ESCCAP
EUROPEAN SCIENTIFIC COUNSEL COMPANION ANIMAL PARASITES®



4 Паразитологічна діагностика кішок, собак і коней

ESCCAP Рекомендації 04 Перше Видання – листопад 2022

ESCCAP
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern,
Worcestershire, WR14 3SZ, United Kingdom

Перше видання опубліковано ESCCAP у 2022

© ESCCAP 2022 – 2023

Всі права захищені

Ця публікація є доступною за умови, якщо поширення або публікація частини або всього вмісту в будь-якій формі або будь-якими способами електронною, механічною, фотокопіювальною, записуючою чи ін. здійснюється за попереднім письмовим дозволом ESCCAP.
Ця публікація може розповсюджуватися лише в оригінальних обкладинках, за винятком попереднього письмового дозволу ESCCAP.

Каталог записів публікації доступний у Британській бібліотеці.

ISBN: 978-1-913757-55-7

ЗМІСТ

ВСТУП	6
Відбір, транспортування та зберігання діагностичного матеріалу	7
Типове обладнання паразитологічної лабораторії	8
Поживні середовища та розчини	10
1. КОПРОСКОПІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ	10
1.1. Загальна інформація	10
1.2. Копроскопічні методи	12
1.2.1. Седиментація у воді	12
1.2.2. Флотація із центрифугуванням	13
1.2.3. Комбінований седиментаційно-флотаційний метод	14
1.2.4. Модифікована техніка підрахунку яєць за методом МакМастера	15
1.2.5. Міні-ФЛОТАК	16
1.2.6. Техніка подвійного центрифугування для виявлення яєць *Anoplocephala* у фекаліях коней	17
1.2.7. Техніка SAFC	18
1.2.8. Метод Telemann-Rivas	19
1.2.9. Техніка Бермана	19
1.2.10. Метод культивації личинок	20
1.2.11. Мазки фекалій, фарбування	20
1.2.12. Метод клейкої стрічки (скотчу)	21
1.2.13. Комерційні набори для аналізу фекалій/InPouch™ TF Feline/копроантигеновий тест	21

4 Паразитологічна діагностика кішок, собак і коней

ESCCAP Рекомендації 04 Перше Видання – листопад 2022

2. Серологія 23

2.1. Загальна інформація 23

2.2. Кількісні методи виявлення антитіл 26

2.2.1. Непрямий імунофлюоресцентний тест на антитіла (IFAT) 26

2.2.2. Імуноферментний аналіз (ELISA) 26

2.3. Якісні методи 27

2.3.1. Системи швидкого тестування 27

3. ОГЛЯД ШКІРИ 27

3.1. Загальна інформація 27

3.2. Зчісування бліх 27

3.3. Зішкріб шкіри 28

3.4. Метод липкої стрічки 29

3.5. Трихограма 29

3.6. Виявлення кліща у вушній сірці 30

3.7. Біомолекулярні методики 30

4. РІЗНЕ 30
4.1. Мазки крові 30
4.1.1. Загальна інформація 30
4.1.2. Збудники, які можуть бути виявлені в мазках крові 31
4.2. Метод лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрату Баффі Коат 32
4.3. Тонкоголкова аспіраційна пункція 32
4.3.1. Загальна інформація 32
4.3.2. Виявлення патогенів з тонкоголкової аспіраційної пункції 33
4.4. Виявлення та ідентифікація мікрофілярій 33
4.4.1. Загальна інформація 33
4.4.2. Тест Knott'a 34
4.4.3. Тест Knott'a в модифікації 34
4.4.4. Метод фільтрації (Difil-Test®) 34
4.4.5. Фарбування кислою фосфатазою 35
4.4.6. Вимірювання мікрофілярій 35
4.5. Біомолекулярні методи визначення та диференціації: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) 36
4.5.1. Загальна інформація 36
4.5.2. Спеціальна інформація 37
4.6. Виявлення дерматофітів 40
4.6.1. Загальна інформація 40
4.6.2. Безпосередній огляд хутра 40
4.6.3. Дослідження за допомогою лампи Вуда 40
4.6.4. Мікологічний посів 40

ДОДАТКИ

ДОДАТОК 1 - СУПРОВІД 41
ДОДАТОК 2 – СЛОВНИК, АБРЕВІАТУРИ Й КОРИСНІ ПОСИЛАННЯ 42

ВСТУП

Правильна діагностика інфекції та/або захворювання є необхідною умовою відповідного лікування та ефективного контролю, і діагностика паразитарних захворювань не є винятком. Орієнтовний діагноз, заснований на клінічних ознаках, гематології, хімії, патології або гістопатології, може бути корисним у виборі специфічних діагностичних аналізів для прямого чи непрямого виявлення паразитів (або їх комбінації).

Розробка стандартних процедур і належної лабораторної практики має фундаментальне значення для допомоги ветеринарним фахівцям. Незалежно від того, підтверджують діагноз інфекції у домашніх тварин із клінічними ознаками, сумісними з паразитарними захворюваннями, чи проводять скринінг тварин-компаньйонів на інфекцію в рамках ширшої програми профілактики та контролю, існує потреба в точних і надійних методах.

Безпосереднє виявлення

Паразитологічні лабораторні методи часто дозволяють безпосередньо морфологічно виявляти паразитів або їх молекули, такі як антигени паразитів чи ДНК.

Безпосереднє виявлення паразитів можливо за допомогою:

- морфологічна ідентифікація (макроскопічна, мікроскопічна, безпосередньо або після концентрування, після фарбування або маркування специфічними антитілами, після культивування на грибкові збудники);
- імунодіагностичне виявлення антигенів паразитів;
- біомолекулярне визначення ДНК паразитів;
- виявлення макромолекул паразитів за допомогою мас-спектрометрії; і
- культивування in vitro для розмноження або розвитку паразитарних стадій.

Лімітуючі фактори включають:

- нерівномірний розподіл і виділення паразитів;
- неправильний відбір, зберігання та транспортування;
- обмежений доступ до генетичної/протеомної інформації; та:
- низька чутливість або специфічність у деяких випадках.

Застереження: біомолекулярне виявлення ДНК або антигену іноді може призвести до хибних позитивних результатів, оскільки вони можуть зберігатися протягом деякого часу після зникнення інфекції.

Непряме виявлення

Для деяких паразитарних інвазій пряме виявлення не завжди можливо. Це може бути пов’язано з їх локалізацією в організмі, оскільки паразит присутній у дуже низькій щільності, і тому його неможливо надійно виявити прямими методами, або тому, що метод є надто трудомістким або інвазивним для пацієнта. У таких випадках непряме виявлення через діагностику імунної реакції на паразитів може бути дуже корисним. Непрямі методи виявлення передбачають виявлення специфічних антитіл з різних субстратів.

Лімітуючі фактори включають:

- варіабельні та уповільнені імунні реакції (залежно від моменту зараження, інтенсивності, локалізації та типу реакції);
- персистенція та перехресна реактивність антитіл; і
- низька чутливість або специфічність у деяких випадках.

Антитіла можуть зберігатися протягом різного часу після зникнення інфекції, тому їх здатність виявляти поточні інфекції може бути обмеженою.

Дані рекомендації призначені для використання ветеринарними фахівцями, які у своїй практиці здійснюють звичайні діагностичні процедури для виявлення паразитарних інвазій, а також осіб, які регулярно здають зразки для аналізу до ветеринарних лабораторій.

Зміст був поділений на розділи на основі матеріалу, що досліджується, і наявних методів. Він також містить загальну інформацію щодо збору, обробки та зберігання зразків.

ВІДБІР, ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ ДІАГНОСТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Загальна інформація

Точність діагностичних тестів значною мірою залежить від правильного відбору, зберігання та транспортування досліджуваного матеріалу. Кожен зразок має бути належним чином зазначено (включаючи ідентифікацію пацієнта та власника разом із датою взяття зразка), відправлений у щільно закритих контейнерах, що не б'ються (марковані відповідно до національного та міжнародного законодавства щодо транспортування потенційно інфекційного матеріалу), швидко передано до лабораторії та супроводжено правильно заповненим протоколам, щоб співробітники лабораторії могли зареєструвати зразок і провести відповідний тест. Зразки крові/сироватки необхідно надсилати в герметичній пластиковій пробірці з кришкою, що загвинчується, у прохолодній упаковці з нічним кур'єром. Пробірку слід помістити в зіп-пакет/пакет для зразків на випадок, якщо пробірка трісне або зламається, загорнути в захисний матеріал і помістити в міцну коробку для транспортування.

Багато лабораторій надають спеціальні вказівки щодо відбору зразків і транспортування. Крім того, слід враховувати загальні та спеціальні запобіжні заходи та належним чином утилізувати токсичні речовини або інфекційні матеріали.

Відбір проб і зберігання

1. Фекальний матеріал

Зразки фекалій слід відбирати ректально або відразу після дефекації, щоб запобігти забрудненню матеріалом із навколишнього середовища, який може містити вільноживучі нематоди. Аналіз слід проводити зі свіжих зразків або після зберігання при 4°C, оскільки яйця деяких гельмінтів і ооцист кокцидій можуть продовжувати розвиватися та змінювати свої діагностичні ознаки. В ході дослідження методом Бермана старих зразків фекалій, личинки легеневих нематод першої стадії (L1) можуть бути недостатньо життєздатними для міграції. Личинки *Strongyloides* spp. і стронгіліди можуть вилупитися з яєць через кілька годин або днів відповідно, і зразки можуть дати хибний негативний результат для виявлення яєць. Щоб запобігти подальшому розвитку яєць нематод, зразки та контейнери повинні містити якомога менше кисню та бути щільно закритими.

У ветеринарній паразитології зразки фекалій зазвичай не зберігаються тривалий час перед дослідженням. Тривале зберігання може вимагати фіксації, напр. хімічними речовинами (див. спеціальну літературу) або шляхом заморожування при -20°C. У таких випадках слід зазначити, що деякі стадії паразитів, особливо личинки нематод, стронгіліди та інші яйця гельмінтів з тонкими оболонками, не можуть бути вірогідно виявлені в консервованому або попередньо замороженому матеріалі.

2. Сироватка

У більшості випадків зразки сироватки для ідентифікації та кількісного визначення антигенів або антитіл беруть із периферичної крові. В ідеалі кров повинна вільно текти в пробірку; це допомагає запобігти гемолізу. По можливості слід взяти принаймні 5 мл крові, щоб забезпечити об'єм сироватки 2 мл для всієї тестової панелі. Після коагуляції протягом щонайменше 20 хвилин сироватку відокремлюють від коагулянту шляхом центрифугування, переносять у нову пробірку і, за можливості, відправляють одразу. За необхідності сироватку можна зберігати при температурі 4°C протягом максимум 24 годин перед відправленням. Більш тривале зберігання, якщо необхідно, має відбуватися при -20°C. Будь ласка, зверніть увагу, що центрифугування до повної коагуляції може спричинити гемоліз, який може перешкодити тесту. Залишення крові на занадто тривалий час може призвести до росту мікробів і подальшого розкладання зразка. Якщо сироватка недоступна, для деяких тестів можна використовувати плазму; це необхідно підтвердити в лабораторії перед тестуванням.

3. Цільна кров

Для мікроскопічного або молекулярного виявлення паразитів або ДНК паразитів у цільній крові (безпосередньо або після концентрації, наприклад, у тесті Knnot'a) використовуються пробірки для зразків із антикоагулянтом (EDTA, Li-гепарин). Зразки цільної крові можна зберігати при 4°C максимум 4 дні. Заморожування зразків при -20°C для полегшення тривалого зберігання все одно дозволить виявити ДНК, але обмежить ізоляцію та ідентифікацію паразитичних стадій.

4. Ізольовані паразити

Живих членистоногих (і зішкріб шкіри) слід зберігати в щільно закритому контейнері, щоб запобігти їх втечі. Щоб запобігти зневодненню, можна додати трохи вологої паперової серветки. Для подальшого дослідження їх необхідно зафіксувати в 70% етиловому спирті. Паразити з фекалій, блювотних мас, шкіри тощо слід збирати окремо та зберігати у фізіологічному розчині (короткочасно) або в 70% етанолі.

ТИПОВОЕ ОБЛАДНАННЯ ПАРАЗИТОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Оскільки мікроскопія є стандартною технікою дослідження проб, добре настроєний світловий мікроскоп є незамінним для паразитологічної діагностики. Для ідентифікації часто необхідні мікроскопічні вимірювання, тому має бути доступне обладнання для точних стандартизованих вимірювань. Для об'єктів, видимих неозброєним оком, стереомікроскоп зазвичай є найкращим варіантом для детального дослідження (див. таблицю 1).

Таблиця 1: Рекомендовані діапазони збільшення та критерії ідентифікації стадій паразита

Етапи	Діапазон збільшення*
Яйця і личинки гельмінтів, дрібні членистоногі	Мале збільшення для скринінгу: 40–100x Для деталей: 400x
Найпростіші	Збільшення від середнього до високого: 400–650x Мазки крові, дуже дрібні об'єкти у фекаліях: 1000x (масляна імерсія)
Великі членистоногі, дорослі гельмінти (або їх частини, наприклад проглотиди)	Мале збільшення (стереомікроскоп)

* Зверніть увагу, що збільшення розраховується як збільшення ока (зазвичай 8–10x) помножене на збільшення об'єктива для світлового мікроскопа, тоді як стереомікроскоп використовує лише один набір збільшувальних лінз.

При діагностиці стадій паразита під мікроскопом необхідно враховувати різні особливості, такі як розмір, форма, колір і морфологія поверхні, самої оболонки та вмісту. Для ідентифікації личинок нематод (легеневі черви, стронгіліди коней, анкілостоми собак і котів або *Strongyloides* spp.), рухливість можна розглядати, коли вони живі. Крім того, специфічні структури, такі як морфологія передньої частини, стравоходу та хвоста, корисні для ідентифікації.

Додаткове обладнання паразитологічної діагностичної лабораторії зазвичай включає:

(A) для копроскопії :

- вагове обладнання
- товкач і ступка
- пластиковий контейнер і шпатель, депресор для язика, пластикова ложка або щось подібне
- пластикова паличка або тонкий шпатель
- ватний тампон
- пляшка із гнучкого пластику
- центрифужні пробірки (12–15 мл; 50 мл)
- настільна центрифуга з поворотним ротором
- склянка (250 мл) або інша ємність, придатна для відстоювання
- лійка
- ситечка для чаю з розміром сита приблизно 0,5–1 мм (для флотації або седиментації-флотації) і 0,3 мм (для седиментації)
- дротяна петля (зігнута під прямим кутом, діаметром приблизно 6 мм) або інші пристрої для видалення крапель флотаційного розчину з поверхні
- мікроскопічні предметні скельця
- покривні
- імерсійне масло
- чашка Петрі (скляна або пластикова, з дном, гравійованим лініями, для полегшення мікроскопічного дослідження)
- розчин метиленового синього (чорнило)
- спринцовка (або піпетки 10-20 мл)
- ватна марля (20 x 20 см)
- пластикові або скляні піпетки Пастера
- камера для підрахунку яєць гельмінтів або ооцист (наприклад, McMaster, FLOTAC)

Крім того, для техніки Бермана:

- Лійки з апаратом фіксації
- гумова трубка і зажим
- мірні циліндри калібровані (100 мл і більше)
- магнітна мішалка та магніти для перемішування

Для копрокультур також:

- банка 500 мл (або аналогічна)
- Чашка Петрі трохи більша в діаметрі, ніж скляна банка
- Термостат при 25°C, у темряві
- автоклавні тирса, деревне вугілля або вермикуліт

(B) для гематології та серології

- Необхідне різне обладнання залежно від формату та методу аналізу, наприклад, флюоресцентний мікроскоп для IFAT або спектрометр для ELISA тощо, а також лабораторні піпетки та обладнання для фарбування.

(C) для зішкрібів шкіри:

- 10% розчин КОН або лактофенол
- мінеральне масло або гліцерин

СЕРЕДОВИЩА ТА РОЗЧИНИ

- 0,9% NaCl (фізіологічний розчин)
- флотаційні середовища (див. таблицю 2):
- Розчин Люголя (10 г йодистого калію, 5 г йоду, до 200 мл дистильованої води)
- діетиловий ефір[1]
- SAF (ацетат натрію-оцтова кислота-формалін): 4,5 г ацетату натрію, 6,0 мл концентрованої оцтової кислоти, 12,0 мл формаліну[1]
- за Цилем-Нільсеном: карболфуксин , малахітовий зелений, кислий спирт (15 мл HCl (37%) у 485 мл етанол), метанол (використовуйте набір для фарбування)

[1] ефір, формалін або мертіолат -йод-формальдегід (містить ртуть) використовуються для методики концентрування SAF (див. 1.2.7.), методу Телеманна-Ріваса (див. 1.2.8.) та/або MIFC (мертіолат - йод -концентрація формальдегіду) методика (не описана в цьому посібнику). Вибір, серед зазначених, прийнятного методу може визначатися різними лабораторними стандартними заходами безпеки щодо цих розчинів.

Таблиця 2: Інгредієнти та властивості флотаційних розчинів для копроскопічних паразитологічних аналізів (за вибором)

Флотаційний розчин	Кількість	Об'єм води	Питома вага*
Насичений розчин кухонної солі (NaCl)	340–360 г NaCl	1000 мл	~1,18–1,2
Розчин хлориду цинку ($ZnCl_2$ + NaCl)	275 г $ZnCl_2$ + 262 г NaCl	1000 мл	1.3
Розчин хлориду цинку ($ZnCl_2$)	440 г $ZnCl_2$	1000 мл	1.3
Розчин хлориду цинку ($ZnCl_2$)	660 г $ZnCl_2$	1000 мл	1.45
Розчин сульфату цинку ($ZnSO_4$)	760 г $ZnSO_4$	1000 мл	1.3
Розчин сульфату магнію ($MgSO_4$)	350 г $MgSO_4$	1000 мл	1.28
Розчин сахарози**	550 г сахарози	440 мл	1.28
Насичений розчин солі з 50% глюкози	375 г глюкози + 250 г NaCl	До 1000 мл	1.27
Розчин солі сахарози**	50 г сахарози + 100 мл насиченого розчину солі		1.33

* при кімнатній температурі, виміряти ареометром .

** додайте 0,7 мл формаліну (37%) або 1 г кристалічного фенолу на кожні 100 мл, щоб запобігти росту бактерій і грибків, або зберігайте при 4°C.

1. ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕКАЛІЙ

1.1. Загальна інформація

Макроскопічне дослідження

Перед обробкою кожен зразок фекалій слід дослідити макроскопічно на наявність виділених гельмінтів (наприклад, аскарид, проглотидів стьожкових червів, гостриків) або крові (щодо збереження ізольованих паразитів див. Вступ).

Мікроскопічне дослідження

Дозволяє виявити виділені яйця, кластери яєць, личинки, ооцисти, трофозоїти (тільки у свіжих фекаліях, якщо вони не змішані з консервуючим розчином) і цисти.

Яйця гельмінтів і цисти (оо) найпростіших слід диференціювати на основі їх:

- форми: кругла, овальна, багатокутна, лимоноподібна;
- розміру: великий = приблизно 80–150 (–300) мкм (наприклад, яйця *Fasciola hepatica* , кластери яєць *Dipylidium caninum*), середній = приблизно 60–80 (–120) мкм (яйця Ancylostomatidae, яйця Strongylidae), малий = приблизно 40–60 мкм (наприклад, яйця *Strongyloides*, яйця Taeniidae) і дуже маленькі = приблизно <40 мкм (наприклад, ооцисти кокцидій і *Cryptosporidium* , цисти лямблій);
- оболонки/чохлика: товщина, поверхня (наприклад, гладка, шорстка, з вм'ятинами), колір, відмінні риси, такі як ковпачки чи мікропіли; і
- вмісту (по відношенню до часу після осадження фекалій): несегментовані клітини, бластомери, ембріон або личинка в яйцях гельмінтів, кількість спороцист і спорозоїтів та інші структури в кокцидіях та інших найпростіших.

Личинки нематод диференціюються за їхньою загальною довжиною, морфологією кутикулярного чохлика, травного тракту та їх переднього і заднього кінців. Їх можна відрізнити від вільноживучих личинок нематод за відсутністю додаткових оболонок. Вільноживучі личинки нематод мають чіткий ротовий отвір і темніший колір, ніж інфекційні личинкові стадії; вони можуть мати бульби стравоходу та деякі інші особливості.

Залежно від принципу дії розрізняють різні копроскопічні методи: прямі процедури без концентрації (тобто мазки фекалій без фарбування, виявлення рухомих стадій або пофарбовані мазки) на відміну від методів концентрації паразитарних стадій:

- осадження
- флотація (з або без центрифугування)
- комбінована седиментація–флотація
- Техніка Бермана
- спеціальні методи концентрації, такі як метод Телемана-Ріваса, SAFC тощо.

Переконливість копроскопічних досліджень

Перелічені методи часто можуть виявити ряд різних паразитів; однак жоден метод не є однаково придатним для всіх стадій і наявних паразитів. Переважний метод слід вибирати відповідно до очікуваних стадій паразитів, і для охоплення повного спектру можливих інфекцій буде потрібно кілька методів.

Загалом, чим більша кількість фекалій, тим більша ймовірність виявлення стадій паразита (вища чутливість, тобто менше хибних негативних результатів). Однак кількість досліджуваних фекалій буде обмежена ступенем забруднення обробленого зразка: занадто багато залишків знижує чутливість (тобто більше хибних негативних результатів), а також специфічність.

Оскільки більшу кількість фекалій можна обробити за допомогою **комбінованого методу седиментації та флотації**, рівень чутливості є вищим, особливо у випадку низьких рівнів виділення. Таким чином, це **кращий метод** для планових оглядів. Подібно до флотації та седиментації, цей метод класифікується як напівкількісний, якщо виконується відповідно до послідовної методології та визначеної кількості зразків фекалій. Активна флотація, що підтримується центрифугуванням, є кращою перед пасивною флотацією. Крім того, вибір флотаційного розчину і, отже, питомої ваги цього розчину є фундаментальним, оскільки деякі паразити не виявляються при високій питомій вазі, а інші – ні при низькій питомій вазі.

Чутливість копроскопічних методів обмежена наступними факторами:

- Інфекції повинні бути на стадії виявлення, тобто стадії (яйця, личинки, цисти (оо)) повинні бути присутніми в субстраті, що вказує на поточну інфекцію з розмноженням/генеруванням потомства. За допомогою копромікроскопії не можна виявити інфекції до або після зараження .
- Не всі стадії/паразити виділяються постійно; може знадобитися кілька зразків від окремих тварин (наприклад, протягом 3 днів поспіль) або повторний відбір.
- Часто інфекції низького рівня дають лише невелику кількість виявлених стадій. Збільшення кількості фекалій або виконання кількох аналізів на тварину може бути корисним, як зазначено вище.

Діарея може розбавити зразки шляхом збільшення об'єму фекалій і, таким чином, знижується чутливість методу. Цього можна уникнути, використовуючи комбінований метод седиментації та флотації, який концентрує рідкі фекалії шляхом седиментації перед концентрацією паразитів шляхом флотації.

Через низьку чутливість копромікроскопії негативні **результати** слід інтерпретувати з обережністю. Той факт, що у фекаліях не виявлено жодних стадій паразитів, не виключає паразитарної інфекції, коли є типові клінічні ознаки (наприклад, інфекції, які ще є передпатентними). Такі випадки потребують додаткового вивчення. У деяких випадках можна застосувати альтернативні методи (наприклад, виявлення антигену або антитіла).

З іншого боку, пряме виявлення паразитарних стадій має, як правило, високу специфічність і хибні позитивні результати рідкісні, якщо аналіз виконано правильно. Хибні позитивні результати можуть бути результатом копрофагії у собак (тобто виявленого транзиту котячих паразитів *Toxocara cati* або *Toxoplasma gondii* через кишечник у зразках фекалій псових). Тому власникам слід рекомендувати намагатися запобігти такій поведінці, особливо протягом кількох днів, що передують відбору зразків на копроскопію , щоб уникнути хибного позитивного виявлення транзитних стадій паразита. Для уникнення цієї проблеми, рекомендується застосовувати виявлення антигену, що є комерційно доступним для деяких видів собачих нематод.

Для інтерпретації результатів у клінічному контексті паразитологічні знахідки повинні бути оцінені разом з іншими діагностичними даними (наприклад, клінічне обстеження, гематологія тощо), а у випадку зоонозних стадій – їх вплив на здоров'я людини.

1.2. Копроскопічні методи

1.2.1. Осадження у воді

Принцип:
За допомогою цього методу стадії паразита з відносно високою питомою вагою (наприклад, яйця трематод, особливо *Fasciola hepatica* і *Opisthorchis felineus* але також ооцисти *Eimeria leuckarti*) і важкі частинки фекалій швидко осідають у воді. Шляхом багаторазового осадження та декантації супернатанту видаляються легші частки фекалій. Цей метод зазвичай застосовується для виявлення яєць печінкового сисуна у фекаліях коня, а також у котів.

Необхідний фекальний матеріал:
5–10 г фекалій (чутливість підвищується при повторному взятті).

Процедура:

1. Змішайте зразок фекалій з водою шпателем в однорідний розчин. Якщо консистенція дуже тверда, попередньо розмішайте її з водою за допомогою товкача та ступки.
2. Перелийте суспензію фекалій/води через чайне ситечко (розмір вічка 0,3 мм) у відповідний контейнер (наприклад, мензурку або подібний) і промийте сито сильним струменем води з пластикової пляшки, доки стакан не заповниться.
3. Залишити на 3 хвилини.
4. Злийте супернатант одним рухом без перерви (або зберіть його за допомогою спринцовки).
5. Знову наповніть стакан водою.
6. В результаті, повторіть седиментацію тричі. Остаточний супернатант повинен бути майже прозорим.
7. До останнього осаду додайте 1–3 краплі метиленового синього (чорнило) і ретельно перемішайте, прокручуючи.
8. Вилийте весь осад у чашку Петрі (з лініями).
9. Розгляньте осад під мікроскопом або стереомікроскопом (20–50-кратне збільшення).

Для стандартизованого виявлення яєць *Fasciola* у зразках коней також доступний комерційний набір FlukeFinder®.

1.2.2. Флотація з центрифугуванням

Принцип:
Флотація проводиться для виявлення яєць гельмінтів, цист найпростіших і ооцист, питома вага яких нижча, ніж у флотаційного розчину. У суспензії зразка фекалій, змішаного з флотаційним розчином з відомою питомою вагою, легші паразитарні стадії накопичуються на поверхні, тоді як більш важкі частинки тонуть або залишаються в суспензії.

Можна використовувати кілька різних флотаційних розчинів (див. Таблицю 2). Вибраний розчин слід приготувати принаймні за день до аналізу та перевірити питому вагу ареометром.

За допомогою насиченого розчину хлориду натрію можуть бути виявлені яйця *Strongyloides* (свіжі фекалії), стронгіліди , аскариди, оксиуриди, ооцисти кокцидій та інші цисти найпростіших. За допомогою цього методу стадії паразитів плавають внаслідок їх низької питомої ваги в сольовому розчині з більшою питомою вагою. Виявлення яєць *Trichuris*, *Capillaria*, теніїд, спірурид або оксиурид та ооцист *Eimeria leuckarti* можуть бути невизначеними, оскільки для них потрібні флотаційні розчини з більшою питомою вагою. Цисти лямблій деформуються, а яйця трематод не виявляються. Тривале зберігання яєць гельмінтів або стадій найпростіших в гіпертонічних розчинах може призвести до деформації стадій, що ускладнить діагностику. Іноді у флотаційних препаратах зустрічаються личинки нематод; однак вони зазвичай швидко зменшуються, і морфологічна діагностика серйозно ускладнюється.

На додаток до вищезазначених стадій, яйця *Trichuris*, *Capillaria*, теніїд, спірурид і цисти лямблій (деформовані) можна виявити за допомогою розчинів сульфату цинку, хлориду цинку, сульфату магнію або сахарози/солі сахарози. Використані розчини, що містять цинк (важкий метал), необхідно збирати та утилізувати як спеціальні відходи.

Можливі кілька адаптацій до стандартної техніки флотації, деякі з яких описані нижче.

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
Дрібні тварини: 4–5 г (приблизно розміром з волоський горіх), за можливості, збирають впродовж 3-х послідовних днів, аналізують як частини об'єднаного зразка; коні: до 20 г фекалій.

Процедура:

1. Приготуйте флотаційний розчин при кімнатній температурі та перевірте питому вагу за допомогою ареометра (якщо немає, до майже повного розчинення солі).
2. Змішайте зразок фекалій з 10-кратним об'ємом флотаційного розчину до однорідного розчину. Якщо консистенція тверда, попередньо розмочіть зразок у воді.
3. Перелийте фекальну суспензію через ситечко для чаю та за допомогою лійки у дві центрифужні пробірки для кожного зразка. Залиште 1 см поля від верхньої частини кожної пробірки, щоб уникнути проливання всередині центрифуги.
4. Центрифугуйте пробірки протягом 3–5 хвилин при 300 x *g* .
5. За допомогою дротяної петлі (або подібного пристрою) виділіть 3–5 крапель з поверхні суспензії та помістіть на предметне скло мікроскопа.
6. Накрийте предметне скло накривним склом і дослідіть під мікроскопом, починаючи з 40-кратного збільшення. Сфокусуйтеся на правильному оптичному рівні, використовуючи маленькі повітряні бульбашки або частинки як орієнтир. Усю площу накривного скельця можна оглянути при більшому збільшенні (100–400x). У випадках лише помірно забруднених зразків дослідження без накривного скла при малому збільшенні може підвищити чутливість, оскільки яйця та цисти зосереджені на опуклій поверхні крапель.

Існує кілька варіантів мікроскопічного дослідження стадій паразитів, які плавають на поверхні зразків:

- кілька крапель з поверхні суспензії фекалій можна перенести на предметне скло за допомогою дротяної петлі, зігнутої під прямим кутом, а потім дослідити (з накривним склом або без нього) під мікроскопом. Будьте обережні, щоб не порушити поверхню суспензії під час виділення крапель і переконайтеся, що петля очищається між зразками (промивання з наступною обробкою вогнем).
- розташуйте накривне скло на кінці наповненої центрифужної пробірки (накривне скло має контактувати з поверхнею флотаційного розчину) і відцентрифугуйте з накривним скельцем на місці. Потім покривне скельце можна видалити, помістити на предметне скло мікроскопа та дослідити під мікроскопом. Плаваючі стадії паразита переносяться на предметне скло разом із рідиною, що прилипає до нижньої сторони покривного скла. Центрифугування з накривним склом найкраще працює з розчином сахарози.
- помістіть покривне скло на пробірку після центрифугування (для цього пробірку потрібно заповнити доверху, щоб суспензія утворила меніск), потім зачекайте кілька хвилин, щоб стадії паразитів спливли.

1.2.3. Комбінований седиментаційно-флотаційний метод

При цьому методі стадії паразитів спочатку накопичуються, утворюючи осад у воді, а потім спливають у результаті їх низької питомої ваги у флотаційному розчині з більшою питомою вагою. Перевагою цього комбінованого методу є більш висока чутливість, оскільки можна досліджувати більшу кількість фекалій (до 20 г).

Метод можна використовувати для точної ідентифікації всіх класів яєць гельмінтів і більшості ооцист і цист найпростіших. Виявлення личинок нематод і яєць трематод вимагає спеціального досвіду, оскільки вони деформуються. Виявлення трофозоїдів найпростіших і цист амеб цим методом неможливе.

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
Для собак і котів збирають мінімум 4–5 г фекалій (приблизно розміром з волоський горіх). У деяких випадках, щоб підвищити ймовірність виявлення, зразки фекалій збирають впродовж 3-х послідовних днів, аналізують як частини об'єднаного зразка; коні: до 20 г фекалій.

Процедура:

1. Помістіть зразок у ступку та ретельно перемішайте його з водою за допомогою товкача.
2. Перелийте суспензію фекалій/води через ситечко для чаю за допомогою воронки у дві пробірки для центрифугування. Промийте фекалії через ситечко сильним струменем води з пульверизатора (жоден матеріал не повинен бути втрачений у процесі).
3. Центрифугуйте протягом 8 хвилин при приблизно 500–700 x *g* для осадження.
4. Вилийте супернатант одним рухом без перерви (або відсмоктуйте його за допомогою спринцовки), доки не залишиться осад розміром не більше 5 мм.
5. Заповнити пробірки флотаційним розчином.
6. Центрифугуйте пробірки протягом 3–5 хвилин при 300 x *g*.
7. Продовжуйте, як для техніки флотації (див. 1.2.2.).

В якості альтернативи, якщо немає центрифуги, змішайте зразок фекалій з водою та залиште пробірки при кімнатній температурі від 30 хвилин до однієї години, вилийте супернатант і змішайте осад із флотаційним розчином, доки не можна буде спостерігати меніск. Додайте накривне скло, почекайте 10–20 хвилин (залежно від флотаційного розчину), помістіть накривне скло на предметне скло та огляньте під мікроскопом. Цей метод є менш чутливим, ніж ті, що базуються на центрифугуванні, і зазвичай виявляє лише стадії паразитів, присутні у більшій кількості.

1.2.4. Модифікована методика підрахунку яєць за McMaster

Принцип:
Ця методика використовується для **кількісного** дослідження фекалій на яйця гельмінтів або ооцисти кокцидій. Визначена кількість фекалій плаває в камері та підраховується під мікроскопом в позначеному полі. З підрахованої кількості стадій розраховується кількість в 1 г фекалій і виражається як epg (кількість яєць на грам) або opg (кількість ооцист на грам). Підрахунок яєць часто використовують для кількісного визначення яєць стронгілід у коней, але він також застосовний до інших стадій паразитів, які плавають. Зазвичай використовують насичений флотаційний розчин NaCl; використовуючи флотаційні розчини з більшою питомою щільністю, можна виявити більш важкі яйця.

Для польових досліджень резистентності до ліків метод застосовують до та після антигельмінтного лікування (тест на зменшення кількості яєць у фекаліях, FECRT). FECRT є скринінговим тестом на ефективність лікування.

У програмах контролю з цільовими вибраними методами лікування підрахунки epg надають інформацію про роль окремих тварин у забрудненні пасовищ і можуть використовуватися для підтримки прийняття рішень у процедурах вибіркового лікування для коней (див. Рекомендацію 8 ESCCAP: Рекомендації лікування й контролю шлунково-кишкових паразитозів у коней).

Через ліміти виявлення (див. нижче) модифікована методика підрахунку яєць McMaster не рекомендована для скринінгу паразитів у тварин, особливо для дуже актуальних ендопаразитів (наприклад, *Echinococcus* spp. у м'ясоїдних або *Parascaris* spp. у коней).

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
Не менше 4 г фекалій.

Процедура:

1. Змішайте рівно 4 г фекалій з приблизно 30 мл флотаційного розчину в ступці.
2. Перелийте суспензію фекалій через сито та лійку в циліндр; віджміть залишок сита товкачем; промийте ступку і товкач флотаційним розчином.
3. Зніміть сито і лійку та долийте флотаційний розчин до 60 мл.
4. Перенесіть цю суспензію в хімічну склянку і добре перемішайте, постійно помішуючи, наприклад, магнітною мішалкою.
5. Швидко вийміть зразок піпеткою та заповніть перший відсік лічильного предметного скла об'ємом не менше 0,15 мл. Рахункова сітка повинна бути заповнена повністю; не повинно бути бульбашок повітря.
6. Знову ретельно перемішайте суспензію та візьміть другий зразок, щоб заповнити другий відсік предметного скла.
7. Залиште предметне скло на 5–10 хвилин, щоб дозволити яйцям/ооцистам спливти.
8. Помістіть предметне скло для підрахунку на мікроскоп і підрахуйте всі стадії паразита в межах лічильної сітки (40–100-кратне збільшення).

Розрахунок epg / opg:
epg / opg = (кількість яєць/ооцист з усіх підрахованих сіток (N)/кількість фекалій (г) x площа рахункової сітки ($см^2$)) x об'єм фекальної суспензії (мл)/висота лічильної камери (см) x кількість підрахованих сіток (n),

- де N означає середню кількість яєць/ооцист, підрахованих на сітку;
- де n – кількість підрахованих сіток;
- об'єм під сіткою = площа рахункової сітки ($см^2$) x висота лічильної камери (см).

Як приклад:
При кількості фекалій = 4 г і об'ємі суспензії = 60 мл і об'ємі під сіткою = 0,15 мл технічна нижня межа виявлення становить 100 epg/opg. Для предметних стекол, які мають дві камери, і коли загальна кількість яєць, підрахованих **під обома сітками**, додається, технічна нижня межа виявлення на предметне скло становить 50 epg/opg.

epg/opg =

підраховані яйця		об’єм фекальної суспензії (мл)
кількість фекалій (г) x розмір сітки (см^2)	**x**	висота камери (см) x кількість підрахованих решіток

epg / opg = яйця/ооцисти на грам фекалій
Розмір сітки: 1 x 1 см = 1 см^2
висота камери = 0,15 см
об’єм під сіткою = 0,15 мл (розраховується з висоти камери та розміру сітки)
кількість підрахованих сіток: може змінюватися, тому це включено у формулу

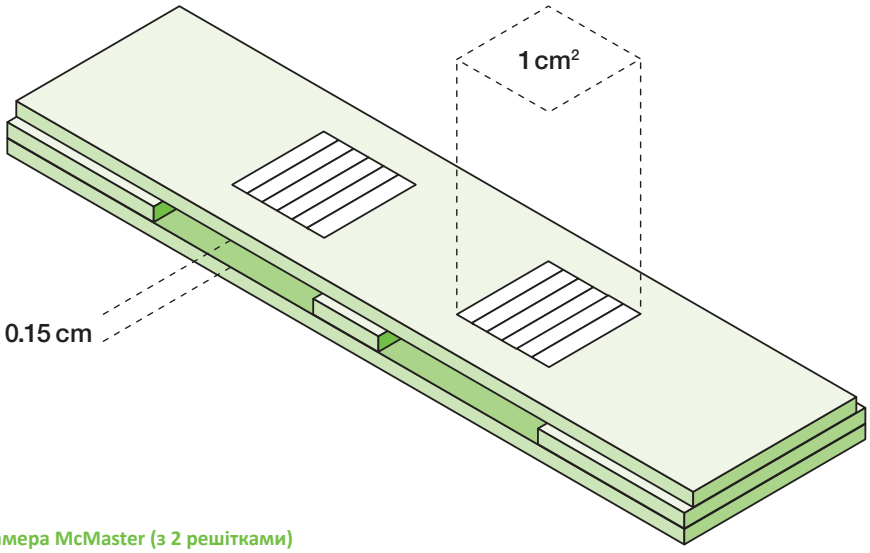


Рисунок 1: Лічильна камера McMaster (з 2 решітками)

1.2.5. Mini-FLOTAC

Принцип:
Mini-FLOTAC дозволяє виявляти та кількісно визначати шлунково-кишкові паразити, включаючи ооцисти кокцидій, яйця гельмінтів і личинки нематод. Він походить від оригінального апарату FLOTAC, але має додаткову перевагу, оскільки не вимагає етапу центрифугування. Mini-FLOTAC можна виконувати як на свіжих, так і на зафіксованих зразках фекалій, що дає можливість обробляти зразки через кілька днів або тижнів після передачі в лабораторію. Чутливість Mini-FLOTAC становить 5 ооцист/яєць/личинок/кокцидій на грам фекалій.

Mini-FLOTAC складається з двох компонентів: основи та диска для читання. Є дві флотаційні камери об’ємом 1 мл, призначені для дослідження суспензій зразків фекалій із максимальним збільшенням у 400 разів.

Fill-FLOTAC 2 і 5 - одноразові пробовідбірники, які входять до комплектів FLOTAC і Mini-FLOTAC. Вони складаються з ємності, колектора (2 г або 5 г) і фільтра. Ці набори сприяють виконанню перших чотирьох послідовних кроків техніки Mini-FLOTAC, тобто збору зразків (включаючи зважування), гомогенізації, фільтрації та наповнення. Комплект і процес Mini-FLOTAC описані нижче.

Для собак і котів

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
Не менше 2 г фекалій.

Процедура:

1. Додайте 18 мл флотаційного розчину в контейнер Fill-FLOTAC 2.
2. За допомогою шпателя заповніть конічний колектор приладу Fill-FLOTAC 2 г фекаліями і вирівняйте поверхню.
3. Гомогенізуйте зразок, струшуючи конічний колектор згори вниз.
4. Покладіть наконечник на Fill-FLOTAC, ненадовго гомогенізуйте, а потім заповніть дві камери пристрою Mini-FLOTAC, поки не утвориться невеликий меніск.
5. Через 10 хвилин перемістіть диск для зчитування, обертаючи за годинниковою стрілкою, і помістіть пристрій під мікроскоп за допомогою адаптера, що постачається в комплекті. Mini-FLOTAC можна досліджувати при максимальному 400-кратному збільшенні.
6. Огляньте зразок, зчитавши значення обох камер Mini-FLOTAC. Помножте кожне підраховане яйце на 5, щоб отримати яйце/личинку/ооцисту на грам.

Примітка: для надійного виявлення яєць теніїд необхідно використовувати флотаційні розчини з більшою щільністю (див. табл. 2).

Для коней

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
Не менше 5 г фекалій.

Процедура:

1. Додайте 45 мл флотаційного розчину (тобто насиченого NaCl) до контейнера Fill-FLOTAC 5.
2. За допомогою шпателя заповніть конічний колектор приладу Fill-FLOTAC 5 г фекаліями і вирівняйте поверхню.
3. Гомогенізуйте зразок, переміщаючи конічний колектор згори вниз.
4. Покладіть наконечник на Fill-FLOTAC, ненадовго гомогенізуйте, а потім заповніть дві камери пристрою Mini-FLOTAC, поки не утвориться невеликий меніск.
5. Через 10 хвилин перемістіть диск для зчитування, обертаючи за годинниковою стрілкою, і помістіть пристрій під мікроскоп за допомогою адаптера, що постачається в комплекті. Mini-FLOTAC можна досліджувати при максимальному 400-кратному збільшенні.
6. Огляньте зразок, зчитавши значення обох камер Mini-FLOTAC. Помножте кожне підраховане яйце на 5, щоб отримати кількість яєць на грам.

1.2.6. Техніка подвійного центрифугування для виявлення яєць *Anoplocephala* у фекаліях коней

Виявлення яєць стьожкових червів у фекаліях коня за допомогою стандартного методу флотації з 20 г фекалій забезпечує лише обмежену чутливість. Використання комбінованої процедури седиментації та флотації, під час якої використовуються два етапи центрифугування з 15 г фекалій, забезпечує вищу швидкість виявлення.

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
15 г

Процедура:

1. Ретельно змішайте зразок фекалій (мінімум 15 г) з принаймні 40 мл води за допомогою шпателя.
2. Помістіть ситечко на склянку об'ємом 250 мл і перемістіть зразок фекалій у ситечко. Пропустіть всю рідину через ситечко, натискаючи на зразок фекалій шпателем.
3. Перенесіть фільтрат у пробірки по 50 мл.
4. Центрифугуйте протягом 10 хвилин при 400 x *g*.
5. Видаліть супернатант за допомогою спринцовки або піпетки.
6. Розчиніть осад, що залишився, у 1–2 мл розчину сахарози та перенесіть суспензію в пробірку на 15 мл.
7. Долити розчин сахарози.
8. Центрифугувати протягом 10 хвилин при 200 x *g*.
9. За допомогою дротяної петлі перенесіть краплі з (повної) поверхні центрифугованої фекальної суспензії на предметне скло та накрийте покривним склом.
10. Мікроскопічно огляньте всю площу під покривним склом, як описано в розділі 1.2.2.

1.2.7. Техніка SAFC

Принцип:
Техніка **SAFC** (концентрат формаліну, ацетату натрію, оцтової кислоти) підходить для виявлення оцистованих і вегетативних стадій найпростіших (наприклад, лямблій) і дрібних яєць деяких трематод, таких як *Opisthorchis* і *Metorchis*. Використовується попереднє консервування свіжих зразків фекалій у розчині SAF. При обробці зразка жирові компоненти видаляються ефіром і концентруються паразитарні стадії. Варіантами методу SAFC є метод Телемана-Ріваса (див. 1.2.8.) і метод MIFC (не описаний у цьому посібнику).

Розчин SAF:
20 мл концентрованої оцтової кислоти
40 мл формальдегіду (37%)
15 г ацетату натрію
додати 1 л дистил. води.

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
Мінімум 1 г свіжих фекалій переносять у пробірки для зразків із 10 мл розчину SAF.

Процедура:

1. Перемішайте пробірку із зразком, що містить фекалії та розчин SAF.
2. Перелийте половину суспензії через марлю в центрифужну пробірку та центрифугуйте 2 хвилини (500 x *g*).
3. Злийте супернатант, додайте 8 мл фізіологічного розчину та перемішайте осад пластиковою лопаткою або паличкою.
4. Додайте 3 мл діетилового ефіру, закрийте пробірку та перемішайте вміст легким струшуванням.
5. Зніміть кришку та центрифугуйте протягом 5 хвилин (500 x *g*), що дозволить утворити кілька шарів.
6. Відокремте детрит від стінки пробірки паличкою та злийте супернатант.
7. Перенесіть дві або більше крапель осаду на предметне скло. За бажанням додайте розчин Люголя, потім накрийте краплі покривним скельцем.
8. Мікроскопічно огляньте всю площу під покривними скельцями, як описано в розділі 1.2.2.

1.2.8. Метод Телемана-Ріваса

Принцип:
Цей метод є різновидом методики SAFC. Цей метод концентрує яйця, цисти та личинки у зразках фекалій з високим вмістом жиру (як у м'ясоїдних).

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
1 г, свіжий.

Процедура:

1. Зважте 1 г свіжих фекалій.
2. Помістіть фекалії в скляну банку і додайте 5 мл оцтової кислоти (концентрації не менше 5%).
3. Ретельно гомогенізувати паличкою і процідити через подвійний шар марлі.
4. Перенесіть фекальний розчин у центрифужну пробірку (12 мл).
5. Додайте рівну кількість діетилового ефіру та перемішайте струшуванням.
6. Центрифугуйте протягом 5 хвилин (300 x *g*). Суміш розділяється на 4 шари (зверху вниз): діетиловий ефір/детрит (включаючи жирові компоненти)/оцтова кислота/осад. Осад часто дуже малий.
7. Зніміть піпеткою осад і перенесіть його на предметне скло. За бажанням додайте розчин Люголя для виявлення деяких паразитарних стадій (наприклад, цист лямблій), накрийте краплі покривним скельцем.
8. Мікроскопічно огляньте всю площу під покривними скельцями, як описано в розділі 1.2.2.

1.2.9. Техніка Бермана

Принцип:
Цей метод зазвичай використовують для виділення рухливих личинок нематод (L1 легеневих червів, *Strongyloides*). Техніку Бермана також можна використовувати для отримання личинок третьої стадії (L3) стронгілід із копрокультури. Принцип заснований на міграції личинок (позитивний гідротаксис) і силі тяжіння, тому може виконуватися лише з живими личинками зі свіжих фекалій. Кількісний аналіз можливий шляхом зважування фекалій і підрахунку всіх наявних личинок (або репрезентативної вибірки).

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
Не менше 4-10 г фекалій; відбір зразків протягом трьох днів поспіль допомагає подолати проміжне виділення L1 легеневих червів.

Процедура:

1. Підготуйте апарат Бермана, помістивши лійку в пристрій для фіксації лійки, а гумову трубку – на кінець лійки, при цьому затискач повинен бути паралельним кутовому розрізу гуми, а перша сторона відкриття затискача – ближче до дна. Налийте в лійку води з-під крана. Переконайтеся, що затискач не тече, наприклад, наповнивши пристрій за день до використання.
2. Ретельно перемішайте фекалії (можна використовувати тирсу, щоб розпушити фекалії, якщо зразок твердий і ущільнений) і помістіть однорідну суміш у марлю.
3. Покладіть марлю з фекаліями у лійку та додайте води майже до повного покриття.
4. Витримайте зразок щонайменше 12 годин при кімнатній температурі. Личинки мігрують з фекалій у трубку та опускаються (самопливом) до кінця воронки.
5. Відкривши гумовий затискач, перші краплі можна проаналізувати під мікроскопом (40–400-кратне збільшення). Якщо личинки рухаються, можна додати 1 краплю розчину Люголя, який вбиває личинки, полегшуючи ідентифікацію їх морфологічних характеристик. Як альтернатива, зібрати 10-14 мл рідини в пробірку, центрифугувати протягом 2 хвилин (500 x *g*), викинути супернатант і дослідити 0,5-1 мл осаду.

Для кількісного визначення кількості личинок на грам фекалій (LPG) попередньо зважте фекалії, підрахуйте всі личинки (або аліквоти) в осаді та екстраполюйте LPG.

1.2.10. Посів личинок фекалій

Принцип:
Копрокультури виконуються з фекаліями коней для відновлення личинок третьої стадії (L3) шлунково-кишкових нематод: яйця трихостронгілід і стронгілід культивуються до L3, що дозволяє диференціювати на рівні роду.

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
Принаймні 50 г фекалій, взятих *per rectum* або відразу після дефекації, щоб уникнути зараження ґрунтовими нематодами.

Процедура:

1. Змішайте фекалії зі стерилізованою тирсою до вологої розсипчастої маси (за потреби додайте водопровідної води, але стежте, щоб вода залишалася всмоктаною; якщо суміш надто волога, личинки не розвиватимуться).
2. Перемістіть суміш у скляну банку з гвинтовою кришкою, наповнену наполовину, і щільно закрийте кришку (повітря все ще має проникати в банку).
3. Інкубуйте банку протягом 7–10 днів у темряві при 25°C, дозволяючи розвиненим личинкам мігрувати вгору по скляних стінках банки.
4. Відкрийте банку та притисніть фекальну культуру товкачем або ложкою.
5. Обережно наповніть банку водопровідною водою до країв, не перемішуючи культуру фекалій.
6. Щільно притисніть кришку скляної чашки Петрі до горлечка скляної банки, потім переверніть культуру догори дном.
7. Наполовину заповніть чашку Петрі водою та дайте баночці та чашці постояти 12 годин, дозволяючи личинкам перейти зі склянки культури в рідину чашки Петрі.
8. Наберіть піпеткою рідину з чашки Петрі та диференціюйте личинки під мікроскопом (див. 1.2.9.).

В той же час, після інкубації та розвитку личинок третьої стадії (пункт 3), їх можна зібрати методом Бермана (див. 1.2.9.).

1.2.11. Мазки фекалій, фарбування

Принцип:
Прямі мазки фекалій на предметних скельцях мікроскопа можуть бути швидшим варіантом, наприклад, для виявлення величезної кількості личинок легеневих червів або трофозоїдів найпростіших. Однак без концентрації ця процедура має низьку чутливість і в більшості випадків недостатня для надійного виявлення паразитів. Єдиним винятком є описане тут фарбування для виявлення *Cryptosporidium*.

Ооцисти *Cryptosporidium* можна виявити в тонких фекальних мазках після фарбування. Після модифікованого фарбування за Цилем- Нільсеном (кислотостійке фарбування) ооцисти виглядають як округлі об’єкти рожевого кольору (діаметр 4–6 мкм) на бірюзовому фоні. Після фарбування карболфуксином за Гейне ооцисти видно у вигляді безбарвних структур на червонуватому фоні. Для виявлення таких ооцист також придатне інше фарбування, наприклад фарбування за Кіньюном.

Вимоги до відбору фекального матеріалу:
1 г фекалій, напіврідких або рідких (змішаних з водою, якщо вони занадто тверді).

Процедура фарбування (за Цилем- Нільсеном):

1. Розподіліть фекальний матеріал тонким шаром на предметному склі мікроскопа за допомогою ватної палички.
2. Висушіть на повітрі приблизно 30 хвилин при кімнатній температурі.
3. Фіксуйте в метанолі протягом 5 хвилин у боксі для фарбування.
4. Висушіть на повітрі.
5. Фарбувати карболфуксином протягом 4 хвилин у фарбувальному боксі.
6. Промийте холодною проточною водою.
7. Знебарвіть кислим спиртом в боксі для фарбування, до знебарвлення.
8. Промийте холодною проточною водою.
9. Зафіксуйте малахітовим зеленим протягом 4 хвилин у боксі для фарбування.
10. Промийте холодною проточною водою.
11. Висушіть на повітрі.
12. Проведіть мікроскопічне дослідження з 400–1000-кратним збільшенням (масляна імерсія), виявляючи округлі об'єкти рожевого кольору (діаметр 4–6 мкм).

Процедура (фарбування за Гейне):

1. Змішайте краплю фекалій з карболфуксином і нанесіть тонким шаром на предметне скло мікроскопа.
2. Залиште висихати на повітрі, доки поверхня не стане тьмяною, і негайно огляньте під мікроскопом за допомогою масляної імерсії, як описано вище.

1.2.12. Метод клейкої стрічки (скотчу)

Метод прямого відбитка використовує прозору клейку стрічку (приблизно 1 см завширшки та 4 см завдовжки) для збору матеріалу навколо заднього проходу коней для виявлення яєць *Oxyuris equi*. Цей же метод можна застосувати для виявлення яєць *Echinococcus* та інших теніїд з періанальної області собак. Липка сторона стрічки кілька разів притискається до шкіри. Потім її притискають (також липкою стороною донизу) на предметне скло. Стрічка служить покривним склом, і зразок можна оцінити під мікроскопом.

1.2.13. Комерційні набори для аналізу фекалій / InPouch™ TF Feline/тести на копроантиген

Для полегшення дослідження фекалій, наявні комерційні набори для виконання процедури флотації (наприклад, Parasite Diagnosis System®, ParaTest®, Fecalyzer®, Ovatec® Plus); ці набори працюють із готовим до використання флотаційним розчином (питома вага 1.2) і посудиною для аналізу.

Загалом ці набори найкраще підходять для аналізу фекалій у собак і котів. Вони привабливі, тому що зручні для користувача та є гігієнічним способом обробки та дослідження зразків фекалій.

Однак слід взяти до уваги, що набори здатні обробляти лише невелику кількість фекалій, оскільки посудина мала, і процедура може передбачати встановлення зразка фекалій на нижній стороні вставки фільтра. Як наслідок, набори підходять лише для зразків, зібраних у м'ясоїдних тварин, і, у випадку легких інвазій, мають нижчу чутливість виявлення (менша кількість досліджуваних фекалій, нижча питома вага флотаційних розчинів, відсутність концентрації центрифугуванням) порівняно з наборами комбінованого седиментаційно-флотаційного методу, описаного вище. Крім того, зазвичай неможливо макроскопічно перевірити зразок (наприклад, на наявність проглотид), якщо власник тварини вже закрив контейнер із зразком фекалій перед тим, як принести його на аналіз. Порівняно зі звичайними методами, аналіз за допомогою набору вимагає дорожчих витрат і утворює більше пластикових відходів, оскільки використовуються одноразові компоненти.

InPouch™ TF Feline

Ця процедура використовується для культивування та виявлення трофозоїдів *Tritrichomonas fetus* у фекаліях котів. Фекалії (0.03 г, що відповідає розміру голівки шпильки) вносять за допомогою стерильного ватного тампона в комерційно доступний пакет (InPouch™ TF Feline), що містить середовище для культивування. Мішечок маркують і датують, а потім закривають для культивування у вертикальному положенні при 37°C протягом 24 годин, потім зберігають при кімнатній температурі в темряві. Мішечок перевіряють на наявність трофозоїтів під мікроскопом через 24 години, 48 годин, а потім кожні два дні до 12 днів.

Хоча тест вважається специфічним для *T. fetus* , непатогенні джгутикові, такі як *Pentatrichomonas* можуть з'являтися в культурі, що вимагає молекулярної диференціації.

Тести на копроантигени та інші аналізи для виявлення паразитів з використанням антитіл

Тести на копроантигени якісно виявляють антигени паразитів у калових масах і широко використовуються як аналізи на місці надання медичної допомоги, а також у спеціалізованих лабораторіях, оскільки їх чутливість висока при використанні для обстеження цільового виду хазяїв. Формати для виявлення копроантигенів можуть включати прямі імунофлюоресцентні аналізи (DFA) на пластинках, ELISA або імунодетекційні тести (EIA) для виявлення антигенів у пластинках з 96 ячейками або імунолатексні стрічки-тести (ICT) (див. також Таблицю 3). Оскільки наразі доступні тести, розроблені спеціально для собак і котів, їм віддають перевагу перед тестами, розробленими для зразків калу людини, через покращену якість контролю, особливо щодо специфічності.

У випадку лямблій слід зазначити, що виявлення копроантигену не завжди корелює із захворюванням, і результати тесту слід інтерпретувати разом із клінічними ознаками.

Таблиця 3: Приклади комерційно доступних тестів на копроантиген (без претензій на повноту)

аналіз	Виробник	Виявлені паразити	Формат	Вид-хазяїна*
Anigen Rapid CPV/CCV/Giardia Ag 2.0	BioNote , Корея	лямблії	імунохроматографія	собака, кіт
*FAST*est® GIARDIA Strip	Megacor, Австрія	лямблії	імунохроматографія	собака, кіт
*FAST*est® CRYPTO-GIARDIA Strip	Megacor, Австрія	Лямблії/ криптоспоридії	імунохроматографія	собака, кіт
SNAP® *Giardia*	IDEXX, США	лямблії	ІФА	собака, кіт
Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*	Meridian Bioscience, Великобританія	Лямблії/ криптоспоридії	пряма імунофлюоресцентна детекція	собака
PetChek™ IP Fecal Dx™***	IDEXX, США	Giardia, аскариди Trichuridae, анкілостоми	ІФА	собака, кіт***
Speed Giardia™	BVT- Virbac , Франція	лямблії	імунохроматографія	собака, кіт
Uranotest® Giardia	Uranovet, Іспанія	лямблії	імунохроматографія	собака, кіт
WITNESS® GIARDIA	Operon SA, Іспанія****	лямблії	імунохроматографія	собака, кіт

* згідно з інструкцією виробника; деякі аналізи можна поширити на інші види, як описано в літературі.

** Набір для збору IP PetChek™ , який продається ветеринарним практикам, зразки надаються виробнику для тестування. Фекальний Dx™ відноситься до тих же тестів і тієї ж компанії.

*** описано для використання у собак.

**** розповсюджується Zoetis.

2. СЕРОЛОГІЯ

2.1. Загальна інформація

Серологічним тестам надають перевагу перед прямим виявленням в хронічних інфекціях, коли низька щільність паразитів у субстраті для прямого виявлення знижує рівень успіху, наприклад, при бабезіозі чи неоспорозі, або у випадках, коли інфіковану тканину неможливо відібрати, а стадії паразитів не доступні безпосередньо в рідинах організму. Прикладами цього є найпростіші, що живуть у тканинах, які спричиняють хронічні інфекції в тканинах, наприклад, у тканинах мозку чи ока *Toxoplasma gondii* або *Encephalitozoon cuniculi*. У діагностиці лейшманіозу собак поряд із прямим виявленням використовуються серологічні аналізи, щоб підтримати правильну інтерпретацію інфекції та імунологічного статусу тварин, контролювати реакцію на лікування та передбачати можливий рецидив.

Виявлення антигену

Подібно до тестів на копроантиген, які виявляють антиген у фекаліях (див. 1.2.13.), серологічне виявлення антигенів означає, що частини паразита (соматичні антигени) або екскреторні/секреторні антигени, що виробляються паразитом, безпосередньо виявляються в крові чи сироватці. Подібно до виявлення ДНК, це надає прямі докази присутності паразита в кровообігу, а отже, інформацію про поточний стан інфекції. *Dirofilaria immitis* і *Angiostrongylus vasorum* є паразитами крові, антигени яких можна виявити серологічно (див. Таблицю 4).

Таблиця 4: Вибір комерційно доступних серологічних тестів для діагностики паразитів або переносних патогенів у собак, кішок і коней.

(Джерела: www.megacor.at; www.laboklin.de; www.idexx.ch; uranovet.com та інші; без претензій на повноту)

аналіз	Виробник	Виявлені паразити або бактерії, що передаються переносниками	Формат	Вид-хазяїна
Тести на виявлення антигену				
Anigen Rapid CHW Ag 2.0	BioNote , Корея	*Dirofilaria immitis*	Латеральна імунохроматографія	собака
DiroCHEK®	Zoetic, США	*Dirofilaria immitis*	ІФА	собака
*FAST*est® HW Antigen	Мегакор , Австрія	*Dirofilaria immitis*	ІФА	собака
Angio Detect™ Test	IDEXX, США	*Angiostrongylus vasorum*	Латеральна імунохроматографія	собака
Speed Diro™	BVT- Virbac , Франція	*Dirofilaria immitis*	Латеральна імунохроматографія	собака
Uranotest® Dirofilaria	Uranovet, Іспанія	*Dirofilaria immitis*	Латеральна імунохроматографія	собака, кіт
WITNESS® Dirofilaria	Zoetis, USA	*Dirofilaria immitis*	Латеральна імунохроматографія	собака
Тести на виявлення антитіл				
ANAPLASMA-ELISA DOG	Afosa , Німеччина	*Anaplasma phagocytophilum*	ІФА	собака
Anigen Rapid Leishmania Ab	BioNote , Корея	*Leishmania infantum*	Латеральна імунохроматографія	собака
BABESIA-ELISA DOG	Афоса , Німеччина	*Babesia canis*	ІФА	пес
EHRLICHIA-ELISA DOG	Afosa, Німеччина	*Ehrlichia canis*	ІФА	собака
Diagnosteq	Ліверпульський університет, Великобританія	*Anoplocephala perfoliata*	ІФА	кінь
EquiSal	Austin Davis Biologics, Великобританія	*Anoplocephala perfoliata*	ІФА (з використанням слини)	кінь
LEISHMANIA-IgG ELISA DOG	Afosa, Німеччина	*Leishmania infantum*	ІФА	собака
SARCOPTES-ELISA 2001 DOG	Afosa, Німеччина	*Sarcoptes scabiei* var. *canis*	ІФА	собака
SNAP® *Leishmania*	IDEXX, США	*Leishmania infantum*	ІФА	собака
Speed Leish K™	BVT- Virbac , Франція	*Leishmania infantum*	Латеральна імунохроматографія	собака
Uranotest® Ehrlichia-Anaplasma	Uranovet, Іспанія	*Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*	Латеральна імунохроматографія	собака
Uranotest® Ehrlichia	Uranovet, Іспанія	*Ehrlichia canis*	Латеральна імунохроматографія	собака
Uranotest® Leishmania	Uranovet, Іспанія	*Leishmania infantum*	Латеральна імунохроматографія	собака
Тести на виявлення змішаних антигенів (Ag) і антитіл (Ab).				
SNAP® 4Dx® Plus	IDEXX, США	*Dirofilaria immitis* (Ag) B*orrelia burgdorferi* (Ab) *Ehrlichia canis* (Ab) (*E. ewingii, E. chaffeensis*) *Anaplasma phagocytophilum* (Ab), *A. platys* (Ab)	ІФА	собака
Uranotest® Quattro	Uranovet, Іспанія	*Dirofilaria immitis* (Ag) *Leishmania infantum* (Ab) *Ehrlichia canis* (Ab), *A. platys* (Ab)	Імунохроматографія	собака

Виявлення антитіл

Виявлення специфічних антитіл проти паразитів в одному зразку вказує на те, чи зазнавала тварина раніше цього антигену/паразита. Оскільки вироблення антитіл відбувається із затримкою, їх зазвичай можна виявити лише через 2–3 тижні після первинної інфекції. Антитіла також зберігаються після елімінації збудника, у багатьох випадках від тижнів до місяців/років із великими індивідуальними та специфічними для патогена варіаціями. Важливо брати до уваги антитіла, отримані з інших джерел, ніж інфекція, наприклад, попередня вакцинація (наприклад, проти *лейшманії* чи *бабезії*) або материнські антитіла у дуже молодих тварин. Перехресна реактивність з іншими організмами або неспецифічні реакції можуть обмежити специфічність серологічних тестів.

Щоб зменшити кількість помилкових результатів, серологічні тести можна повторити через певний період часу (зазвичай через 2–3 тижні), щоб перевірити, чи змінилися значення. Якщо тварина з попередніми негативними або низькими значеннями має зростаюче або позитивне значення, це можна інтерпретувати як активну/триваючу інфекцію; якщо значення зменшується або перетворюється на негативне, зараження припиняється. Однак із цього правила є винятки.

Щоб перевірити коливання титрів антитіл, можна використовувати або кількісний ELISA (зі значеннями одиниці, балу або концентрації), або напівкількісний аналіз ІФА (титри). Швидкі аналізи в клініці є якісними за своєю природою і дозволяють лише визначити, серологічно позитивна чи негативна тварина.
Формати виявлення антитіл нагадують формати виявлення антигену, за винятком того, що субстрат для виявлення змінюється. Оскільки більшість форматів обмежено спеціалізованими лабораторіями, оскільки для проведення тестів потрібне спеціальне обладнання, у цьому документі методи не описані детально, а перераховані лише різні формати та доступні на практиці тести.

Як правило, виявлення антитіл застосовується для оцінки інфекційного статусу позакишкових найпростіших, які викликають хронічні інфекції, таких як *T. gondii*, *E. cuniculi* (кішки та собаки), *Neospora caninum* (собаки), *Sarcocystis neurona* (коні), а також багато трансмісійних патогенів, включаючи *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Dirofilaria immitis* (кішки), *Angiostrongylus vasorum* (собаки), *Babesia caballi* і *Theileria equi* (коні). Для собак виявлення антитіл проти метацестод при альвеолярному ехінококозі можна використовувати в спеціалізованих лабораторіях.

Крім того, зараження *Anoplocephala perfoliata* у коней можна діагностувати шляхом виявлення антитіл у сироватці або слині. Для собак безпосереднє виявлення саркоптозу може підтверджуватися використанням серологічного тесту на антитіла.

Деякі лабораторії пропонують «пакети подорожуючим» для собак, поєднуючи різні тести (серологічні, ПЛР, виявлення антигену, тест Knott'a та інші) на різноманітні «екзотичні» збудники. Однак слід враховувати різницю в інкубаційному періоді та появі клінічних ознак захворювання. У деяких випадках може бути доцільним повторне тестування.

Деякі країни вводять національні правила щодо тестування на піроплазмоз коней.

Забезпечення якості серологічних тест-систем

Як і всі діагностичні тести, серологічні аналізи мають різні рівні чутливості та специфічності. Хорошою клінічною практикою є завжди включати позитивні та негативні контролі в серологічний тест. Багато лабораторій пропонують довідкову інформацію про технічну якість своїх тестів і засобів інтерпретації, особливо щодо впливу на, наприклад, титри вакцинації, перехресну реактивність із близькоспорідненими патогенами та інші фактори, які необхідно враховувати для інтерпретації тесту.

Залежно від клінічної картини та вимог до тесту, може бути доцільно поєднати серологічний тест з іншими методами прямого виявлення або, якщо це неможливо, з іншою непрямою тест-системою для виявлення антитіл. Вестерн-блот часто використовують як еталонний тест на інфекції людини, але через обмеження вартості та часу його застосування у ветеринарній діагностиці зазвичай обмежується дослідженнями, за кількома винятками.

У відповідних випадках імуноглобуліни, що виробляються під час активних підгострих інфекцій (IgM), диференціюють від тих, що домінують при хронічних інфекціях (IgG).

Щоб оцінити успішність лікування лейшманіозу собак, серології може бути недостатньо, оскільки антитіла можуть зберігатися протягом кількох місяців або років після клінічного одужання, оскільки паразита неможливо усунути. Тому рекомендуються подальші лабораторні аналізи для оцінки імунологічного стану та стану здоров'я пацієнта. Кількісна ПЛР дозволяє оцінити паразитарне навантаження в порівняних тканинах, що може бути корисним для подальшого спостереження під час лікування лейшманіозу собак, хоча цей підхід потребує ретельної оцінки.

2.2. Кількісні методи виявлення антитіл

2.2.1. Непрямий флюоресцентний тест на антитіла (IFAT)

Тест на непрямі флюоресцентні антитіла заснований на виявленні специфічних антитіл, які зв'язуються з антигенами (тобто інактивованими цілими паразитами), іммобілізованими на предметних скельцях, і згодом виявляються вторинним антитілом. Це антитіло зв'язується з незмінною ділянкою первинного (сироваткового) антитіла, яке ковалентно зв'язане з флюорофором. За допомогою флюоресцентної світлової мікроскопії флюорофор зв'язаного антитіла виявляється на відповідній довжині хвилі. Техніка дуже точна, якщо її виконувати належним чином, але займає багато часу та вимагає певного рівня підготовки та досвіду. Однак для дрібних тварин він все ще широко використовується, оскільки менш схильний до неспецифічних реакцій. Недоліком IFAT є те, що не всі антигени однаково доступні для антитіл, тому чутливість може бути низькою порівняно з іншими тестами. Оскільки результати виражені в титрах, вони дають напівкількісний результат, який може бути корисним для подальших досліджень.

2.2.2. Імуноферментний аналіз (ELISA)

Імуноферментний аналіз (ELISA) виявляє специфічні антигени або антитіла, які зв'язуються з обробленим антигеном (тобто цілим лізатом нативних антигенів або рекомбінантних антигенів) або антитілами, абсорбованими пластиковою поверхнею (непрямий ELISA). У цьому випадку вторинне антитіло мічене ферментом, який індукує зміну кольору хромофорного субстрату, яку можна виміряти та кількісно визначити шляхом вимірювання оптичної щільності. Більш складною формою є сендвіч-ІФА, який не зв'язує антиген безпосередньо з пластиковою поверхнею, а використовує антитіла, пов'язані з цією поверхнею, щоб «уловлювати» специфічні антигени. Цей метод використовується, коли пряме зв'язування сумішей антигенів з твердою фазою призводить до зниження специфічності тесту. Можливі інші формати ІФА.

ІФА є більш стандартизованим форматом тесту, оскільки він поставляється в 96-лункових планшетах і часто налаштовується разом із контролем, тому для проведення тесту не потрібна експертиза щодо конкретного патогена. Результати тесту зазвичай виражаються у вигляді значень абсорбції, результатів тесту, концентрацій або одиниць антитіл, і в більшості випадків для виявлення специфічних антитіл використовується лише одне розведення діагностичного матеріалу, а для виявлення антигену – низькі розведення. Тому інтенсивність реакції не завжди корелює з кількістю присутніх антитіл (при сильних позитивних реакціях система може бути насиченою).

Оскільки формати ELISA є більш стандартизованими, ніж IFAT, а оптичне зчитування є менш суб'єктивним, ніж мікроскопія, кількісний ELISA є кращим ніж IFAT для виявлення змін титру антитіл з часом.

В окремих випадках можна досліджувати інші субстрати, ніж кров, як, наприклад, у випадку *Anoplocephala perfoliata* у слині коней (EquiSal®).

2.3. Якісні методи

2.3.1. Системи швидкого тестування

Швидкі тести на основі ферментів (з використанням антитіл, ковалентно зв'язаних з ферментом і з використанням етапу промивання) або імунохроматографічні тести (з використанням антитіл, зв'язаних із колоїдним золотом і без етапу промивання) доступні для швидкої діагностики різних інфекційних захворювань на місці. Вони постачаються спеціалізованими компаніями, які забезпечують гарантію якості своїх тестів і постачають усі матеріали, включаючи позитивні та негативні контролі, які включені до тесту. Тести прості та швидкі у виконанні та не вимагають спеціальної підготовки. Однак їх не слід використовувати у випадках і хазяїв, відмінних від тих, що вказані в тестових документах. Оцінений рівень антитіл або антигену зазвичай недостатньо точний, щоб визначити підвищення або зниження титру.

3. ОГЛЯД ШКІРИ

3.1. Загальна інформація

Цей розділ присвячено ідентифікації зовнішніх паразитів, які викликають захворювання безпосередньо через їхню присутність на шкірі собак, кішок, коней і дрібних домашніх ссавців.

Блохи, воші та кліщі викликають паразитарні захворювання через пряму дію та/або через передачу патогенів.

Діагностика зараження шкіри дрібнішими ектопаразитами, такими як кліщі, та диференціація ізольованих зразків зазвичай потребують мікроскопічної ідентифікації однієї або кількох життєвих стадій паразита. Діагностичний успіх залежить від правильного збору матеріалу та, після будь-якої необхідної обробки, дослідження під світловим мікроскопом, бажано з опущеним конденсором і затемненим джерелом світла.

У наступному розділі наведено описи найбільш часто використовуваних методів ізоляції ектопаразитів.

3.2. Зчісування бліх

«Блошиний гребінець» — це гребінець із дрібними зубами, який використовується для збирання бруду з шерсті тварин.

За явної відсутності дуже рухливих бліх, їхні фекалії можна виявити, розчесавши тварину та поклавши зібраний матеріал на вологий білий папір, серветку або вату: чорні плями фекалій блох оточені червоним кільцем неперетравленої крові.

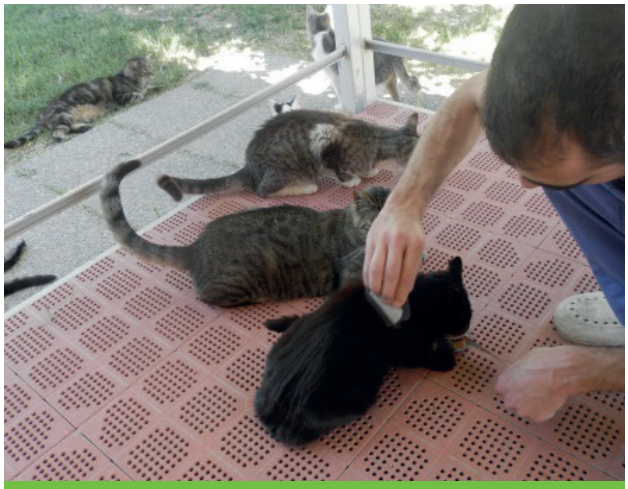


Рисунок 2: Розчісування бліх



Рисунок 3: Фекалії бліх, що містять кров, підтверджується додаванням води

Зчісування також може бути корисним для діагностики *Cheyletiella* і зараження вошами. Зібраний бруд можна помістити в чашку Петрі та дослідити за допомогою стереомікроскопа: серед бруду можна виявити кліщів («ходяча лупа»). Ще один спосіб визначення вошей або кліщів *Cheyletiella* - збір лупи з гребінця клейкою стрічкою (див. 1.2.12). Нативна мікроскопія дозволяє ідентифікувати цих паразитів або їх яйця.

3.3. Зішкріб шкіри

Зішкріб шкіри дозволяє брати зразки з перших (поверхневих) або всіх шарів (глибоких) епідермісу, щоб виявити ектопаразитів, які або залишаються на поверхні шкіри, або живуть у більш глибоких структурах, як-от волосяні фолікули. Відбір зразків проводиться на краю шкірних уражень або в ймовірних місцях перебування ектопаразитів.

Зішкріб проводять лезом скальпеля або кюреткою. Мінеральне масло слід нанести на лезо скальпеля та шкіру, щоб дозволити бруду і паразитам прилипнути до леза. Якщо необхідне обрізання, слід використовувати лише ножиці, і бажано зішкребти шкіру, яка не була пошкоджена надмірним подряпанням.

Зразок слід перемістити в прозорий пластиковий контейнер з великим отвором, який можна щільно закрити.

Спочатку шкірний матеріал і стінки пластикового контейнера можна оглянути за допомогою стереомікроскопа або лупи, оскільки кліщі та інші членистоногі мають тенденцію мігрувати зі шкірного матеріалу. Потім зібраний матеріал можна нанести на предметне скло, накрити накривним і дослідити під мікроскопом при 40–100-кратному збільшенні. На предметне скло також слід нанести мінеральне масло (або краплю гліцерину).

Як поверхневі, так і глибокі зішкріби шкіри в ідеалі повинні бути взяті з відносно великих частин тіла, що межують з підозрілими ділянками.

Для **собак і котів** , зішкріб рекомендується для встановлення діагнозу корости (наприклад, *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*), демодекозу (*Demodex* spp.), хейлетієльозу (*Cheyletiella* spp.) або інвазії тромбікулід (личинки *Trombicula autumnalis*). Зокрема:

- При підозрі на *Demodex canis* інвазії, доцільно почати з трихограми (див. 3.5.): якщо кліщі *Demodex* присутні та прикріплені до волосків, більше не потрібно виконувати зішкріб шкіри.
- Для *S. scabiei* у собак слід брати глибокі зішкріби шкіри з ліктів, країв вух і бічних скакових суглобів. Повідомлялося, що понад 50% зішкрібів у собак із саркоптозом є негативними; тому, щоб підвищити чутливість, слід взяти кілька зразків (6–10) з різних підозрілих місць на тварині. Крім того, деякі лабораторії пропонують ELISA для виявлення антитіл проти *S. scabiei*, що допомагає покращити діагностику (див. Таблицю 4).
- Для *Demodex gatoi* у котів прийнятна така ж процедура, як і для зішкрібів *S. scabiei* у собак.
- З метою виявлення кліщів *Cheyletiella*, можна зішкребти зі спини і вушних раковин; однак рекомендованою технікою являється метод клейкої стрічки (див. 3.4.).
- Зішкріб шкіри також дозволить виявити ендопаразитів у шкірі, тобто личинок нематод *Pelodera*, *Uncinaria*, *Ancylostoma* або промастиготні стадії лейшманії. Іноді також можна знайти мікрофілярії діpофілярій. Для підтвердження виду слід провести подальшу біомолекулярну диференціацію.

Зішкріб шкіри також можна використовувати для виявлення кліщів на **дрібних домашніх ссавцях**.

Глибокий зішкріб шкіри рекомендується для виявлення фолікулярних кліщів *Demodex*, які живуть глибоко в волосяних цибулинах. Для виявлення демодекс необхідно зішкребти ділянки облисіння лезом або кюреткою, змащеними мінеральним маслом, у напрямку росту волосся до появи капілярної крові. Перед або під час зішкрібання шкіру слід здавити, щоб сприяти видавлюванню кліщів *Demodex* з волосяних фолікулів.

Оцінка кількості та життєздатності паразитів впродовж різних етапів життя корисна для оцінки відповіді на лікування. У той час як здорові собаки часто містять низьку кількість *Demodex*, клінічно уражені тварини зазвичай мають високу кількість кліщів, і в цьому випадку пряма діагностика має високу чутливість. Однак було повідомлено, що глибокі зішкрібки можуть дати хибні негативні результати на демодекс, зокрема з ділянок, які важко зішкребти (очей, міжпальцевих проміжків), а також у деяких порід (староанглійська вівчарка, шотландський тер'єр, шарпей). У цих випадках трихограми (див. 3.5.) можуть бути більш корисними для отримання достатньої кількості діагностичного матеріалу. Нещодавно було показано, що застосування методу наклеювання клейкої стрічки (див. 3.4.) і здавлювання шкіри має вищий показник успішності діагностики, ніж глибоке вишкрібання на *Demodex* ; ця процедура також менш болюча для собак і котів.

У **коней** глибокі зішкріби шкіри можна використовувати для виявлення *Demodex*, а також стадій нематод (*Pelodera*, *Strongyloides* і *Habronema*).

Поверхневі зішкріби шкіри

У **собак** , для більш поверхневих кліщів *Demodex* з коротким тілом, можна зробити поверхневі зішкрібки шкіри, як альтернативу методу клейкої стрічки (див. 3.4.) і трихограми (див. 3.5.).

У **коней** поверхневі зішкріби шкіри можна використовувати для ідентифікації кліщів *Chorioptes*, *Psoroptes*, *Sarcoptes*. личинок *Trombicula*, а також фуражних кліщів (*Pediculoides ventricosus*, *Pyemotes tritici*, *Acarus farinae*).

Поверхневі зішкріби шкіри (а також метод клейкої стрічки) також корисні для виявлення вошей.

Обробка шкірного матеріалу розчином гідроксиду калію (КОН) або лактофенолу

Зіскоблений матеріал можна обробити, додавши 10% розчин КОН або лактофенол протягом принаймні 2-3 годин, часто протягом ночі, при кімнатній температурі. Крім того, нагрівання розчину КОН у відповідному контейнері скорочує процедуру. Розчин КОН і лактофенол мацерують кератинові речовини шкіри, залишаючи недоторканими хітинові екзоскелети членистоногих. Суспензію можна досліджувати в чашці Петрі під стереомікроскопом або на предметному склі під мікроскопом (40–100-кратне збільшення). Для точної ідентифікації членистоногих необхідно перенести на предметне скло і диференціювати. Потенційні членистоногі, яких необхідно ідентифікувати: кусаючі та сисні воші, кліщі (*Cheyletiella, Trombicula, Demodex, Sarcoptes, Notoedres*).

3.4. Метод клейкої стрічки (скотчу)

Техніка прямого відбитка (тому також називається методом відбитка ацетатною стрічкою) використовує прозору липку стрічку (приблизно 1 см завширшки та 4 см завдовжки) для збирання бруду з поверхні шкіри та волосяного покриву, як описано в 1.2.12. Липка сторона стрічки кілька разів притискається до шкіри. Потім її притискають (також липкою стороною донизу) на предметне скло. Стрічка служить покривним склом (збільшення: 40–100x).

Зазвичай беруть кілька зразків з різних ділянок шкіри. Цей прийом особливо корисний для кліщів з коротким тілом *Cheyletiella* і *Demodex*, оскільки з більшої площі поверхні можна взяти пробу дуже швидко.

У **коней** метод відбитка ацетатної стрічки можна використовувати для виявлення *Chorioptes equi*, *Dermanyssus gallinae* й вошей. Для *Demodex*, що живе у фолікулах , стрічку можна наклеїти на вибране ураження як альтернативу глибоким зіскрібкам шкіри. Потім шкіру слід стиснути під ацетатною стрічкою, а потім прикріпити стрічку до предметного скла.

3.5. Трихограма

Трихограма - це мікроскопічне дослідження вищипаного волосся. Позитивні вищипування волосся можуть замінити зішкріби шкіри в місцях, які важко зішкребти, наприклад, повіки, навколоочна область, морда чи лапи, або коли ураження дуже болючі. Щипці використовуються для того, щоб з силою вищипувати волоски в напрямку росту волосся. Якщо можливо, шкіру здавлюють перед і під час забору. Потім принаймні 40 (в ідеалі 50–100) волосин поміщають на предметне скло з мінеральною олією та накривним скельцем та оцінюють під малим збільшенням. У разі підозри на зараження демодексом доцільно почати з трихограми: якщо кліщі *Demodex* наявні та прикріплені до волосків, в подальшому зішкріб шкіри не потрібно робити.

3.6. Виявлення кліща у вушній сірці

Збір вушної сірки у **собак і котів** часто дає чудові результати у тварин, уражених *Otodectes cynotis*. Вушних кліщів часто можна помітити при отоскопічному дослідженні, і типовим є густий темно-коричневий бруд. Цей бруд можна зібрати або за допомогою ватного тампона (якщо він має восковий вигляд), або за допомогою кюретки (якщо він сухий та має кірку) і оцінити під мікроскопом після подрібнення лезом скальпеля та змішування з мінеральною олією.

Такий самий підхід можна використати для виявлення *Psoroptes cuniculi* у вухах **кроликів** , хоча кількість бруду, що утворюється під час такої інвазії, може вимагати перетравлення гідроксидом калію (КОН) або лактофенолом для вивільнення кліщів.

3.7. Біомолекулярні методи

Що стосується ендопаразитів, то у випадках, коли морфологія членистоногих не дозволяє їх ідентифікувати, можуть бути прийняті методи на основі виявлення ДНК (див. 4.5.). Для цієї процедури живих членистоногих можна консервувати в 70% спирті або заморозити.

4. РІЗНЕ

4.1. Мазки крові

4.1.1. Загальна інформація

Свіжоприготовлені мазки зі зразків крові, зібраної з антикоагулянтом, можна використовувати для діагностики ряду паразитарних інфекцій. Незважаючи на те, що наявність паразитів у крові може бути рідкісним, особливо при хронічних формах захворювання, легкість і швидкість взяття мазка крові може забезпечити швидкий і недорогий діагностичний підхід.

Необхідні матеріали:

- два предметних скла, протертих спиртом
- зразок крові з антикоагулянтом

Процедура:

1. Помістіть дуже маленьку краплю крові біля краю одного предметного скла.
2. Помістіть кінець іншого предметного скла на перше так, щоб край скельця з короткою стороною знаходився трохи нижче краплі крові.
3. Друге предметне скло тримайте під кутом 30°.
4. Натисніть на друге предметне скло так, щоб край ледь торкався краплі крові; за допомогою капілярної сили тонка смужка крові розтікається по краю предметного скла.
5. Швидко проведіть розподілювачем по всій довжині предметного скла зразка одним плавним рухом (мазок має закінчуватися «переподібним краєм»).
6. Висушіть на повітрі та пофарбуйте (Diff Quick).

Висушені на повітрі предметні стекла фіксують у метанолі протягом 5–10 хвилин і фарбують розчинами Гімзи, Diff-Quick, Hemocolor або іншими комерційно доступними готовими розчинами, щоб можна було розпізнати характеристики найпростіших. Слід зазначити, що артефакти плям від погано зафіксованих розмазів можуть призвести до хибнопозитивних результатів.

4.1.2. Збудники, виявлені в мазках крові

Піроплазміди

Найпростіші знаходяться в еритроцитах. Периферійна капілярна кров, взята з вушної раковини, кінчика хвоста або з підготовленого buffy coat шару (див. 4.2.), може містити більше число клітин, інфікованих паразитами, тому при першому зверненнii з хворою твариною можлива швидка діагностика гострої хвороби. У хронічних випадках паразитемія зазвичай незначна. Види *Babesia* або *Theileria* можна відрізнити залежно від розміру мерозоїтів в еритроцитах, великі (>3 мкм) і малі (<3 мкм)(див. Таблицю 5), але для надійної диференціації необхідний молекулярний підхід, оскільки великі *Babesia* можуть представляти собою нетипові малі форми. Різні види *Babesia* можна здебільшого морфологічно відрізнити один від одного на основі кількості мерозоїтів, кута між ними та їхнього положення в еритроциті (див. Таблицю 5). Історія хвороби (час перебування в ендемічних районах, зараження кліщами), клінічні ознаки та інші діагностичні процедури, такі як сероконверсія та виявлення ДНК (див. 4.5.), можуть підтвердити діагноз.

Деякі країни вводять національні правила щодо імпорту коней і тестування на піроплазмоз коней.

Таблиця 5: Діагностичні характеристики для морфометричної ідентифікації піроплазмідних агентів у собак, кішок і коней.

Докладні відомості про патогенність, переносники та поширення див. у Рекомендаціях ESCCAP 5: Контроль трансмісивних хвороб собак та котів.

Піроплазміди собак			
	Розмір (мерозоїти)	**Положення в еритроциті**	**Кут/інше**
Babesia canis	великий	центральний	гострий
B. vogeli	великий	центральний	гострий
B. rossi	великий	центральний	гострий
B. gibsoni і *gibsoni*-like	маленький	центральний	-
B. conradae	маленький	центральний	-
*B. vulpes**	маленький	центральний	-
Піроплазміди кішок			
B. felis	маленький	центральний	Мальтійський хрест
Babesia spp.	великий	центральний	-
Cytauxzoon spp.	маленький	змінна	паличко- або комо-подібні
Піроплазміди коней			
B. caballi	великий	центральний	гострий
Theileria equi	маленький	змінна	плеоморф (1-4 мерозоїти, в тому числі мальтійський хрест)

* *Babesia vulpes* включає раніше вживані назви *Theileria*/*Babesia annae* і *Babesia microti*-like.

Hepatozoon spp.

Hepatozoon spp. - це протозойні агенти, що передаються вектором (при пероральному прийомі інфікованих кліщів). У регіонах Європи з теплим кліматом *Hepatozoon canis* є звичайним паразитом у псових, тоді як *Hepatozoon americanum* зустрічається у псових в США. *Hepatozoon felis* і *H. silvestris* є рідкісними паразитами котячих. Інколи *H. canis* також можна знайти у котів. У мазках крові можна знайти гамонти у вигляді типових цеглиноподібних структур в основному в нейтрофільних гранулоцитах.

Личинки (мікрофілярії) *Dirofilaria* та інші філяріоїдні нематоди

Мікрофілярії патогенних (*D. immitis, D. repens*) і апатогенних філяріоїдних нематод можна виявити в мазках крові, тому їх слід диференціювати (див. 4.4.).

Рикетсії (Anaplasmataceae)

Ehrlichia spp. є грамнегативними, облігатними внутрішньоклітинними бактеріями, що передаються переносниками. В Європі *Ehrlichia canis* є етіологічним збудником моноцитарного ерліхіозу собак (МЕС). Цей збудник вражає головним чином моноцити, в яких розвиваються типові, але рідко спостерігаються мікроколонії (морули). *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* є етіологічним збудником неоерліхіозу у собак. Також *Ehrlichia* spp. (*E. chaffeensis, E. ewingii*) є ендемічними в неотропіках і рідко виявляються в Європі. *Ehrlichia canis* або близькоспоріднений вид був описаний у котів, але не має ветеринарного значення.

Anaplasma spp. є грамнегативними, облігатними внутрішньоклітинними бактеріями, що передаються переносниками. У Європі повідомлялося про *A. platys* у домашніх собак і *A. phagocytophilum* у собак, котів, коней та ін. Вони інфікують тромбоцити (*A. platys*) або переважно нейтрофільні гранулоцити (*A. phagocytophilum*), відповідно і розвиваються в типові мікроколонії (морули), які можна спостерігати в гострій стадії за допомогою світлової мікроскопії.

Mycoplasma spp. (син. *Haemobartonella* spp.) є невеликими грамнегативними бактеріями, які прикріплюються до поверхні еритроцитів, наприклад *Mycoplasma haemocanis* і *M. haemofelis* у собак і кішок відповідно. Інші менш патогенні види були описані переважно у кішок: *Candidatus Mycoplasma haemominutum* і *Candidatus Mycoplasma turicensis* але також у собак: *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. Методи виявлення ДНК підтримують виявлення та дозволяють диференціювати.

4.2. Метод Баффі Коут

Для цієї процедури мікрогематокритну пробірку заповнюють кров'ю з ЕДТА, закривають з одного кінця та центрифугують у гематокритній центрифузі протягом 5 хвилин. Трипаносоми і мікрофілярії накопичуються в зоні між лейкоцитами і плазмою. Лейкоцити концентрують на *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. або *Hepatozoon* spp. Оскількии *Babesia* spp. заражають ретикулоцити, а не дозрілі еритроцити, їх виявлення в зоні баффі коат є більш чутливим, ніж у цільній крові. Для мікроскопічного дослідження гематокритну пробірку зазначають склорізом на рівні зони баффі коут та розламують, щоб шар лейкоцитів та плазми можна було перенести на предметне скло. Додається крапля фізіологічного розчину або може бути зроблений пофарбований мазок для візуалізації паразитів.

4.3. Тонкоголкова аспіраційна пункція

4.3.1. Загальна інформація

Деякі найпростіші та трансмісійні збудники є внутрішньоклітинними облігатними паразитами лімфоцитів/моноцитів/макрофагів. Таким чином, аспірація кровотворних тканин (наприклад, лімфатичних вузлів, кісткового мозку, селезінки) може бути важливою як для їх морфологічної ідентифікації через мазки, так і для збору матеріалу для біомолекулярного аналізу (див. 4.5.). Тонкоголкові аспірати з внутрішніх органів, наприклад печінки, також можна використовувати для діагностики інфекцій, викликаних метацестодами *Echinococcus* spp. (альвеолярний і кістозний ехінококоз). Якщо для цього використовується селезінка, аспірацію слід проводити без негативного тиску, щоб уникнути кровотечі.

Необхідні матеріали:

- 15 мл шприц
- Голка 22-20 калібру
- Предметні скельця

Процедура:

1. Вставте голку в тканину та створіть негативний тиск у шприці, потягнувши поршень назад до 5–10 мл.
2. Підтримуйте цей негативний тиск, перенаправляйте голку в кількох напрямках, не відриваючи кінчика голки від тканини.
3. Відпустіть поршень шприца та вийміть голку з тканини (не виймайте голку з тканини, не відпустивши поршень, оскільки весь зібраний матеріал буде всмоктано в шприц).
4. Від'єднайте шприц від голки та наповніть його повітрям.
5. Знову приєднайте шприц до голки та за допомогою повітря видаліть зразок з голки на одне або декілька предметних скелець.
6. Змажте, висушіть і пофарбуйте, як для мазка крові (див. 4.1.).

4.3.2. Патогени, що виявляються в тонкоголкових аспіратах

Leishmania infantum

Аспірації лімфатичних вузлів, особливо у тварин з лімфаденопатією, є найбільш зручними, тоді як взяття зразків кісткового мозку та селезінки є більш інвазивним, але може бути показано для інфікованих клінічно здорових собак.

Амастиготи з типовою «Т»-подібною структурою ядра/кінетопласту можна побачити в цитоплазмі моноцитів/макрофагів, а також вільними в межах мазка.

У випадках, коли спостерігається кульгавість, амастиготи можна спостерігати в тонкоголкових аспіратах синовіальної рідини.

Аспірати з уражень шкіри також є можливим способом виявлення амастиготної інфекції *Leishmania* в макрофагах за допомогою цитології.

Ehrlichia canis

Чутливість мікроскопічного дослідження може бути вищою в тонкоголкових аспіратах лімфатичних вузлів, кісткового мозку чи селезінки або в препаратах лейкоцитів порівняно з мазком крові, але наразі рекомендованим методом діагностики є визначення ДНК за допомогою ПЛР.

4.4. Виявлення та ідентифікація мікрофілярій

4.4.1. Загальна інформація

Діагностика зараження філяріоїдними нематодами тварин-компаньйонів може бути проведена шляхом виділення та морфологічної ідентифікації циркулюючих мікрофілярій. Зразки крові слід досліджувати після концентрації за допомогою тесту Knott'a або методом фільтрації (комерційний тестовий набір: Difil -Test®). Вологі мазки крові не дозволяють визначити вид і мають дуже низьку чутливість.

Важливо зазначити, що кількість циркулюючих мікрофілярій не обов'язково корелює з кількістю дорослих червів, тобто собаки з високою мікрофіляремією можуть мати небагато дорослих червів. Крім того, час забору крові може впливати на чутливість для виявлення мікрофілярій: як для *D. repens* , так і для *D. immitis* описана тенденція до підвищення мікрофіляремії в нічний час.

Мікрофілярії можна диференціювати за допомогою морфометричних вимірювань, фарбування кислою фосфатазою або, особливо у сумнівних випадках, за допомогою біомолекулярних методів, що дозволяють діагностувати вид шляхом виділення ДНК із цільної крові та концентрації мікрофілярій шляхом центрифугування. Існують деякі обмеження в морфологічній ідентифікації циркулюючих мікрофілярій. Це включає вплив різних методів фіксації на розмір личинок, погане фарбування за допомогою кислотостійкої методики вибірки личинок у зразку та коінфекції непропорційною кількістю личинок різних видів. Видоспецифічна (у реальному часі) ПЛР (real-time) є методом вибору для диференціації видів.

І нарешті, хоча дирофіляріозна інвазія (*D. immitis*) може бути надійно діагностована за допомогою серології, завжди рекомендується проводити тест на наявність циркулюючих мікрофілярій.

У кішок, які мають амікрофіляремію або негативний результат визначення антигену, проте мають клінічну картину, подібну до дирофіляріозу, визначення антитіл є альтернативою для виявлення інвазії.

4.4.2. Тест Knott'a

Цей метод концентрує всі мікрофілярії, присутні в 1 мл крові з EDTA, шляхом центрифугування. Потім їх фарбують метиленовим синім.

Коротко, 1 мл крові з EDTA розводять у 9 мл 2% формаліну і розчин перемішують протягом кількох хвилин. Потім його центрифугують при 390 x *g* протягом 5 хвилин. Для морфометричних аналізів супернатант видаляють і до осаду додають одну краплю 1% метиленового синього або перевіряють на активність кислої фосфатази, хоча загальноприйнятою процедурою ідентифікації мікрофілярій є біомолекулярна (див. 4.4.1.). Дослідження на наявність личинок проводять на предметних скельцях при 40-кратному збільшенні і за морфологічними ознаками при 100-кратному збільшенні. Для максимальної чутливості слід аналізувати весь осад.

4.4.3. Модифікований тест Knott'a

Крім того, живі мікрофілярії можна виявити швидше за їх рухом, якщо використовується модифікований тест Knott'a. Для цього до 1 мл крові з ЕДТА додають чотири краплі 2% розчину сапоніну і 5 мл дистильованої води для руйнування еритроцитів. Суспензію можна досліджувати під мікроскопом, як зазначено вище. Живі личинки рухливі, їх легко виявити під мікроскопом (40-кратне збільшення).

4.4.4. Метод фільтрації (Difil -Test®)

Цей комерційний набір концентрує мікрофілярії з 1 мл крові з EDTA на фільтрі, який має площу розміром приблизно з невелике покривне скло. За допомогою цієї техніки мікрофілярії схильні випрямлятись, а не мати згорнуту або хвилясту форму.

У набір входить лізуючий розчин, барвник, фільтри та картридж. Коротко процедура така:

- Фільтр встановлюється на дно фільтраційного картриджа і картридж збирається.
- 1 мл крові додають до 9 мл лізуючого розчину у великому шприці та змішують. Розчин гемолізованої крові пропускають через фільтр, приєднавши його до порту на фільтраційному картриджі.
- Фільтр промивається шляхом пропускання рівного об'єму води через отвір на фільтраційному картриджі.
- Фільтраційний картридж відкривають, фільтр виймають і кладуть на предметне скло мікроскопа.
- На фільтр капають краплю барвника, що входить в комплект.
- Поверх фільтра кладуть покривне скло, щоб рівномірно розподілити барвник, і препарат готовий до перегляду.

4.4.5. Фарбування кислою фосфатазою

Є кілька відмінних ознак, за якими можна диференціювати мікрофілярії *D. immitis* від *D. repens* (та від апатогенних філяроїдних нематод). Це особливо важливо в регіонах, де обидва *D. immitis* і *D. repens* присутні (див. Рекомендації ESCCAP 5: Контроль трансмісивних хвороб собак і котів).

Мікрофілярії різних філяроїдних нематод можна розрізнити за їх фарбуванням кислою фосфатазою (див. таблицю 6):

- *D. immitis* мікрофілярії відрізняються двома отворами (вивідна і анальна пори);
- *D. repens* microfilaria має лише один отвір (анальна пора);
- *Acanthocheilonema dracunculoides* мікрофілярія демонструє три зони ферментативної активності (анальна пора, внутрішнє тіло, екскреторна пора); і
- *A. reconditum* мікрофілярія має дифузний світло-червоний рисунок.

Доступні комерційні набори, які можна проводити в лабораторії. Однак методи фарбування поступово витісняються виділенням ДНК з концентрованих мікрофілярій.

4.4.6. Вимірювання мікрофілярій

Крім цього, вимірювання мікрофілярій може допомогти їх диференціювати: для цього середня довжина повинна базуватися на розмірі 10 личинок (див. також Рекомендацію 5 ESCCAP: Контроль трансмісивних хвороб собак і котів). Слід зазначити, що препарування (особливо техніка фіксації) може значно змінити довжину та особливості мікрофілярій.

Таблиця 6: Морфологічна диференціація мікрофілярій[1] за довжиною, шириною та формою

види	Довжина (мкм)	Ширина (мкм)	Особливості
Dirofilaria immitis	301,77 ± 6,29 290–330	5–7	Чохлик відсутній, головний кінець загострений, хвіст прямий із загостреним кінцем. APh -S: дві точки активності, розташовані навколо анальної та екскреторної пор.
D. repens	369,44 ± 10,76 300–370	6–8	Без чохлика, головний кінець тупий, хвіст гострий і ниткоподібний, часто закінчується як ручка парасольки. APh -S: одна пляма навколо анальної пори.
Acanthocheilonema reconditum	264,83 ± 5,47 260–283	4	Без чохлика, головний кінець тупий з виступаючим головним гачком, хвостовий кінець зігнутий і закручений. APh -S: активність у всьому тілі.
A. dracunculoides	259,43 ± 6,69 190–247	4–6,5	Чохлик, головний кінець тупий, хвостовий кінець гострий і розширений. APh -S: три точки, які включають додаткову точку в середині тіла.

[1] Мікрофілярії (n=10), виміряні після концентрації за допомогою тесту Knott'a; при використанні тесту Difil® довжина коротша. APh -S: фарбування кислою фосфатазою.

4.5. Біомолекулярні методи виявлення та диференціювання: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та петлева ізотермічна ампліфікація (LAMP)

4.5.1. Загальна інформація

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) стає все більш популярним і потужним лабораторним методом діагностики багатьох захворювань. Він є специфічним і, залежно від досліджуваного субстрату та стадії інфекції, він також є високочутливим і може допомогти практикуючому лікарю в діагностиці активних інфекцій, коли є підозрілі клінічні ознаки. Він показаний для трансмісійних патогенів і паразитів, які потребують чутливого виявлення та/або диференціації тоді, коли морфологія безсила.

Якщо ПЛР використовується для діагностики, а не для диференціації, чутливість, серед інших факторів, залежатиме від кількості копій цільового гена.

ПЛР проводиться тільки в спеціалізованих лабораторіях. Таким чином, точні результати залежать від правильного збору, збереження та розміщення зразків. Використання двох різних протоколів ПЛР може підвищити чутливість і специфічність.

Загальна інструкція включає:

- Оскільки ПЛР дуже чутлива, слід уникати перехресного перезараження зразків. За можливості, зразки необхідно відбирати та зберігати в одноразовому обладнанні.
- Зразки слід зберігати в холодильнику (4°C) і розміщувати з пакетами з льодом або постійно заморожувати при -20°C або нижче.
- Зразки повинні надійти в лабораторію не пізніше ніж через 3 дні після збору.

Петлева ізотермічна ампліфікація (LAMP) — метод ампліфікації ДНК в одній пробірці. Завдяки своїй простоті та низькій вартості LAMP вже використовується клініцистами для виявлення певних патогенів як простий скринінговий аналіз у польових умовах або на місці надання медичної допомоги. Реагенти/набори є комерційно доступними від деяких компаній. На відміну від технології ПЛР, у якій реакція здійснюється з серією змінних температурних етапів або циклів, ізотермічна ампліфікація здійснюється при постійній температурі і не потребує термоциклера. Було виявлено, що LAMP є більш стійким, ніж ПЛР, до інгібіторів у складних зразках, таких як кров або фекалії, можливо, через використання іншої ДНК-полімерази (зазвичай Bst – *Bacillus stearothermophilus* – ДНК-полімерази, а не Taq-полімерази, як у ПЛР).

Екстракція ДНК може бути проведена практично на будь-якому субстраті, але найчастіше аналізуються зразки крові та аспіратів тканин.

Кров:
Декілька трансмісивних патогенів, таких як *Ehrlichia, Anaplasma, Bartonella* та *Babesia*, можна діагностувати шляхом ідентифікації їх ДНК у периферичній крові. ПЛР також використовувався для виявлення та диференціації видів філяроїд, які виділяють мікрофілярії в кров.

Існує багато протоколів ПЛР крові, і в кожній лабораторії є свій, у тому числі найкращий антикоагулянт. Більшість віддає перевагу EDTA, але найкраще перевірити в обраній лабораторії. Зазвичай достатньо 0,5–1 мл крові.

Аспірати тканин:
Leishmania infantum і *Ehrlichia* spp. присутні в лімфоїдних органах, а тонкоголкові аспірати можна використовувати для ПЛР-тестування. Біопсії шкіри також можна взяти для ПЛР на лейшманію. Після аспірації аспірат можна розбризкувати на фільтрувальний папір або ватний тампон, який потім можна зберігати в стерильній пробірці при 4°C. Було показано, що нанесення матеріалу на предметне скло має меншу чутливість.

Паразити:
Можуть бути випадки, коли необхідна молекулярна ідентифікація окремих паразитів (гельмінти, членистоногі). Їх слід зберігати в 70% етанолі та відправляти в герметичних контейнерах.

Фекалії:
Зразки фекалій також безпосередньо використовуються для виявлення ДНК-паразитарних стадій. Наприклад, виявлення *Tritrichomonas foetus* у фекаліях котів насправді рекомендовано замість культивації фекальних проб (див. 1.2.13.). В даний час копро-ПЛР використовується для *E. multilocularis*, різних кокцидій (зокрема *Toxoplasma*/*Hammondia*), *Cryptosporidium* і *Giardia*.

Для паразитів, які потребують диференціації видів або генотипів, що не може бути досягнуто морфологічними методами, наприклад, для *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., ооцист *Toxoplasma* / *Hammondia* яєць аскарид або теніід, генотипування (на фекаліях або ізольованих паразитах) може бути корисним для визначення зоонозних видів або генотипів тощо. У певних випадках з невеликою кількістю паразитарних стадій або коли ізоляція ДНК є складним (наприклад, для яєць теніід або аскарид, див. нижче), паразитарні стадії в ідеалі повинні бути попередньо сконцентровані. Як приклад можна застосувати метод флотації та послідовного промивання (див. нижче).

Флотація та послідовне промивання:
Яйця гельмінтів можна зібрати зі зразків фекалій комбінованою флотацією в розчині хлориду цинку з наступним послідовним промиванням з використанням сит зі зменшенням розмірів вічок (21–200 мкм). Таким чином, використовуючи відповідний розмір отворів останнього сита, яйця (зокрема, яйця теніід і токсокар для диференціювання) можна сконцентрувати, що дозволяє, наприклад, ізолювати ДНК.

4.5.2. Спеціальна інформація

Загалом, всі відповідні паразити можуть бути виявлені або підтверджені ПЛР або іншими генетичними методами. Кілька установок, які пропонують одночасне автоматичне виявлення інфекційних агентів, уже є на ринку, але поки не перевірені у ветеринарії.

У літературі, залежно від паразита, можуть бути доступні такі варіанти:

- специфічні праймери для окремих видів паразитів, що відтворюють лише певний рід та/або вид;
- мультиплексна ПЛР поєднує різні (специфічні) праймери;
- традиційна ПЛР проти ПЛР у реальному часі; і
- LAMP.

Коли продукт ПЛР отримано, продукт можна ідентифікувати на основі його розміру за допомогою гель-електрофорезу (з або без попередньої фрагментації рестриктазами) або шляхом секвенування нуклеотидних послідовностей і порівняння їх із доступними генними послідовностями.

Інтерпретація:
Усі результати ПЛР слід інтерпретувати як частину комбінації клінічних критеріїв та інших діагностичних тестів.

Деякі приклади, без претензій на повноту:

Найпростіші

Leishmania infantum

ПЛР можна використовувати як для діагностики інфекції, так і для моніторингу собак, які проходять лікування лейшманіозу собак. Кілька лабораторій також пропонують кількісну ПЛР (у реальному часі тощо), яка може вказати кількість паразитів і збільшення/зменшення наявної кількості паразитів. Вони також корисні для моніторингу відповіді на лікування.

Незважаючи на те, що аспірати тканин (лімфатичні вузли, селезінка, кістковий мозок) або зразки шкіри (у разі ураження шкіри) є зразками вибору для *L. infantum*, лабораторії також здійснюють аналізи крові. Існують певні занепокоєння щодо хибних негативних результатів (немає лейкоцитів у крові, які містять паразита) через низьку чутливість, хоча чутливість ПЛР у реальному часі, націленої на багатокопійні гени, здається задовільною. Тепер також рекомендуються неінвазивні зразки, такі як мазки з кон'юнктиви. Для цього слід взяти пробу з обох очей, а мазки повинні містити достатню кількість клітин.

Babesia

Чутливість ПЛР виявилася вищою, ніж дослідження мазка крові, особливо для діагностики хронічно інфікованих собак. Однак неможливо повністю виключити хибні негативні результати. Ідентифікація видів і підвидів може бути важливою з точки зору варіантів лікування (велика/мала *Babesia*) і прогнозу.

Toxoplasma gondii

Ооцисти *Toxoplasma gondii*, виділені котами, морфологічно ледь можна відрізнити від апатогенних *Hammondia hammondi* в ході планової діагностики. Разом із серологічними процедурами, що диференціюють специфічні антитіла в сироватках котів і проміжних хазяїв, ПЛР можна проводити з ооцист або для ідентифікації брадизоїтних цист *T. gondii* у м'ясі. У собак і/або кішок з неврологічними розладами, сумісними з токсоплазмозом, можна провести ПЛР зі спиномозкової рідини або водянистої рідіни камер ока.

Neospora caninum

Ооцисти *N. caninum* виділяються з фекаліями собак протягом дуже короткого періоду часу та в низькій щільності. Як і у випадку з *T. gondii*/*H. hammondi*, ооцисти *N. caninum* навряд чи можна відрізнити від *Hammondia heydorni* (що зустрічається у фекаліях собак або лисиць) під час рутинної діагностики та *T. gondii*/*H. hammondi* (при копрофагії котячих фекалій). Тому для їх ідентифікації показаний ПЛР-аналіз.

У собак з клінічною підозрою серологічний аналіз разом із біопсією м'язів, ліквору та/або спиномозкової рідини за допомогою ПЛР є діагностичними варіантами.

Лямблії

Класичні тести на інфекції, викликані лямбліями , зазвичай не є видоспецифічними. Якщо для уточнення зоонозного потенціалу необхідно визначити сукупний матеріал, можна виконати мультилокусну ПЛР і секвенування.

Tritrichomonas

ПЛР, що дозволяє відрізнити *T. fetus* у котячих фекаліях від інших трихомонад, усуває виявлення паразитів у культурі (InPouch™, див. 1.2.13.) та його недоліки (чутливість до температури, часу).

Бактерії, що передаються членистоногими переносниками

Бартонелла

Незважаючи на те, що золотим стандартом діагностики бартонельозу є посів крові, це може зайняти багато часу та грошей. Також можна виявити ДНК *Bartonella* у зразках крові, тканин, спиномозкової рідини або водянистої рідіни. Комбінація збагачування культури з подальшою ПЛР-ампліфікацією призводить до підвищення чутливості.

Ehrlichia/Anaplasma

Позитивний результат ПЛР, як правило, підтверджує наявність інфекції цими кліщовими бактеріями. Однак негативний результат ПЛР не виключає наявності інфекції.

Як і при цитології крові, чутливість ПЛР виявляється більшою для ерліхій при відборі аспіратів лімфатичних вузлів, селезінки, кісткового мозку або лейкоцитів.

Гельмінти

Яйця теніїд

В ендемічних районах по ехінококу щоб з'ясувати можливість передачі зоонозів, рекомендується диференціювати *Echinococcus* spp. від яєць інших теніїд. Яйця можна виділити за допомогою флотації, використання клейкої стрічки в періанальній області або шляхом флотації та послідовного промивання фекалій, дотримуючись правил біобезпеки (обладнання в спеціалізованих лабораторіях). ПЛР виконується зі специфічними праймерами, мультиплексною ПЛР, націленою на різні види теніїд, або широкою ПЛР гельмінтів з наступним секвенуванням.

Токсокара

Було показано, що приблизно одна третина собак позитивних на токсокару, виділяють яйця *Toxocara cati* (після копрофагії). Ці яйця можна диференціювати від яєць *T. canis* за допомогою вимірювань яєць або більш надійно за допомогою ПЛР.

Легеневі гельмінти

Aelurostrongylus abstrusus є найбільш поширеним котячим легеневим гельмінтом. У деяких країнах, однак, інші легеневі черви, такі як *Troglostrongylus* spp. і *Oslerus rostratus* можуть бути присутніми і потрібна експертиза для морфологічної диференціації L1. Крім цього, ПЛР можна провести з L1, виділених з фекалій, або шляхом аналізу трахеальних мазків або бронхоальвеолярного лаважу (нижча чутливість).

L1 найпоширеніших легеневих червів собак, *A. vasorum* і *C. vulpis* , можна легко диференціювати морфологічно. Однак в окремих випадках для підтвердження може бути корисно використовувати біомолекулярні методи.

Капілярія

Собаки, коти та інші ссавці можуть містити різні види *Capillaria*, які мають різні життєві цикли. Не всі таксономічно остаточно описані. ПЛР може допомогти під час визначення виду.

Філяріоїдні нематоди

Видоспецифічна (у режимі реального часу) ПЛР крові з ЕДТА є методом вибору для видової диференціації мікрофілярій (див. 4.4.1.), хоча морфологічний аналіз і фарбування кислою фосфатазою все ще можуть використовуватися.

Аберрантні (аномальні) гельмінти

Якщо аберантні гельмінти морфологічно нерозрізненні або їх необхідно виділити з гістологічно фіксованих зразків, можна провести ПЛР, а також з гістологічного фарбування або зішкрібів шкіри.

Членистоногі

У випадках, коли морфологія членистоногих не дозволяє їх ідентифікувати, можуть бути використані методи на основі ДНК.

Дерматофіти

Комерційно доступна панель включає *Microsporum* spp., *M. canis* і *Trichophyton* spp. ПЛР-тести в реальному часі з високою чутливістю та специфічністю. Зішкріб шкіри та/або волосся слід зібрати та відправити в лабораторію. Результати доступні через кілька днів.

4.6. ВИЯВЛЕННЯ ДЕРМАТОФІТІВ

4.6.1. Загальна інформація

Дерматофітоз діагностується за допомогою комбінації різних і комплементарних тестів, включаючи лампу Вуда (тільки для собак і котів) і безпосереднє обстеження для виявлення активної інфекції шерсті, мікологічний посів для ідентифікації наявних видів грибів і моніторинг відповіді на терапію, а іноді і біопсію шкіри при вузлових або атипових проявах. У Європі тепер можливе виявлення дерматофітів методом ПЛР (див. 4.5.2.) для собак і котів.

4.6.2. Безпосередній огляд волосків

Дерматофітози можна виявити при мікроскопічному дослідженні волосків. Однак техніка відбору проб і досвід експерта сильно впливають на чутливість цієї процедури. Крім того, незважаючи на оптимальний відбір зразків і дослідження, не можна виключити хибні негативні трихограми (див. 3.5.). Тому сенс має лише позитивна трихограма. Для кращого виявлення грибкових елементів можна використовувати гідроксид калію (КОН) або мінеральну олію з додаванням барвників або без них (наприклад, лактофеноловий синій). Волоски уражені грибами-дерматофітами, зазвичай мають вигляд збільшених і набряклих структур із шорсткою та нерівною поверхнею. Поверхня волосся зазвичай демонструє скупчення або ланцюжки грибкових спор (артроконідії) (2–4 мкм для *Microsporum canis*).

4.6.3. Обстеження за допомогою лампи Вуда

Огляд волосяного покриву ультрафіолетовою лампою (лампа Вуда) є хорошим методом скринінгу на дерматофітози у собак і кішок. Під дією світла волоски, уражені деякими видами дерматофітів, включаючи *M. canis*, світяться зеленим кольором. Волоски, інфіковані іншими видами дерматофітів, ніколи не флюоресціюють, а деякі місцеві препарати можуть маскувати флюоресценцію. Таким чином, негативні результати обстеження за допомогою лампи Вуда не виключають дерматофітозів. Спостереження флюоресценції має бути підтверджено мікроскопічним дослідженням волосків (незважаючи на те, що розпізнати заражене волосся не завжди легко і може потребувати досвідченого ока) (див. 4.6.2.).

4.6.4. Мікологічний посів

Мікологічний посів залишається найбільш надійним методом підтвердження дерматофітоз у собак і котів. Зразок можна взяти шляхом зішкрібання шкіри, вищипування волосків (під лампою Вуда) або чищення волосяного покриву стерильною зубною щіткою, невеликим шматком стерильного матеріалу або пиловловлюючої тканини. Деякі середовища (наприклад, декстрозний агар Сабуро) підходять для мікологічних культур. Колонія видів дерматофітів, таких як *M. canis* може розвинутися через кілька днів. Тестові середовища для дерматофітів (DTM) регулярно використовуються у ветеринарії. Однак було зроблено лише кілька спроб оцінити ефективність таких середовищ зі зразками, зібраними у тварин, і використання лише DTM без мікроскопічної ідентифікації макроконідій не рекомендується для діагностики дерматофітозів тварин. В ідеалі матеріал, зібраний у тварин, слід відправити до лабораторії, яка має досвід ветеринарної мікології. У лабораторії специфічна ідентифікація проводиться шляхом мікроскопічного дослідження грибкових колоній. Кількість колоній може допомогти відрізнити механічних носіїв від інфікованих тварин. Механічне носійство зумовлене забрудненням із/від навколишнього середовища та зазвичай пов'язане з обмеженою кількістю колоній дерматофітів у культурі. Інфекція призводить до масового утворення грибкових спор (артроконідій) і зазвичай пов'язана з дуже великою кількістю колоній дерматофітів у культурі.

ДОДАТОК 1 – ІНФОРМАЦІЯ

ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites –Європейська Наукова Рада з проблем паразитозів тварин-компаньйонів) - це незалежна неприбуткова громадська організація, яка розробляє керівні принципи, що базуються на сучасній науковій інформації та пропагує належну практику боротьби з паразитами та поводженням із тваринами-компаньйонами. Застосовуючи відповідні поради, ризик захворювань та передачі паразитів між тваринами та людьми можна звести до мінімуму. ESCCAP прагне побачити Європу, в якій паразити тварин-компаньйонів більше не загрожують здоров'ю та добробуту тварин та людей.

Європа характеризується значною різноманітністю ареалів поширення паразитів та їх різним значенням, тому в рекомендаціях ESCCAP узагальнюються та висвітлюються важливі відмінності, які притаманні різним частинам Європи, та, де необхідно, рекомендуються конкретні заходи боротьби.

ESCCAP вважає, що:

- Ветеринари та власники домашніх тварин повинні вживати заходів щодо захисту своїх улюбленців від паразитарних хвороб.
- Ветеринари та власники домашніх тварин повинні вживати заходів щодо захисту домашніх тварин від ризиків, пов'язаних з подорожами, і потенційними наслідками від змін місцевих епідеміологічних паразитологічних ситуацій внаслідок експорту чи імпорту неедемічних видів паразитів.
- Ветеринари, власники домашніх тварин та лікарі повинні працювати разом, щоб зменшити ризики, пов'язані із зоонозною передачею паразитарних захворювань.
- Ветеринари повинні мати можливість надавати рекомендації власникам домашніх тварин щодо ризиків зараження паразитами та спричинених ними захворювань та заходів, які можна вжити для мінімізації цих ризиків.
- Ветеринари повинні навчати власників домашніх тварин щодо паразитів, з метою посилити їх відповідальність не лише щодо здоров'я власного вихованця, а також здоров'я інших домашніх тварин та людей в найближчому оточенні.
- З метою надання оптимальної поради щодо контролю паразитозів та встановлення наявного зараження паразитами, ветеринари повинні застосовувати діагностичні тести.

Для досягнення цих цілей ESCCAP розробляє рекомендації в різних форматах:

- Детальні рекомендації для ветеринарних лікарів та ветеринарних паразитологів.
- Переклади, короткі описи, адаптації та узагальнені версії рекомендацій, які стосуються різних європейських країн та регіонів.

Версії рекомендацій ESCCAP можна знайти на веб сторінці www.esccap.org

Декларація про відповідальність:

Було докладено всіх зусиль для того, щоб інформація в рекомендаціях була вірогідною та заснованою на досвіді авторів. Однак автори та видавці не несуть відповідальність за будь-які наслідки, спричинені неправильним тлумаченням даної інформації. Також не передбачаються будь-які умови та гарантії. ESCCAP підкреслює, що національні, регіональні та місцеві нормативні акти мають пріоритетне значення, порівняно з наданими рекомендаціями ESCCAP.

ДОДАТОК 2 – СЛОВНИК, СКОРОЧЕННЯ ТА КОРИСНІ ПОСИЛАННЯ

СЛОВНИК

Чутливість	Частка справді позитивних зразків (визначена за допомогою тесту “Золотий стандарт”) або ймовірність виявлення зараженої тварини як позитивної за допомогою тесту.
Чутливість [%]	Кількість справді позитивних проб/(Кількість справді позитивних проб + Кількість хибних негативних проб)*100.
Специфічність	Частка справді негативних зразків (визначена за допомогою тесту “Золотий стандарт”) або ймовірність виявлення неінфікованої тварини як негативної за допомогою тесту.
Специфічність [%]	Кількість справді негативних зразків/(Кількість справді негативних зразків + Кількість хибних позитивних зразків)*100.
Прямі методи виявлення	Виявлення наявності самого патогена може здійснюватися шляхом візуалізації (наприклад, під мікроскопом), виявлення генетичного матеріалу (наприклад, за допомогою ПЛР або ЛАМП) або виявлення молекул, специфічних для даного паразита (наприклад, антигена, зазвичай складаються з різних варіацій білків).
Непрямі методи виявлення	Серологічні методи визначають попередній контакт з паразитами шляхом виявлення специфічних антитіл, які виникають внаслідок інфекції. Оскільки антитіла зазвичай утворюються після початкової інфекції та перебувають після знищення паразитів, вони не обов’язково вказують на наявність активної інфекції. Виявлення антитіл може здійснюватися в різних форматах, наприклад, за допомогою вестерн блот-аналізу, прямих або непрямих імунофлюоресцентних тестів, ELISA, тестів бічного потоку (LPT) та інших. Виявлення здійснюється за допомогою маркованих вторинних антитіл. Багато, але не всі, з цих тестів дозволяють кількісне визначення рівня антитіл (титрів), наприклад, для досліджень під час перебігу інфекції або лікування.

СКОРОЧЕННЯ

МЕС	Моноцитарний ерліхіоз собак
DFA	Прямий імунофлюоресцентний аналіз
DTM	Дерматофітне тест-середовище
ІФА	Імуноферментний аналіз
ELISA	Ферментний імуносорбентний аналіз
EPG	Кількість яєць в грамі фекалій
FECRT	Тест зменшення кількості яєць у фекаліях
ICT	Імунохроматографічна тест-смужка
IFAT	Непрямий імунофлюоресцентний тест на антитіла
КОН	Розчин гідроксиду калію
L1	Личинки першої стадії
L3	Личинки третьої стадії
LAMP	Петлева ізотермічна ампліфікація
LPG	Кількість личинок в грамі
MIFC	Концентрація мертіолат-йод-формальдегіду
OPG	Кількість ооцист в грамі
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція
SAF	Формалін-ацетат-натрію і оцтової кислоти
SAFC	Концентрація формалін--ацетат натрію і оцтової кислоти

КОРИСНІ ПОСИЛАННЯ

Як вимірювати за допомогою мікроскопа:
www.youtube.com/watch?v=_CkcYrns-6I
www.youtube.com/watch?v=_eu9OrNM_wY
www.youtube.com/watch?v=GdRLPAo_j1Y
parasitology.cvm.ncsu.edu/vmp930/m_keys.html

Модифікована методика підрахунку яєць McMaster:
youtu.be/rkSGe-L4Sec

Зображення стадій паразитів можна знайти на наступних сторінках:
www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html
www.ksvdl.org/resources/news/diagnostic_insights_for_technicians/august2019/common-intestinal-parasites-pt1.html
www.ncvetp.org/parasite-image-database.html
quizlet.com/64375340/parasites-in-veterinary-medicine-flash-cards/

ESCCAP
EUROPEAN SCIENTIFIC COUNSEL COMPANION ANIMAL PARASITES®

ISBN: 978-1-913757-55-7

ESCCAP Secretariat
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern
Worcestershire, WR14 3SZ, United Kingdom

0044 (0) 1684 585135
info@esccap.org
www.esccap.org
www.esccap.org.ua

Elanco
IDEXX
MSD Animal Health
vetoquinol ACHIEVE MORE TOGETHER
zoetis
Boehringer Ingelheim

4 Паразитологічна діагностика кішок, собак і коней

ESCCAP Рекомендації 04 Перше Видання – листопад 2022