

Обзорная статья

УДК 619:576.89

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-3-365-377>

Методы копрологической диагностики паразитозов животных

Ольга Александровна Панова¹, Ольга Петровна Курносова²,
Александр Валерьевич Хрусталеv³, Михаил Владимирович Арисов⁴

¹⁻⁴Всероссийский 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» (ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия

¹panova@vniigis.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9254-0167>

²kurnosova@vniigis.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3248-8931>

³hrustalev@vniigis.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4526-8719>

⁴arisov@vniigis.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2103-8468>

Аннотация

Цель исследований – провести обзор методов копрологической диагностики с учетом современных рекомендаций и предложений.

Материалы и методы. Изучены современные литературные источники по вопросам копрологических методов диагностики паразитозов.

Результаты и обсуждение. Прижизненная диагностика является важным элементом практической ветеринарной деятельности, успешность которой во многом зависит от правильного выбора и грамотного применения подходящих лабораторных методов. Для диагностики паразитарных болезней чаще всего используют исследование фекалий. Копрологические методы отличаются высокой информативностью благодаря тому, что они позволяют обнаружить не только паразитов пищеварительного тракта, печени, поджелудочной железы, но и целый ряд гельминтов дыхательной системы и даже некоторых тканевых паразитов, выделяющих яйца или личинки с фекалиями. В отличие от существующих косвенных иммунологических и молекулярно-генетических методов классические методы исследований основываются на обнаружении и идентификации непосредственно самих возбудителей на разных стадиях развития. При этом у исследователя появляется возможность изучения морфологических признаков и проведения морфометрического анализа. Широкое применение классических копрологических методов связано также с их доступностью, они достаточно просты в исполнении и сравнительно недороги. Ограничением копрологических методов является невозможность диагностировать возбудителей, находящихся на непропагативной стадии. На эффективность диагностики влияют способ сбора проб, сроки и условия транспортировки, выбор адекватного метода исследования образцов. В статье приведены правила отбора проб и варианты применения фиксаторов, дана классификация копрологических методов, описан порядок выполнения исследований. Отдельное внимание уделено выбору флотационных растворов, методу культивирования личинок стронгилид и методу споруляции ооцист кокцидий. Обращается внимание на важность микрометрических измерений обнаруживаемых объектов. Для обеспечения качества проводимых копрологических исследований необходим внутрилабораторный контроль этапов исследований, технического состояния оборудования и обучение персонала. Материал, изложенный в статье, предназначен как для обучающихся, так и практикующих специалистов.

Ключевые слова: копрологическая диагностика, фекалии, методы, паразиты, гельминты, простейшие

Благодарность. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.), составляющей основу государственного задания № FGUG2022-0012.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.



Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
The content is available under Creative Commons Attribution 4.0 License.

Конфликт интересов отсутствует.

Для цитирования: Панова О. А., Курносова О. П., Хрусталева А. В., Арисов М. В. Методы копрологической диагностики паразитозов животных // Российский паразитологический журнал. 2023. Т. 17. № 3. С. 365–377.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-3-365-377>

© Панова О. А., Курносова О. П., Хрусталева А. В., Арисов М. В., 2023

Review article

Methods of coprological diagnostics of animal parasitoses

Olga A. Panova¹, Olga P. Kurnosova², Alexander V. Khrustalev³, Mikhail V. Arisov⁴

¹⁻⁴ All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia

¹ panova@vniigis.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9254-0167>

² kurnosova@vniigis.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3248-8931>

³ khrustalev@vniigis.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4526-8719>

⁴ arisov@vniigis.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2103-8468>

Abstract

The purpose of the research is to review the classical methods of coprological diagnostics, taking into account modern recommendations and proposals.

Materials and methods. Literature sources on the issues of coprological methods of diagnosing parasitosis have been studied.

Results and discussion. Diagnosis during life is an important element of practical veterinary activity, the success of which largely depends on the correct choice and competent use of suitable laboratory methods. For the diagnosis of parasitic diseases, the study of feces is most often used. Coprological methods are highly informative due to the fact that they can detect not only parasites of the digestive tract, liver, pancreas, but also a number of helminths of the respiratory system and even some tissue parasites that excrete eggs or larvae with feces. Unlike existing indirect immunological and molecular genetic methods, classical research methods are based on the detection and identification of the pathogens themselves at different stages of development. At the same time, the researcher has the opportunity to study morphological features and conduct morphometric analysis. The widespread use of classical coprological methods is also associated with their availability, they are quite simple to perform and relatively inexpensive. A limitation of coprological methods is the inability to diagnose pathogens that are at a non-propagative stage. The effectiveness of diagnostics is influenced by the method of collecting samples, the terms and conditions of transportation, and the choice of an adequate method for examining samples. The article presents the rules for sampling and options for the use of fixatives, a classification of coprological methods is given, and the procedure for performing research is described. Special attention is paid to the choice of flotation solutions, the method of cultivation of strongylid larvae and the method of sporulation of coccidia oocysts. Attention is drawn to the importance of micrometric measurements of detected objects. To ensure the quality of the conducted coprological studies, it is necessary to control the stages of the studies, the technical condition of the equipment and train the personnel. The material presented in the article is intended for both students and practitioners.

Keywords: coprological diagnostics, faecal examination, methods, parasites, helminths, protozoa

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030), which forms the basis of state task No. FGUG-2022-0012.

Financial transparency: none of the authors has financial interest in the submitted materials or methods.

There is no conflict of interests.

For citation: Panova O. A., Kurnosova O. P., Khrustalev A. V., Arisov M. V. Methods of coprological diagnostics of animal parasitosis. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2023;17(3):365–377. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-3-365-377>

© Panova O. A., Kurnosova O. P., Khrustalev A. V., Arisov M. V., 2023

Введение

Для обнаружения и определения видового состава паразитов, обитающих в организме животных, применяют методы прижизненной и посмертной (послеубойной) диагностики. Прижизненная лабораторная диагностика основана на трех основных подходах: 1) прямом обнаружении и идентификации возбудителей (гельминтов или их фрагментов, простейших, насекомых, клещей, яиц или личинок), 2) опосредованном иммунологическом подходе – детекция антигенов возбудителей или антительного ответа на них, 3) обнаружении генетического материала возбудителей [1-3, 5, 8, 10, 17].

В клинической практике методы диагностики паразитарных болезней подбираются в зависимости от локализации возбудителей и с учетом особенностей их биологического цикла развития. Наиболее распространенная лабораторная практика – исследование фекалий животных. Относительно недорогие и простые копрологические исследования позволяют выявить не только паразитов желудочно-кишечного тракта, но и паразитов печени, а также дыхательной системы, яйца или личинки которых заглатываются с мокротой. Нередко в фекалиях обнаруживают транзитных паразитов: слизиваемые с кожи и шерстных покровов (как правило, это собственные эктопаразиты), паразиты жертвы (у хищных и всеядных животных) и ооцисты/яйца/личинки возбудителей, поедаемых с фекалиями других животных или человека.

Методы исследования фекалий основаны на обнаружении и идентификации различных стадий возбудителей и исследовании их характерных морфологических особенностей, являясь приоритетными в лабораторной диагностике паразитозов [1, 5, 16, 17].

1. Отбор проб

Пробы фекалий предпочтительно отбирать из прямой кишки животного, чтобы избежать загрязнения личинками свободноживущих нематод. При отсутствии такой возможности пробы берут с земли (или пола), не касаясь поверхности. У крупных животных фекалии берут индивидуально, указывая кличку и номер животного у свиней, овец, кроликов и пушных зверей – чаще групповым способом. Сбор фекалий проводят в сухие водонепроницаемые емкости: баночки из стекла или полимеров, пластиковые пакеты, пластиковые контейне-

ры, одноразовые перчатки или перчатки для ректальной пальпации, вывернутые внутрь, с обязательной нестираемой маркировкой и описью проб в сопроводительном документе. В сопроводительном документе указывают вид, номер, пол и возраст животного, место, время отбора проб с указанием лица, ответственного за отбор. Для выявления изначальной картины зараженности взятие проб следует проводить до планируемой противопаразитарной обработки; исследования, проведенные после лечения, позволяют судить о его эффективности [1, 10, 11, 16].

Отбирают не менее 10 г фекалий. Если нет возможности исследовать пробы в течение двух часов, то их следует хранить при 4 °С в холодильнике, но не более 48 ч. В качестве фиксатора для более длительного хранения наиболее часто используют 5–10%-ный забуференный раствор формалина. Этот консервант является хорошим общим фиксатором и для яиц гельминтов, и для цист простейших. Использование формалина для фиксации образцов имеет дополнительное преимущество, заключающееся в инактивации других организмов (грибы, бактерии, дрожжи), которые могут присутствовать в пробе фекалий [10, 17].

Хранимые в формалине (одна часть фекалий, девять частей 10%-ного формалина) пробы в течение длительного времени остаются пригодными для исследований, хотя эффективность исследований со временем снижается. Так, после 200 сут хранения в 10%-ном формалине обнаруживают только 50% яиц стронгилид жвачных. Внутренняя морфология цист простейших сохраняется до 6 мес. [1, 10].

Если необходимо провести исследование на лямблиоз, фекалии помещают в фиксатор на основе поливинилового спирта в соотношении один к двум (одна часть фекалий и две части поливинилового спирта) или в 5%-ный формалин для фиксации и транспортировки. Трофозоиты плохо сохраняются в формалине и недостаточно хорошо окрашиваются в последующем. Кроме того, в стандартных контейнерах для мазков можно транспортировать в лабораторию мазки фекалий, выполненные на предметных стеклах и окрашенные различными методами (железным гематоксилином, по Гимзе, Гомори и др.) [17].

Нередко фекалии исследуют повторно. Это связано с получением отрицательных резуль-

татов при явной клинической картине, если подозревается, что возбудители не достигли пропагативной стадии развития [11].

2. Обзор, классификация и применение копрологических методов для диагностики различных групп паразитозов

Классические методы копрологических исследований относительно простые, не требуют дорогостоящего и сложного оборудования, но это не снижает их диагностической ценности. Эффективность таких исследований определяется правильным выбором метода, квалификацией персонала и хорошо налаженным оборудованием.

Перед проведением исследований следует обратить внимание на общий вид фекалий, консистенцию, цвет, запах, наличие примесей крови или слизи. К примеру, анкилостомы у собак вызывают кровотечения в тонком отделе кишечника, что приводит к темным, нередко черным, смолистым фекалиям. При кишечном трихомонозе кошек отмечают мягкий стул с большим количеством слизи и резким неприятным запахом.

2.1 Исследование на гельминтозы

Гельминтокопрологические методы исследования – это методы исследования фекалий для выявления гельминтозов. Они подразделяются на методы гельминтоскопии, гельминтоовоскопии и гельминтоларвоскопии.

Гельминтоскопия. При осмотре фекалий можно обнаружить самих паразитов или их фрагменты – наиболее часто членики цестод. Пробу фекалий внимательно осматривают невооруженным глазом и с помощью лупы. Важно осмотреть стенки и крышку тары с пробой, так как членики цестод могут сохранять подвижность и выползать за пределы фекальной массы. Обнаруженные гельминты и их фрагменты извлекают и помещают в физиологический раствор для дальнейшего изучения и определения вида [1, 17].

Гельминтоскопия особенно эффективна после диагностической дегельминтизации. Следует учитывать, что гельминты, особенно погибшие, могут располагаться не только на поверхности фекалий, но и в глубине фекальных масс. В таком случае пробу фекалий помещают в банку, смешивают с 5–10-кратным количеством отстоявшейся воды, тщательно перемешивают и оставляют отстаиваться. Че-

рез 15–20 минут верхний слой сливают, осадок снова перемешивают с чистой водой и опять отстаивают, повторяя данную процедуру до получения просветленного (отмытого) осадка. Процедуру отмывания можно ускорить, вылив водную суспензию фекалий в мешочек из мельничного газа (диаметр пор 300 мкм) и тщательно промыв проточной водой. Отмытый осадок просмотреть в чашке Петри на темном фоне и/или под бинокулярной лупой, разбавляя небольшим количеством воды или физиологического раствора [1].

Обнаруженных гельминтов и их фрагменты извлекают (препаровальной иглой с загнутым концом, пипеткой), помещают на предметное стекло и исследуют под микроскопом. Членики цестод можно помещать между двумя предметными стеклами, слегка сжимать между ними и рассматривать невооруженным глазом и под лупой [1, 5].

Гельминтоовоскопия. Методы гельминтоовоскопии направлены на выявление яиц гельминтов в пробах фекалий. Чаще для обнаружения яиц выбирают методы обогащения (или концентрации). Они предназначены для концентрации яиц гельминтов и основаны на разнице удельного веса яиц, воды и флотационного раствора. Среди методов обогащения выделяют две группы – методы флотации и методы седиментации (или осаждения).

Флотация позволяет сконцентрировать яйца паразитов и избавиться от части мусора. Она основана на том, что яйца гельминтов имеют меньший удельный вес, чем флотационный раствор и всплывают к поверхностной пленке, где их можно собрать для микроскопического исследования. Преимуществом флотационного метода является возможность количественного подсчета обнаруженных яиц гельминтов. Флотационные методы недороги и просты в исполнении.

Осаждение основано на разнице удельного веса паразитарных объектов, воды или других растворов, имеющих невысокую плотность. Под собственным весом яйца гельминтов оседают на дно. Скорость осаждения можно существенно повысить, применяя центрифугирование. Метод используют для выделения яиц трематод, скребней, некоторых ленточных червей и нематод, которые плохо всплывают в флотационных растворах [16, 17].

При оксидурии яйца гельминтов не выявляются при исследовании фекалий из-за того, что самки нематод откладывают яйца на кожу и слизистую оболочку в области ануса. Для диагностики этого гельминтоза применяют разновидность простого нативного мазка – скотч-тест с периаанальных складок или исследование нативного соскоба со слизистой оболочки анального отверстия.

Гельминтолывоскопия. Для выделения личинок нематод из фекалий животных применяют методы гельминтолывоскопии. Наиболее часто применяют метод Бермана, Вайда, Щербовича, Ветцеля-Орлова. Они основаны на смывании личинок нематод с поверхности фекалий и на способности личинок активно выползти из толщи фекалий в воду, особенно теплую. Чаще всего эти методы применяют для диагностики легочных гельминтозов.

При исследовании слизи, выделяемой при дефекации, можно обнаружить личинки стронгилоидесов методом простого мазка.

2.2 Исследование на протозоозы

Для диагностики кишечных простейших, выделяющих с фекалиями устойчивые неподвижные стадии: цисты, ооцисты, применяют те же методы, что и для обнаружения яиц гельминтов. Флотационный метод используют для выявления ооцист кокцидий, цист лямблий (гиардий), амев и балантидиев. Для некоторых видов кокцидий, к примеру *Eimeria leuckarti* лошадей, с крупными и тяжелыми ооцистами более подходят методы осаждения.

Для обнаружения трофозоитов используют методы исследования нативного и/или окрашенного мазка фекалий. При исследовании эмульгированных фекалий обнаруживают вегетативные стадии простейших, сохраняющие свою подвижность. При исследовании слизи, выделяемой при дефекации, можно обнаружить подвижные трофозоиты лямблий, трихомонад и балантидиев. В смывах из прямой кишки диагностируют возбудителя кишечного трихомоноза.

Дополнительная окраска образцов позволяет выявить и дополнительно идентифицировать трофозоиты или ооцисты/цисты простейших.

Для проведения копрологических исследований на паразитов предложены коммерческие наборы. Однако, удобство наборов со-

пряжено подчас с потерей чувствительности – используется малое количество фекалий, не всегда имеется возможность центрифугировать образец и т. п.

3. Техника лабораторного копрологического анализа

3.1 Методы флотации

Принцип флотационного метода заключается в способности менее плотных, чем флотационный раствор, частичек всплывать наверх к поверхностной пленке после смешивания флотационного раствора и пробы фекалий. Этот процесс может происходить медленнее, если смесь пассивно отстаивается в течение требуемого времени, либо флотация ускоряется путем центрифугирования смеси [10, 17].

Выбор флотационных растворов. Все методы флотации основаны на всплывании яиц гельминтов, ооцист/цист простейших и личинок во флотационных растворах. Чем выше удельный вес (УВ) флотационного раствора, тем большее число объектов будет всплывать. Однако, диапазон применяемых флотационных растворов ограничивается – по мере увеличения удельного веса раствора будет всплывать больше сопутствующего мусора, ухудшающего качество исследования и повышающего время, затраченное на исследование, а также возрастает риск повреждения паразитарных объектов гиперосмотическим раствором. Это ограничивает диапазон удельного веса применяемых растворов от 1,18 до 1,35.

В настоящее время отработано множество как простых однокомпонентных флотационных растворов, так и двух- и многокомпонентных. К флотационным растворам, широко используемым в ветеринарной паразитологии, относятся раствор сахара и различные солевые растворы. Ни один раствор не подходит для диагностики всех паразитов сразу [17]. Основные растворы приведены в таблице 1.

Широко применяют солевые растворы. Насыщенные растворы хлорида натрия (УВ 1,20) и сульфата магния (УВ 1,32), раствор нитрата натрия ненасыщенный (УВ 1,2) и насыщенный (УВ 1,33-1,35) недороги, их легко купить и приготовить; они эффективны для обнаружения яиц гельминтов и цист простейших [8, 11].

Флотационные растворы нитрата натрия, насыщенного раствора хлорида натрия, насыщенного раствора сульфата магния и 33%-

Таблица 1 [Table 1]

Основные флотационные растворы, применяемые при диагностике паразитозов
[The main flotation solutions used in the diagnosis of parasitosis]

Флотационный раствор [Flotation solution]	Состав [Structure]	Плотность, г/см ³ [Density, g/cm ³]
<i>Однокомпонентные [One-component]</i>		
Хлорид натрия [Sodium chloride]	Насыщенный раствор [Saturated solution] NaCl 500 г, H ₂ O до 1000 мл	1,20
Сульфат цинка [Zinc sulfate]	ZnSO ₄ ·xH ₂ O 330 г, H ₂ O до 1000 мл	1,20
	ZnSO ₄ 436 г, H ₂ O до 1000 мл	1,30
	ZnSO ₄ ·xH ₂ O 685 г, H ₂ O 685 мл	1,35
Нитрат натрия [Sodium nitrate]	NaNO ₃ 315 г, H ₂ O до 1000 мл	1,20
	Насыщенный раствор [Saturated solution] NaNO ₃ 1000 г, H ₂ O до 1000 мл	1,33–1,35
Сульфат магния [Magnesium sulfate]	MgSO ₄ 350 г, H ₂ O до 1000 мл	1,28
	Насыщенный раствор [Saturated solution] MgSO ₄	1,32
Сахарный раствор Шитера [Sheeter's sugar solution]	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ 550 г, H ₂ O до 1000 мл	1,30
Нитрат аммония [Ammonium nitrate]	NH ₄ NO ₃ 1500 г, H ₂ O до 1000 мл	1,30
Тиосульфат натрия [Sodium thiosulfate]	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 1750 г	1,40
<i>Двухкомпонентные [Two-component]</i>		
Сахароза и формальдегид [Sucrose and formaldehyde]	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ 454 г, CH ₂ O раствор (40 %) 6 мл, H ₂ O 355 мл	1,20
Нитрат натрия и тиосульфат натрия [Sodium nitrate and sodium thiosulfate]	NaNO ₃ 250 г, Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 300 г, H ₂ O до 1000 мл	1,30
	NaNO ₃ 300 г, Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 620 г, H ₂ O 530 мл	1,45
Хлорид натрия и хлорид цинка [Sodium chloride and zinc chloride]	NaCl 210 г, ZnCl ₂ 220 г, H ₂ O до 1000 мл	1,35
Сахароза и нитрат натрия [Sucrose and sodium nitrate]	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ 540 г, NaNO ₃ 360 г, H ₂ O до 1000 мл	1,35
<i>Многокомпонентные [Multicomponent]</i>		
Сахароза, нитрат натрия и тиосульфат натрия [Sucrose, sodium nitrate and sodium thiosulfate]	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ 1200 г, NaNO ₃ 1280 г, Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 1800 г, H ₂ O 720 мл	1,45

ного раствора сульфата цинка не будут надежно поднимать большую часть яиц трематод, некоторых ленточных червей и нематод. Для их диагностики целесообразно применять растворы с более высоким удельным весом или применять для исследования методы седиментации [8, 16, 17].

Цисты лямблий быстро разрушаются в большинстве флотационных растворов. Если требуется их обнаружение, лучшим выбором для флотации является 33%-ный раствор сульфата цинка (УВ 1,18), который не вызывает быстрого разрушения цист лямблий [11, 17].

При применении солевых растворов микроскопирование препаратов следует проводить сразу после их приготовления, поскольку по мере высыхания соль кристаллизуется, что затрудняет дальнейшее исследование.

Приготовление флотационных растворов. Соль насыпают в эмалированную емкость (кастрюлю/ведро) с теплой водой при постоянном помешивании и постоянном нагревании до полного растворения соли, при необходимости доводят до кипения. Оставляют остывать до комнатной температуры. Процеживают через фильтр, или слой ваты, или марлю, сложенную в 4 раза, помещенные в воронку. Полученный флотационный раствор переливают в бутылки с плотно закрывающейся крышкой. Образующийся на дне сосуда осадок соли является признаком насыщенности раствора и не является индикатором плохого качества раствора.

После приготовления флотационного раствора сахара и его остывания до комнатной температуры, добавляют формальдегид для предотвращения бактериального роста и потери УВ при хранении.

Обязательным является контроль плотности флотационного раствора после приготовления. Ежедневно, перед началом работы, контролируют плотность раствора. Измерение проводят ареометрами для солевых растворов [1, 5, 11, 17]. Наличие ареометра и проведение им контрольных измерений плотности растворов солей в лаборатории следует рассматривать как часть контроля качества лабораторной работы.

Метод пассивной флотации. Для этого метода рекомендованы флотационные растворы нитрата натрия и насыщенные солевые растворы. Однако, чувствительность данного метода будет ниже по сравнению с методом флотации с центрифугированием.

Порядок выполнения: смешивают 3–5 г фекалий с небольшим количеством флотационного раствора в стаканчике объемом 30–50 мл. Смесь фекалий и флотационного раствора процеживают через двойной слой марли или ситечко в пробирку (можно взять пробирку объемом 12–15 мл), но чаще в другой такой же стакан.

Пробирку заполняют флотационным раствором до образования выпуклого мениска, накрывают покровным стеклом и отстаивают не менее 10 минут для растворов нитрата натрия, не менее 20 минут – для хлорида натрия. Если используют стакан с более широким горлом, то его заполняют флотационным раствором (30–50 мл) и отстаивают на ровной поверхности то же время.

По истечении времени покровное стекло снимают и помещают на предметное стекло для последующего исследования. При использовании стакана поверхностную пленку снимают паразитологической петлей (диаметр 8–10 мм), выполненной из тонкой проволоки [1, 17].

Этот вариант метода не рекомендуется проводить с 33%-ным раствором сульфата цинка и раствором сахара [11, 17].

Метод флотации с центрифугированием. Независимо от используемого флотационного раствора центрифугирование ускоряет процесс поднятия частиц и повышает эффективность флотации. Центрифугирование необходимо при использовании растворов с низкой плотностью или раствора сахара из-за его высокой вязкости, которые замедляют процесс флотации.

Порядок выполнения: смешивают 3–5 г фекалий с небольшим количеством флотационного раствора в стаканчике. Фекалии, которые трудно разбить, можно измельчить с помощью ступки и пестика или погрузить в воду до размягчения.

Смесь фекалий и флотационного раствора процеживают через двойной слой марли или ситечко (диаметр пор 0,25–0,5 мм) в центрифужную пробирку объемом 12–15 мл.

Если центрифуга имеет ротор с подвесными стаканами (бакет-ротор), центрифужные пробирки заполняют флотационным раствором до образования выпуклого (положительного) мениска и сверху устанавливают покровное стекло. Пробирку центрифугируют с покровным стеклом. Если центрифуга имеет угловой ротор, пробирку заполняют смесью фекалий и флотационного раствора как можно более полно и центрифугируют без покровного стекла и крышки [17].

Центрифугирование проводят в течение 5 минут при 1000–1500 об/мин. Тормоз у центрифуги не используют, важно дать ей плавно остановиться. Любое подергивание и встряхивание пробирки может сместить яйца/ооцисты паразитов с поверхностной пленки.

После центрифугирования есть несколько способов сбора поверхностной пленки. Если центрифугирование проходило с покровным стеклом, то оно снимается с пробирки строго вертикально и перемещается на предметное стекло.

Если центрифугирование проходило без покровного стекла, поверхностную пленку снимают паразитологической петлей (диаметр 8–10 мм), выполненной из тонкой проволоки. Снимают 4–5 капель поверхностной пленки; рекомендуется добавить каплю воды и накрыть покровным стеклом. Также можно извлечь пробирку из центрифуги, поместить в штатив, заполнить флотационным раствором до образования выпуклого мениска, закрыть покровным стеклом и дать отстояться еще 5–10 минут, после чего покровное стекло снимается и помещается на предметное.

Если образец фекалий содержит большое количество примесей (жира, слизи, крупных частичек корма), выполняют первоначальную промывку водой. Тогда на этапе 1.1 пробу изначально замачивают в отстоянной во-

допроводной воде, хорошо перемешивают, суспензию процеживают через двойной слой марли или ситечко (диаметр пор 0,25–0,5 мм) в центрифужную пробирку объемом 50 мл. Центрифугируют 3–5 минут при 800–1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют сливанием и только после этого к отмытому осадку добавляют флотационный раствор. Смесь с флотационным раствором переносят в центрифужную пробирку объемом 12–15 мл и далее исследование выполняют в соответствии с пунктами 1,3–1,4. Такой подход называют также комбинированным методом исследования, когда поочередно применяют метод осаждения (седиментации в воде) и метод флотации [10].

3.2 Методы осаждения

Простой метод седиментации. Порядок выполнения: смешивают 50 мл водопроводной отстоянной воды с 5 г фекалий (или 100 мл воды с 10 г фекалий), процеживают через сито в стакан или другую емкость. Смесь отстаивают 20–30 мин., после чего надосадочную жидкость сливают. Снова добавляют воду, смесь тщательно перемешивают и процедуру осаждения повторяют. При необходимости этот этап повторяют до 5 раз, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. По мере отмывания осадка и уменьшения концентрации взвеси время отстаивания постепенно сокращают до 5 мин.

Несколько капель осадка переносят на предметное стекло, при необходимости разбавляют дополнительно водой (для достижения оптимальной прозрачности) и накрывают покровным стеклом для последующего микроскопирования. Можно добавить одну каплю 0,1%-ного метиленового синего к полученному при седиментации осадку. Он окрашивает фоновый мусор в синий цвет, но не окрашивает яйца трематод, которые выделяются желтовато-коричневым цветом. Добавление капли жидкого мыла или средства для мытья посуды в воду помогает освободить яйца от окружающего мусора [16, 17].

Метод формалин-эфирного/формалин-ацетатного осаждения. Порядок выполнения: в стаканчик вносят 1–1,5 г фекалий с 10 мл 10%-ного формалина, тщательно перемешивают до образования гомогенной суспензии.

Смесь процеживают через два слоя марли, либо через сито в центрифужную пробирку объемом 15 мл. Раствором 10%-ного форма-

лина объем доводят до 10 мл. К суспензии добавляют 3 мл эфира (или этилацетата), пробирку закрывают пробкой и энергично перемешивают встряхиванием.

Поскольку органические растворители могут растворять некоторые пластиковые центрифужные пробирки, для проведения этого метода рекомендуется использовать стеклянные или полипропиленовые пробирки.

Пробирку центрифугируют при 1000–1500 об/мин в течение 3–5 минут. После центрифугирования содержимое пробирки распределяется на 4 слоя: верхний слой эфира, слой жирных остатков, прилипших к стенке пробирки, слой формалина и слой осадка. Препаровальной иглой обводят слой жирных остатков и три верхних слоя выливают в одно движение, оставляя осадок.

Каплю осадка переносят на предметное стекло, при необходимости разбавляют дополнительно водой (для достижения оптимальной прозрачности) и накрывают покровным стеклом для последующего микроскопирования [1, 16, 17].

Стоит помнить, что эфир и этилацетат токсичные летучие вещества, легко воспламеняются. Их хранят в специальных шкафах и используют только под вытяжкой (или в хорошо вентилируемых помещениях).

3.3 Методы ларвоскопии

Для проведения исследования фекалий методами ларвоскопии важно, чтобы образец был свежим. Если исследуют старый образец, то возможно вылупление личинок из яиц или развитие в образце свободноживущих нематод, что затруднит идентификацию. К примеру, личинки анкилостом плотоядных могут созреть и вылупиться на третьи сутки и их можно спутать с личинками легочных гельминтов или стронгилоидесов [1, 5, 16, 17].

Метод Бермана. Для метода Бермана требуются стеклянные воронки, зажимы, резиновые трубки (около 10 см), металлические сеточки и штатив для закрепления воронок. Резиновую трубку надевают на узкий конец стеклянной воронки, укрепляют зажим, воронку устанавливают на штативе. На верхний край воронки кладут металлическую сеточку. В таком аппарате личинки, помещенные с фекалиями на сеточку, мигрируют из образца и падают в трубку, где концентрируются над зажимом.

Порядок выполнения: помещают не менее 10 г фекалий на кусок двухслойной марли и кладут на сеточку, установленную на воронку. Наливают в воронку теплую воду (40–45 °C), чтобы нижняя часть сетки с фекалиями была погружена в воду. Важно, чтобы углы марли не свешивались за край воронки, потому что они будут действовать как фитили для воды.

Образец оставляют на 8–10 ч, удобно на ночь, при комнатной температуре. Личинки начинают активно переходить в теплую воду и концентрируются в нижней части резиновой трубки. По окончании сливают осадок (первые 10 мл жидкости) в центрифужную пробирку, центрифугируют 2–3 минуты при 800–1000 об/мин., надосадочную жидкость сливают, осадок исследуют. Можно первые 3 капли слить на предметное стекло, осторожно ослабив зажим [1, 3, 8, 17].

Метод Вайда. Обычно метод применяют при исследовании фекалий плотной консистенции от овец, коз, оленей. Берут 3–5 шариков фекалий, помещают на часовое стекло с теплой водой на 5–10 минут. За это время шарики фекалий переворачивают в воде 1–2 раза, затем их удаляют, а жидкость исследуют под микроскопом непосредственно в часовом стекле [1, 2, 5].

Метод Щербовича. Используют при исследовании фекалий рыхлой консистенции, как правило, крупного рогатого скота. Пробу фекалий в количестве 10–15 г помещают в марлевый узелок и опускают в стакан с водой на 3–5 ч. Кончики марли закрепляют к пинцету или палочке, которая устанавливается на края стакана, чтобы узелок с фекалиями не опускался на дно стакана. По истечении указанного срока пробу фекалий выбрасывают, верхний слой жидкости из стакана сливают, а осадок помещают в часовое стекло и исследуют под микроскопом [1, 5].

3.4 Культивирование личинок стронгилид

Копытные животные заражены множеством видов нематод отр. Strongylida, яйца которых однотипны и их трудно дифференцировать. В ветеринарной практике, как правило, нет необходимости идентифицировать отдельные виды, поскольку лечение и борьба обычно направлены на всю группу нематод, а не на отдельный вид. Если требуется идентификация родов стронгилид, наиболее удобным методом являет-

ся культивирование яиц до третьей личиночной стадии. У жвачных животных и лошадей этот метод используют для специфической идентификации родов стронгилид [17].

Порцию свежих фекалий животного в количестве 10–30 г помещают в чашку Петри или стакан, увлажняют, закрывают и оставляют или в термостате при температуре 25–27 °C на 7 сут, или при комнатной температуре 10–20 сут. По мере подсыхания пробу фекалий слегка увлажняют водой. Необходима ежедневная аэрация и перемешивание проб. По истечении указанных сроков пробу фекалий исследуют методом Бермана, описанным выше [1, 5].

По методу Ветцеля-Орлова после культивирования личинок, стакан с фекалиями заполняют водой, выдерживают 15–20 минут, затем верхний слой осторожно сливают, отстаивают и осадок исследуют в часовом стекле под микроскопом.

Личинок гельминтов из фекалий можно культивировать также на фильтровальной бумаге (метод Харада и Мори в модификациях). На фильтровальную бумагу размером 16 × 3,5 см тонким слоем наносят фекалии, края бумаги оставляют свободными. Бумагу помещают в банку, заполненную водой так, чтобы нижний край бумаги, свободный от фекалий, был погружен в воду. В течение 5–6 дней выдерживают в термостате при 28 °C. Личинки развиваются из яиц и спускаются по фильтровальной бумаге на дно банки. По окончании инкубации фильтровальную бумагу извлекают из банки, жидкость исследуют под лупой. Также возможно отцентрифугировать жидкость и исследовать осадок под микроскопом [5].

Основными параметрами, по которым дифференцируют рода и отдельные виды нематод отр. Strongylida у личинок 3-й стадии (L3), являются размеры личинок, форма и число кишечных клеток, форма личинок и особенности строения хвоста (длина, форма) (Cernea L. M., 2008). Идентификацию личинок стронгилид проводят по руководству «Ветеринарная клиническая паразитология» Zajac A. M. и Conboy G. A. (2012), атласу диагностики стронгилид лошадей Cernea L. M. с соавт. (2008), определителю Lichtenfels с соавт. (2008), статье морфометрической идентификации инфекционных личинок циаостом лошадей (Nematoda: Cyathostominae) Kornas с соавт. (2009) и др. [1, 6, 7, 12, 14, 17].

3.5. Метод споруляции ооцист кокцидий

Ооцисты кокцидий идентифицируют на основании числа и морфологии спороцист и спорозоитов, образуемых в процессе созревания (спорогонии) ооцисты в естественных или лабораторных условиях. Спорогония или споруляция – это процесс формирования спорозоитов кокцидий из зиготы [1-3, 9].

Метод споруляции в лабораторных условиях. Порядок выполнения: смешивают небольшое количество фекалий с 2,5%-ным раствором бихромата калия. Выкладывают полученную смесь тонким слоем в чашку Петри и инкубируют при 25–27 °С не менее трех дней. Обязательна ежедневная аэрация чашек Петри.

Срок созревания ооцист различается у разных видов кокцидий. К примеру, *Isospora felis* от кошек достигнет инвазионной стадии за 1–3 сут, *Eimeria bovis* и *Eimeria ellipsoidalis* от коров спорулируют за 2–3 сут, *Eimeria zuernii* – за 2–10, а *Eimeria bukidnonensis* – за 5–27 сут. Поэтому процесс созревания нужно контролировать каждые 24 ч.

В процессе споруляции и по ее истечению делают простой мазок фекалий на стекло или применяют метод флотации. Обращают внимание на размеры самой ооцисты, размеры и число спороцист и спорозоитов у ооцисты [3, 16].

Определение проводят по определителю паразитических простейших Levine N. D. (1970), Крылова М. В. (1996), по книге под ред. Степановой Н. И. (1982), Dubey J. P. (2019) и др. [1-3, 9, 13].

3.6. Исследование мазков фекалий

Для исследования мазков фекалий используют малый объем проб, поэтому чувствительность методов будет низкой, и он эффективен только в случае, если интенсивность инвазии высокая. Не всегда просто идентифицировать объекты, поскольку они могут быть покрыты детритом. Также нет возможности количественно оценить результаты. Данный метод не рекомендован для рутинных анализов фекалий, его необходимо комбинировать с методами концентрации [16, 17].

Простой мазок. Метод заключается в микроскопировании нативных (не окрашенные) тонких мазков образца. На предметное стекло наносят несколько капель физиологического

раствора, в них помещают частичку исследуемых фекалий (3–5 мг) и тщательно размешивают. Вода разрушает трофозоиты простейших, ее применять не рекомендуется. Суспензию накрывают покровным стеклом. Препарат должен быть достаточно тонким для хорошей визуализации всех слоев, распознавания простейших и характера их движений [16, 17].

Окрашенные мазки. Нативные препараты при идентификации простейших можно дополнительно окрашивать, но предварительно провести изучение нативного (не окрашенного) препарата. Водный раствор Люголя (йод кристаллический 1,0 г, калия иодид 2,0 г, вода до 100 мл) окрашивает внутреннюю структуру цист, но убивает трофозоиты. Применяют краски для идентификации *Cryptosporidium*, включая окраски по Цилю–Нильсену, Гимзе или карбол-фуксином. Окраску трихромом широко используют в медицине для обнаружения цист лямблий. Однако, этот краситель в ветеринарной практике применяют не часто [16, 17].

4. Техника микроскопирования

Для исследования препаратов достаточно 100-кратного увеличения микроскопа, обеспечиваемое имеющимися у большинства микроскопов 10-кратным окуляром и 10-кратным объективом. Большинство яиц гельминтов можно обнаружить и при меньших увеличениях, но простейших можно пропустить, поэтому их не рекомендуется использовать. Большие увеличения (в 200 и 400 раз) необходимы для проведения измерений размеров объектов и идентификации простейших. Для увеличения контрастности поля зрения и лучшей визуализации цист/яиц/личинок можно сильнее диафрагмировать конденсор микроскопа или переместить его в нижнее [1].

Просматривать обязательно весь препарат для полноты исследования. Это особенно важно при проведении количественной оценки инвазии. Также, нужно помнить о разных плоскостях исследования – яйца гельминтов и цисты простейших, как правило, располагаются на разных уровнях препарата и изменение фокуса микровинтом необходимо при просмотре каждого поля зрения.

Иногда для экономии в лабораториях не используют покровные стекла. Однако, препарат без покровного стекла быстро высохнет

и его нельзя исследовать под объективом 40х; это может стать причиной не полного исследования препарата и некорректной идентификации объектов [1].

5. Диагностические признаки возбудителей гельминтозов

Для видовой идентификации яиц гельминтов при микроскопии препаратов обращают внимание на следующие морфологические признаки:

Размеры. Микрометрия имеет решающее значение при идентификации возбудителей. Для каждого вида гельминта характерна определенная величина яиц: измеряют длину и ширину и сравнивают со средними значениями для вида. К примеру, яйца анкилостом и унцинарий у псовых можно дифференцировать только на основании размеров – яйца *Ancylostoma caninum* 58–76 × 36–42 мкм, яйца *Uncinaria stenocephala* 70–90 × 40–50 мкм [1, 15].

Форма яиц. Яйца гельминтов имеют округлую форму, эллипсоидную, вытянутую в разной степени, иногда ассиметричные.

Толщина оболочки яиц разных видов гельминтов сильно различается. Важно обращать внимание на рисунок и рельеф наружной оболочки – она может быть гладкой (*Toxascaris leonina*, *Fasciola hepatica*), с сетчатым (*Capillaria putorii*) или точечным (тениидные яйца) рисунком, ямчатой (*Toxocara canis*) или бугристой (*Ascaris suum*).

Цвет. Яйца некоторых видов гельминтов окрашены в желто-коричневый цвет (у большинства трематод), у других – изначально бесцветны, но окрашиваются пигментами желудочно-кишечного тракта в темно-желтый или коричнево-бурый цвет (яйца аскарид); встречаются и неокрашенные яйца, например, у анкилостоматид, остриц.

Наличие морфологических особенностей: крышечки и шипика (яйца трематодного типа), пробочки на обоих полюсах (яйца капиллярий и трихурид), крючки у зародыша (3 пары у онкосферы в яйцах цепней), наличие грушевидного аппарата (у аноплосцефалид).

При диагностике стоит учитывать, что при исследовании несвежего материала, ооцисты простейших/яйца гельминтов некоторых видов могут активно развиваться и за 1–3-и сутки достичь инвазионной стадии, что отразится на морфологии [16, 17].

6. Контроль качества копрологических исследований

Для обеспечения качества проводимых копрологических методов исследования в лаборатории необходимо регулярно проводить контроль этапов исследования, проверять техническое состояние оборудования, обучать и тестировать персонал.

Микроскопы должны содержаться в исправном состоянии. Линзы объективов и окуляры следует регулярно очищать с помощью очистителя для линз и мягких неволокнящихся салфеток.

Удельный вес флотационных растворов подлежит проверке после приготовления и еженедельно с помощью ареометров для солевых растворов соответствующей плотности. Нельзя приступать к исследованию, если есть сомнения в соответствии удельного веса флотационного раствора требуемым показателям.

Для окулярной линейки перед началом работы с ней необходимо высчитать цену деления на всех увеличениях объективов микроскопа.

Особое внимание нужно уделять обучению персонала, выполняющего копрологические исследования, повышать уровень знаний в идентификации и морфометрии возбудителей [1].

Список источников

1. Арисов М.В., Панова О.А., Хрусталева А.В., Курносова О.П., Сысоева Н.Ю., Гламаздин И.Г. Классические копрологические методы диагностики паразитозов животных: учебно-методическое пособие. М.: ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 2022. 36 с. <https://doi.org/10.31016/978-5-6048555-0-8.2022>
2. Котельников Г. А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды. М.: Колос, 1984. 208 с.
3. Крылов М. В. Определитель паразитических простейших. Санкт-Петербург, 1996. 603 с.
4. Степанова Н. И., Казаков Н. А., Заблоцкий В. Т. и др. Протозойные болезни сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1982. 352 с.
5. Черепанов А. А., Москвин А. С., Котельников Г. А., Хренов В. М. Дифференциальная диагностика гельминтозов по морфологической структуре яиц и личинок возбудителей. Атлас. М.: Колос, 2001. 77 с.
6. Brianti E., Giannetto S., Traversa D., Chirgwin S. R., Shakya K., Klei T. R. In vitro development of cyathostomin larvae from the third stage larvae

- to the fourth stage: morphologic characterization, effects of refrigeration, and species-specific patterns. *Veterinary Parasitology*. 2009; 163: 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.029>
7. *Cernea L. M., Carvalho L. M. M. de, Vasile C., Raileanu S.* Atlas of Diagnosis of Equine Strongylidosis. Cluj-Napoca: AcademicPres, 2008; 123.
 8. *Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Scala A.* The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2004; 123: 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.05.021>
 9. *Dubey J. P.* Coccidiosis in livestock, poultry, companion animals, and humans. CRC Press Taylor & Francis Group, 2019; 398. <https://doi.org/10.1201/9780429294105>
 10. *Foreyt W. J.* Veterinary parasitology reference manual. 5th ed., John Wiley & Sons, 2013; 256.
 11. *Kaufmann J.* Parasitic infections of domestic animals: a diagnostic manual. Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser, 1996; 423.
 12. *Kornas S., Gawor J., Cabaret J., Molenda K., Skalska M., Nowosad B.* Morphometric identification of equid cyathostome (Nematoda: Cyathostominae) infective larvae. *Veterinary Parasitology*. 2009; 162. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.018>
 13. *Levine N. D., Iyans V.* The Coccidian Parasites (Protozoa, Sporozoa) of Ruminants. University of Illinois press Urbana, Chicago and London, 1970; 304.
 14. *Lichtenfels J. R., Kharchenko V. A., Dvojnok G. M.* Illustrated Identification Keys to Strongylid Parasites Strongylidae Nematoda of Horses Zebras and Asses Equidae. Manter Laboratory of Parasitology. 2008; 634. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.026>
 15. *Lucio-Forster A., Liotta J. L., Yaros J. P., Briggs K. R., Mohammed H. O., Bowman D. D. J.* *Parasitol.* 2012; 98 (5):1041-1044. <https://doi.org/10.1645/GE-2928.1>
 16. *Paul A., White A. G., Barger A. M.* Parasitology, chapter 6: Clinical pathology and laboratory techniques for veterinary technicians / edited by A. M. Barger and A. L. MacNeill. Blackwell Publishing, 2015; 265.
 17. *Zajac A. M., Conboy G. A., Little S. E., Reichard M. V.* Veterinary clinical parasitology. 9th edn. Wiley-Blackwell, Chichester, 2021; 432.

Статья поступила в редакцию 14.06.2023; принята к публикации 10.08.2023

Об авторах:

Панова Ольга Александровна, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, кандидат биологических наук, ORCID ID: 0000-0001-9254-0167, panova@vniigis.ru

Курносова Ольга Петровна, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, кандидат биологических наук, ORCID ID: 0000-0002-3248-8931, kurnosova@vniigis.ru

Хрусталева Валерьевич, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, ORCID ID: 0000-0002-4526-8719, hrustalev@vniigis.ru

Арисов Михаил Владимирович, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, доктор ветеринарных наук, профессор РАН, ORCID ID: 0000-0002-2103-8468, director@vniigis.ru

Вклад соавторов:

Панова Ольга Александровна – исследование материала, обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна опытов, написание текста рукописи.

Курносова Ольга Петровна – исследование материала, обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна опытов, написание текста рукописи.

Хрусталева Валерьевич – определение возбудителей, анализ полученных данных, разработка дизайна рукописи.

Арисов Михаил Владимирович – разработка дизайна опытов.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

References

1. Arisov M.V., Panova O.A., Khrustalev A.V., Kurnosova O.P., Sysoeva N.Yu., Glamazdin I.G. Classical coprological methods for diagnosing parasitosis in animals: a teaching aid. M.: VNIIP – branch of the FGBNU FNTs VIEV RAS, 2022. - 36 p. <https://doi.org/10.31016/978-5-6048555-0-8.2022>
2. Kotelnikov G. A. Helminthological studies of animals and the environment. M.: Kolos, 1984; 208. (In Russ.)

3. Krylov M. V. Key to parasitic protozoa. St. Petersburg, 1996; 603. (In Russ.)
4. Stepanova N. I., Kazakov N. A., Zablotsky V. T. et al. Protozoal diseases of farm animals. 1982; 352. (In Russ.)
5. Cherepanov A.A., Moskvina A.S., Kotelnikov G.A., Khrenov V.M. Differential diagnosis of helminthiasis according to the morphological structure of eggs and larvae of pathogens: Atlas. M.: Kolos, 2001; 77. (In Russ.)
6. Brianti E., Giannetto S., Traversa D., Chirgwin S. R., Shakya K., Klei T. R. In vitro development of cyathostomin larvae from the third stage larvae to the fourth stage: morphologic characterization, effects of refrigeration, and species-specific patterns. *Veterinary Parasitology*. 2009; 163: 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.029>
7. Cernea L. M., Carvalho L. M. M. de, Vasile C., Raileanu S. Atlas of Diagnosis of Equine Strongylidosis. Cluj-Napoca: AcademicPres, 2008; 123.
8. Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Scala A. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2004; 123: 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.05.021>
9. Dubey J. P. Coccidiosis in livestock, poultry, companion animals, and humans. CRC Press Taylor & Francis Group, 2019; 398. <https://doi.org/10.1201/9780429294105>
10. Foreyt W. J. Veterinary parasitology reference manual. 5th ed., John Wiley & Sons, 2013; 256.
11. Kaufmann J. Parasitic infections of domestic animals: a diagnostic manual. Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser, 1996; 423.
12. Kornas S., Gawor J., Cabaret J., Molenda K., Skalska M., Nowosad B. Morphometric identification of equid cyathostome (Nematoda: Cyathostominae) infective larvae. *Veterinary Parasitology*. 2009; 162. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.018>
13. Levine N.D., Iyens V. The Coccidian Parasites (Protozoa, Sporozoa) of Ruminants. University of Illinois Press Urbana, Chicago and London, 1970; 304.
14. Lichtenfels J. R., Kharchenko V. A., Dvojnos G. M. Illustrated Identification Keys to Strongylid Parasites Strongylidae Nematoda of Horses Zebras and Asses Equidae. Manter Laboratory of Parasitology. 2008; 634. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.026>
15. Lucio-Forster A., Liotta J. L., Yaros J. P., Briggs K. R., Mohammed H. O., Bowman D. D. J. Parasitol. 2012; 98 (5):1041–1044. <https://doi.org/10.1645/GE-2928.1>
16. Paul A., White A. G., Barger A. M. Parasitology, chapter 6: Clinical pathology and laboratory techniques for veterinary technicians / edited by A. M. Barger and A. L. MacNeill. Blackwell Publishing, 2015; 265.
17. Zajac A. M., Conboy G. A., Little S. E., Reichard M. V. Veterinary clinical parasitology. 9th edn. Wiley-Blackwell, Chichester, 2021; 432.

The article was submitted 14.06.2023; accepted for publication 10.08.2023

About the authors:

Panova Olga A., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218), Moscow, Russian Federation, Candidate of Biological Sciences, ORCID ID: 0000-0001-9254-0167, panova@vniigis.ru

Kurnosova Olga P., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218), Moscow, Russian Federation, Candidate of Biological Sciences, ORCID ID: 0000-0002-3248-8931, kurnosova@vniigis.ru

Khrustalev Alexander V., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218), Moscow, Russian Federation, ORCID ID: 0000-0002-4526-8719, hrustalev@vniigis.ru

Arisov Mikhail V., VNIIP – FSC VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia), Moscow, Russian Federation, Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the RAS, ORCID ID: 0000-0002-2103-8468, director@vniigis.ru

Contribution of co-authors:

Panova Olga A. – study of the material, review of publications on the topic of the article, development of the design of experiments, writing the text of the manuscript.

Kurnosova Olga P. – study of the material, review of publications on the topic of the article, development of the design of experiments, writing the text of the manuscript.

Khrustalev Alexander V. – identification of pathogens, analysis of the obtained data, development of the design of the manuscript.

Arisov Mikhail V. – experimental design development.

All authors have read and approved the final manuscript.