. вет. наук / Всерос. науч.-исслед. ин-т гельминтологии им. К.И. Скрябина. Якутск, 2014 – 26 с.
2. Инструкция по лабораторному контролю очистных сооружений на животноводческих комплексах. Часть 1. Организация лаборатории. Методы санитарно-бактериологического и гельминтологического анализа сточных вод. - М.: Колос, 1982.
3. Исаков С.И. Профилактика гельминтозов лошадей табунного содержания в Якутии /С.И. Исаков, Л.М. Коколова // Сб. докл. 1 Международный конгресс по табунному коневодству «Устойчивое развитие табунного коневодства» – Якутск, 2006. – С. 128-134.
4. Коколова Л.М. Изучение основных гельминтозов лошадей табунного содержания Якутии /Л.М. Коколова, Л.Ю. Гаврильева // XVI межд. конф. «Аграрная наука с/х производство Сибири, Монголии, Казахстана и Болгарии». – Якутск, 2013. – 158 с.
5. Коколова Л.М., Гаврильева Л.Ю., Степанова С.М. Распространение гельминтозов у лошадей табунного содержания в Республике Саха (Якутия) / Л.М. Коколова, Л.Ю. Гаврильева, С.М. Степанова, Т.А. Платонов, Л.А. Верховцева //Ж. Российский паразитологический журнал. – 2014. – №3. – С. 30-33.
6. Коколова Л.М., Гаврильева Л.Ю., Степанова С.М., Яковлева С.С. Свидетельство база данных №201962100 «Технология профилактики и лечения стронгилятозов лошадей табунного содержания в Якутии» РФ от 25 июня 2019 г. (о государственной регистрации базы данных).
7. Общие положения методов лабораторной диагностики гельминтозов лошадей – по ГОСТ Р 54627 2011 Животные сельскохозяйственные жвачные. Методы лабораторной диагностики гельминтозов/ <http://docs.cntd.ru/document/1200094391>

Научное издание

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ ЯИЦ И ЛИЧИНОК
СТРОНГИЛЯТ У ЛОШАДЕЙ ТАБУННОГО СОДЕРЖАНИЯ
В ЯКУТИИ**

(Методическое пособие)

на русском языке

**Коколова Людмила Михайловна
Гаврильева Любовь Юрьевна
Слепцова Светлана Степановна**

Адрес: 677001, Республика Саха (Якутия)
Г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского 23/1
Тел.: (411)221-45-72

e-mail: kokolova_lm@mail.ru, lovov.gavrileva86@mail.ru , agronii@sakha.ru

Комп. дизайн и верстка С.Е. Стручкова
Подписана в печать 20.09.2020
Формат 60x84/16. Усл.печ.л.1,74. Бумага БХИ.
Гарнитура Times. Тираж 300 экз. Заказ №
Отпечатано с готовых диапозитивов
в типографии ООО «Компания «Дани-Алмас»,
677000, Республика Саха (Якутия), г. Якутск,
ул. Билибина 10А. Тел/факс: 36-92-91
e.mail: offset_lenina@mail.ru