

УДК 619:576.89; 576.895.132; 619:616-07

DOI: 10.31016/1998-8435-2020-14-2-120-124

Методические рекомендации по сбору и фиксации нематод пищеварительного тракта жвачных

Дмитрий Николаевич Кузнецов

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук», 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28, e-mail: arsphoeb@mail.ru

(Рассмотрены и одобрены Научно-методической комиссией ВНИИП – филиала ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН»)

Поступила в редакцию: 29.01.2020; принята в печать: 06.04.2020

Аннотация

Цель исследований – повышение точности получаемых данных при исследованиях нематод, паразитирующих в пищеварительном тракте жвачных животных.

Материалы и методы. Проанализированы данные литературы и результаты собственных научно-исследовательских работ, затрагивающие вопросы сбора и фиксации нематод, паразитирующих в различных участках пищеварительного тракта у домашних и диких жвачных. Учтена возможность использования собранных образцов нематод как в морфологических, так и в молекулярных исследованиях.

Результаты и обсуждение. Подробно описаны методы сбора и фиксации нематод пищеварительного тракта жвачных. Рассмотрены особенности сбора нематод, паразитирующих в различных участках пищеварительного тракта. Предложены методы, минимизирующие потери образцов нематод при проведении гельминтологического вскрытия. В качестве фиксирующей жидкости рекомендуется применение 96%-ного этанола, что позволяет использовать образцы нематод для ДНК-исследований.

Ключевые слова: паразитические нематоды; пищеварительный тракт; жвачные животные; гельминтологическое вскрытие.

Для цитирования: Кузнецов Д. Н. Методические рекомендации по сбору и фиксации нематод пищеварительного тракта жвачных // Российский паразитологический журнал. 2020. Т. 14. № 2. С. 120–124.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2020-14-2-120-124>

© Кузнецов Д. Н., 2020

Methodical Recommendations for Sampling and Preserving of Gastrointestinal Nematodes of Ruminants

Dmitry N. Kuznetsov

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants – a branch of Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences", 28, B. Cheremushkinskaya st., Moscow, Russia, 117218, e-mail: arsphoeb@mail.ru

Received on: 29.01.2020; accepted for printing on: 06.04.2020

Abstract

The purpose of the research is improving the accuracy of studies of nematodes parasitizing in the digestive tract of ruminants.

Materials and methods. The literature data and own research results concerning sampling and preserving of nematodes parasitizing various parts of gastrointestinal tract of domestic and wild ruminants have been analyzed. The possibility of using the samples of nematodes, both in morphological and molecular studies, has been taken into account.

Results and discussion. The methods for sampling and preserving of gastrointestinal nematodes of ruminants are described in detail. The features of sampling nematodes parasitizing in various parts of the digestive tract are considered. The ways for minimizing of losses of nematode samples during helminthological necropsy are proposed. Using of 96% ethanol as a preserving liquid is recommended and allows the DNA study of samples.

Keywords: parasitic nematodes; digestive tract; ruminants; helminthological necropsy.

For citation: Kuznetsov D. N. Methodical Recommendations for Sampling and Preserving of Gastrointestinal Nematodes of Ruminants. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2020; 14 (2): 120–124.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2020-14-2-120-124>

Среди гельминтов жвачных животных представители типа *Nematoda Rudolphi*, 1808 характеризуются самым большим таксономическим разнообразием и шириной распространения [9, 10, 13]. Инвазия этими паразитами может приводить к снижению иммунитета, гибели молодняка, падению продуктивности у домашних жвачных и ухудшению трофейных качеств у диких [1, 2, 6, 11]. Некоторые виды нематод, паразитирующие у жвачных, опасны и для человека [5, 8, 12].

Методы прижизненной диагностики гельминтозов (копроовоскопия, копроларвоскопия) в большинстве случаев не позволяют точно определить видовой состав нематод, паразитирующих у жвачных. Посмертная диагностика (гельминтологическое вскрытие) дает такую возможность, однако, применяемые в настоящее время способы сбора и фиксации нематод, имеют недостатки. При посмертных гельминтологических исследованиях отечественные специалисты обычно придерживаются рекомендаций, сформулированных в 1928 г. К. И. Скрябиным [7], и позднее дополненных другими авторами [3, 4]. Однако, процедура исследования пищеварительного тракта жвачных изложена в этих работах недостаточно подробно, что может приводить к потере значительного числа образцов нематод и снижению точности получаемых данных. Жидкости на основе формалина, широко используемые для фиксации

гельминтов, делают образцы нематод непригодными для исследований современными методами молекулярной диагностики.

Предлагаемая методика повышает точность данных, получаемых при исследовании нематодофауны жвачных, и позволяет использовать образцы нематод для ДНК-исследований.

Общие указания

При проведении вскрытия животного необходимо изолировать исследуемый участок пищеварительного тракта от соседних с помощью двойных лигатур. Это поможет избежать потери или случайного попадания паразитов из одного органа в другой. После этого нужный для исследования участок пищеварительного тракта отделяют, отрезая между лигатурами.

Следует воздерживаться от сбора нематод сразу после убоя, так как при температуре, близкой к физиологической температуре тела животного, значительное число нематод тем или иным образом прикреплены к слизистой оболочке пищеварительного тракта и сохраняют жизнеспособность. В этом случае попытки извлечения мелких нематод из слизистой оболочки, как правило, приводят к их разрушению. Рекомендуется охладить исследуемые участки пищеварительного тракта, поместив их в холодную воду или в холодильник (при температуре 4°C) на 2–3 ч, что облегчает сбор нематод.

После вскрытия исследуемого участка пищеварительного тракта его содержимое многократно промывают чистой водой, сливают надосадочную жидкость, а затем фиксируют осадок 96%-ным этанолом в соотношении 1 часть осадка к 2 частям этанола. В таком состоянии, герметично укупороженный, осадок может сохраняться неограниченное время. Нематоды, паразитирующие в рубце, сетке и книжке, как правило, локализуются на внутренней поверхности стенок этих органов. Кроме того, из-за большого объема рубца полное исследование его содержимого является практически невыполнимой задачей. Таким образом, при исследовании рубца, сетки и книжки можно ограничиться визуальным осмотром внутренней поверхности этих органов. Нематод, обнаруженных и извлеченных при визуальном осмотре исследуемых органов, также фиксируют 96%-ным этанолом.

После завершения исследования участка пищеварительного тракта емкости, в которых проводили промывание, тщательно ополаскивают водой, чтобы исключить контаминацию следующих исследуемых образцов.

На сосуд с зафиксированным осадком помещают этикетку с указанием вида, пола и возраста животного, исследованного органа, названия местности, где собран материал (или откуда прибыло животное), фамилии специалиста, проводившего вскрытие, даты вскрытия. Таким же образом этикетируют емкости с нематодами, обнаруженными при визуальном осмотре исследуемых органов.

В дальнейшем, собранный и зафиксированный осадок исследуют под бинокулярной лупой при 10–30-кратном увеличении. Для этого порции осадка по 1–2 мл помещают в чашку Петри, доливают 2–5 мл чистой воды, перемешивают до равномерного распределения частиц осадка. Обнаруженных нематод извлекают препаровальной иглой, помещают в емкости с 96%-ным этанолом, этикетируют. На этом этапе исследования целесообразно помещать в отдельные емкости самцов и самок нематод, а также крупные экземпляры нематод.

Исследование пищевода

Под слизистой оболочкой пищевода жвачных могут быть обнаружены нематоды рода *Gongylonema*. Эти сравнительно крупные нематоды (длиной 5–15 см, шириной 0,2–0,4 мм),

располагаясь под слизистой оболочкой пищевода, образуют выпуклые извилистые линии. Для обнаружения гонгилоном пищевод следует отделить от других участков пищеварительного тракта, разрезать вдоль по всей длине и подвергнуть визуальному осмотру. При обнаружении гонгилоном следует аккуратно (при помощи иглы для инъекций) надорвать слизистую оболочку в местах их локализации. После этого, смачивая струей воды из шприца, осторожно извлечь гонгилоном при помощи пинцета.

Исследование рубца

При исследовании рубца могут быть обнаружены нематоды рода *Rygarginema* белого или красновато-белого цвета длиной около 2 см. Для сбора этих нематод из рубца необходимо слить его содержимое через надрез размером 5–10 см, проводя визуальный осмотр вытекающего содержимого на наличие нематод. Затем разрезать рубец по всей длине, провести визуальный осмотр слизистой оболочки и собрать обнаруженных нематод.

Исследование сетки и книжки

В сетке и книжке также, как и в рубце, могут быть обнаружены нематоды рода *Rygarginema*. Сетку и книжку допускается исследовать вместе, без отделения друг от друга. Необходимо разрезать стенку этих органов, вывернуть их, извлечь содержимое и провести визуальный осмотр внутренней поверхности на наличие нематод.

Исследование сычуга

Сычуг – последняя из четырех камер многокамерного желудка жвачных, переходит в тонкий кишечник. Перед сычугом находится книжка (округлой формы, на разрезе видны складки). Сычуг имеет продолговатую форму, у мелких жвачных его объем около 200–500 мл, у крупных – 1–5 л.

При помощи ножниц сычуг вскрывают по малой кривизне, выворачивают, помещают содержимое в ведро, затем туда же смывают остатки содержимого со стенок сычуга. Доливают водой в соотношении 1 часть содержимого к 2–5 частям воды, перемешивают, отстаивают 10–15 мин, затем сливают надосадочную жидкость и снова доливают чистой водой в том же соотношении. Промывание

повторяют несколько раз – до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Как правило, необходимо сделать 5–10 повторов. Промытый осадок заливают 96%-ным этанолом и перемешивают.

Кроме того, проводят визуальный осмотр внутренней поверхности сычуга – в толще слизистой оболочки могут находиться нитевидные нематоды красного цвета длиной около 0,5–1,5 см. Обнаруженных нематод извлекают при помощи препаровальной иглы, смачивая струей воды из шприца.

Исследование тонкого кишечника

Длина тонкого кишечника у жвачных в 20–30 раз больше длины их тела и составляет примерно 10–30 м; он состоит из двенадцатиперстной кишки (начинается сразу от сычуга, образует петлю, в которой лежит поджелудочная железа), тощей кишки (самая длинная часть тонкого кишечника, образует завитки) и подвздошной кишки (не имеет завитков). Эти участки тонкого кишечника целесообразно исследовать по отдельности: наложить двойные лигатуры и отрезать участки друг от друга. Затем каждый участок следует поместить в кювету, разрезать вдоль по всей длине, чистой водой смыть содержимое со стенок кишечника, перелить в цилиндрический сосуд, долить воды в соотношении 1 часть осадка к 2–5 частям воды, отстоять 10–15 мин. Затем слить надосадочную жидкость и снова добавить воды. Промывание повторить 5–10 раз, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Промытый осадок залить 96%-ным этанолом и перемешать.

Кроме того, провести визуальный осмотр внутренней поверхности кишечника, извлечь и зафиксировать обнаруженных гельминтов.

Исследование толстого кишечника

Толстый кишечник подразделяется на слепую, ободочную и прямую кишку. Тощей кишкой (подвздошная кишка) входит в ventральную стенку слепой кишки на границе с ободочной. Вокруг отверстия подвздошной кишки имеется сфинктер. У жвачных диаметр толстого кишечника в несколько раз превышает диаметр тонкого. При исследовании целесообразно разделить толстый кишечник на две части: слепую кишку и ободочную кишку вместе с прямой. На границах этих участков следует наложить двойные лигатуры и отре-

зать эти участки друг от друга. Затем исследуемый участок толстого кишечника поместить в кювету, разрезать вдоль по всей длине, смыть содержимое в подходящую емкость и многократно промыть его чистой водой. Ввиду большого объема содержимого толстого кишечника полностью зафиксировать промытый осадок может оказаться затруднительным. Поэтому целесообразно выбрать нематод до фиксации. Для этого отмытый осадок порциями разбавляется водой и просматривается в кювете с темным дном. Обнаруженных нематод помещают в 96%-ный этанол. При невозможности провести выборку гельминтов в полевых условиях, можно зафиксировать часть осадка, указав в этикетке, какая доля содержимого была взята. Некоторые нематоды толстого кишечника остаются прикрепленными к стенке кишки или находятся в ее толще. Так, у жвачных могут быть обнаружены нематоды рода *Trichuris* (власоглавы) длиной до 8 см, внедренные тонким концом глубоко в стенку кишечника. Также могут присутствовать нематоды рода *Oesophagostomum*: личиночные стадии – под слизистой оболочкой кишечника, в паразитарных узелках диаметром до 1,5 см, половозрелые – длиной до 2 см в просвете кишечника. Для извлечения нематод из стенки толстого кишечника следует вырезать участок стенки кишечника вместе с внедрившимся в него власоглавом или с узелком, содержащим личинку эзофагостома. Далее, под бинокулярной лупой, осторожно освободить трихоцефал от тканей кишечника, извлечь личинок эзофагостом из паразитарных узелков.

Литература

1. Акбаев М. Ш., Водянов А. А., Косминков Н. Е., Ятусевич А. И., Пашкин П. И., Василевич Ф. И. Паразитология и инвазионные болезни животных. М.: Колос, 1998. 743 с.
2. Говорка Я., Маклакова Л. П., Митух Я., Пельгунов А. Н., Рыковский А. С., Семенова М. К., Сонин М. Д., Эрхардова-Котрла Б., Юрашек В. Гельминты диких копытных Восточной Европы. М.: Наука, 1988. 208 с.
3. Ивашкин В. М., Контримавичус В. Н., Назарова Н. С. Методы сбора и изучения гельминтов наземных млекопитающих. М.: Наука, 1971. 124 с.
4. Котельников Г. А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды. М.: Колос, 1984. 208 с.

5. Кузнецов Д. Н., Данзан Г., Батчимег М., Пунсалпаамуу Г. Нематоды жвачных Монголии – возбудители гельминтозоонозов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2010. № 3. С. 38–39.
6. Прядко Э. И. Гельминты оленей. Алма-Ата: Изд-во «Наука» КазССР, 1976. 224 с.
7. Скрябин К. И. Метод полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая и человека. М.: Изд-во МГУ, 1928. 45 с.
8. Скрябин К. И., Шихобалова Н. П., Шульц Р. С. Трихостронгилиды животных и человека. Основы нематодологии. М.: Изд-во АН СССР, 1954. Т. 3. 684 с.
9. Скрябин К. И., Петров А. М. Основы ветеринарной нематодологии. М.: Колос, 1964. 527 с.
10. Hodda M. Phylum Nematoda. *Zootaxa*. 2007; 1668. 265–293.
11. Irvine R. J., Corbishley H., Pilkington J. G., Albon S. D. Low-level parasitic worm burdens may reduce body condition in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). *Parasitology*. 2006; 133. 465–475.
12. Mizani A., Gill P., Daryani A., Sarvi S., Amouei A., Katrimi A. B., Soleymani E., Mirshafiee S., Gholami S., Hosseini S. A., Gholami S., Rahimi M. T., Hashemi-Soteh M. B., Sharif M. A multiplex restriction enzyme-PCR for unequivocal identification and differentiation of *Trichostrongylus* species in human samples. *Acta tropica*. 2017; 173. 180–184.
13. Olsen O. W. *Animal Parasites*. New York: Dover Publications, 1974. 497–502.
- of wild ungulates in Eastern Europe. Moscow, 1988; 208 (In Russ.)
3. Ivashkin V. M., Kontrimavicius V. N., Nazarova N. S. Methods of collection and study of helminthes of terrestrial mammals. Moscow, 1971; 124. (In Russ.)
4. Kotelnikov G. A. Helminthological studies of animals and the environment. Moscow, 1984; 208. (In Russ.)
5. Kuznetsov D. N., Danzan G., Batchimeg M., Punsalpaamuu G. Ruminant nematodes in Mongolia are causative agents of helminthoosonoses. *Meditisinskaia Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 2010; 3: 38–39. (In Russ.)
6. Pryadko E. I. Helminths of deer. Alma-Ata, 1976; 224. (In Russ.)
7. Skryabin K. I. The method of complete helminthological dissections of vertebrates, including humans. Moscow, 1928; 45. (In Russ.)
8. Skryabin K. I., Shikhobalova N. P., Shults R. S. Essentials of nematodology III. Trichostrongylids of animals and man. Moscow, 1954; 684. (In Russ.)
9. Skryabin K. I., Petrov A. M. Essentials of veterinary nematodology. Moscow, 1964; 527. (In Russ.)
10. Hodda M. Phylum Nematoda. *Zootaxa*. 2007; 1668. 265–293.
11. Irvine R. J., Corbishley H., Pilkington J. G., Albon S. D. Low-level parasitic worm burdens may reduce body condition in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). *Parasitology*. 2006; 133. 465–475.
12. Mizani A., Gill P., Daryani A., Sarvi S., Amouei A., Katrimi A. B., Soleymani E., Mirshafiee S., Gholami S., Hosseini S. A., Gholami S., Rahimi M. T., Hashemi-Soteh M. B., Sharif M. A multiplex restriction enzyme-PCR for unequivocal identification and differentiation of *Trichostrongylus* species in human samples. *Acta tropica*. 2017; 173. 180–184.
13. Olsen O. W. *Animal Parasites*. New York: Dover Publications, 1974. 497–502.

References

1. Akbaev M. Sh., Vodyanov A. A., Kosminkov N. E., Yatusevitch A. I., Pashkin P. I., Vasylevitch F. I. *Parasitology and invasive diseases of animals*. Moscow, 1998; 744. (In Russ.)
2. Govorka Ya., Maklakova L. P., Mitukh Ya., Pelgunov A. N., Rykovskiy A. S., Semenova M. K., Sonin M. D., Erkhardova-Kotrla B., Yurashek V. Helminths