

Винахід відноситься до ветеринарної медицини, зокрема до способів діагностики демодекозу у собак на основі біопсії шкіри.

Демодекоз (demodecosis) - поширене захворювання з групи акародерматозів, збудником якого є кліщ *Demodex canis*. Хвороба проявляється вогнищевим або дифузним запаленням сальних залоз і волосяних фолікулів, випаданням шерсті, утворенням на шкірі папул, пустул, лусочок, потовщень та складок. Паразити знаходяться у волосяних фолікулах іноді - в сальних та апокринових потових залозах та глибоко у дермі.

Для діагностики цієї хвороби у ветеринарній медицині використовують метод глибоких зіскрібів у різних модифікаціях (К.И. Абуладзе Паразитология и инвазионные болезни сельскохозяйственных животных. М.: «Агропромиздат», 1990.; Г. Уркхарт Паразитология. М.: Аквариум.2000.-352с.; С.В. Ларіонов Демодекоз животных. Ветеринария. 1990. №8 с.41-4.), вивчення зіскрібів проводять під малим збільшенням мікроскопу.

Недоліком відомого методу глибокого зіскрібу є те, що кліщі виявляються не у всіх випадках внаслідок того, що вони можуть розташовуватись глибоко в дермі або у волосяних фолікулах, де їх неможливо знайти цим методом.

Винаходом ставиться завдання покращення методу діагностики демодекозу собак, що дозволить забезпечити хворим тваринам адекватне лікування.

Поставлене винаходом завдання досягається тим, що у способі діагностики демодекозу собак, що включає дерматологічне дослідження шкіри на виявлення збудника, згідно винаходу для патогістологічного дослідження для виявлення кліщів та оцінки стану шкіри, після місцевого знеболення ураженої ділянки шкіри, відбирають біоптат розміром 0,8х1,2см на глибину до гіподерми з орієнтацією більшої сторони біоптату по напрямку росту волосся, біоптат перед фіксацією поміщають дермою на фільтрувальний папір, відібраний біоптат фіксують при кімнатній температурі у 10% нейтральному розчині формаліну об'ємом у 15...20 разів більшим за об'єм біоптату, після фіксації біоптат промивають, проби тканини зневоджують у спиртах зростаючої концентрації з об'ємами у 50... 100 разів більшими за об'єм біоптату, проводять парафінову заливку зневодженого біоптату за схемою: анілін - 1...2 доби, хлороформ - 3год., суміш хлороформ-парафін 1:1-1год., I парафін при 56°C-45хв., II парафін при 56°C-45хв., зрізи парафінового блоку наклеюють на скло і після повного висушування перед фарбуванням піддають депарафінуванню у ксілолі, після розчинення парафіну зрізи переносять у 96° і 70° спирти по 1...2хв. та у дистильовану воду на 2...3хв. після цього парафінові зрізи поміщають у розчин гематоксиліну Караці на 2...10хв промивають протягом 10хв. у проточній воді, поміщають на 1хв. у 1% розчин еозину промивають у дистильованій воді, зневоджують у спиртах, просвітлюють у толуолі і заключають у бальзам, дорослі особи демодексу зафарбовуються у різні відтінки червоного кольору, яйця та личинки зафарбовуються у сірий колір.

Приклад. Якщо хвороба розпочалася недавно, для біопсії обираємо ділянку шкіри з найбільш свіжими ураженнями. При хронічному перебігу дерматозу біоптат беремо з повністю сформованих ділянок ураження.

Біоптати для гістологічного дослідження беремо під місцевим знеболенням. Анестетик вводимо інфільтраційно на деякій відстані від місця передбаченої біопсії, застосовуємо 2% розчин лідокаїну 3-5мл. або 2% розчин новокаїну у тій же дозі. Волосся у місці біопсії щільно вистригаємо ножицями. Гоління не застосовуємо, щоб уникнути травмування епідермісу. Після цього гострокінцевим скальпелем вирізаємо шматочок шкіри прямокутної форми розміром 0,8х1,2см на глибину до гіподерми. При взятті біоптата його прямокутник орієнтуємо так, щоб більша сторона проходила паралельно повздовжній від тіла, співпадаючи з напрямком росту волосся. Це в значній частині полегшує правильну орієнтацію проби шкіри при виготовленні гістологічних зрізів. Шматочок шкіри, що вирізали, перед фіксацією поміщаємо дермою на фільтрувальний папір для кращого збереження форми. На місці біопсії на шкіру накладаємо 2...3 шви поліамідом №3/0, голка 20мм. Шви загоюються за первинним натягом без ускладнень, знімаються на 7...8 день. Відібрані шматочки шкіри фіксуємо у 10% нейтральному розчині формаліну. Об'єм фіксуючої рідини повинен в 15... 20 разів перевищувати об'єм шматочків, що фіксуються. Фіксацію проводимо при кімнатній температурі. Після фіксації промиваємо звичайною водопровідною водою. Відмивку у проточній воді проводимо у фарфоровому ситі, або багаточисельними (10...12 разів за добу) змінами великих об'ємів водопровідної води. Після промивання проби шкіри перед зневодженням проводимо орієнтування зразку. Це робимо під моно- або бінокулярним мікроскопом. Шматочок шкіри кладемо вверх шерстю і визначаємо напрямок її росту. Потім скальпелем зрізаємо шматочки в напрямку росту шерсті; на боковому перерізі визначаємо напрямок майбутнього зрізу. Проби тканини, повністю зневоднюємо у спиртах зростаючої концентрації (60... 70°, 80°, 90° та 100°). Об'єм спирту повинен у 50...100 разів перевищувати об'єм шматочків. У спиртах низької концентрації (60°) шматочки витримуємо по 2...4 години, а у спиртах більш високій концентрації по 12...24 години. Проводимо заливку у парафін за наступною схемою: анілін - 1...2 доби, хлороформ - 3год., суміш хлороформ-парафін 1:1-1год., I парафін 45 хв. при 56°C, II парафін 45хв. при 56°C. При підготуванні до нарізки парафінового блоку його готуємо таким чином, щоб у площині розрізу об'єкт був окреслений шаром парафіну 2-3мм і мав прямокутну форму. При нарізці шкіри блок орієнтуємо таким чином, щоб ніж спочатку захоплював цибулину волосу, а в кінці його стрижень; іншим чином, блок обертаємо до леза ножа дермою або підшкірною клітковиною, але не епідермісом. У протилежному випадку зріз буде дуже пошкодженим. Зрізи знімаємо з леза ножа плоским пензликком, змоченим у дистильованій воді або 30° спирті. Потім зрізи наклеюємо на скло, і після повного висушування перед фарбуванням піддаємо депарафінуванню у ксілолі; після розчинення парафіну переносимо у 96°, і 70° спирти (по 1...2хв.) і, наприкінці, у дистильовану воду (2...3хв.). Для постановки діагнозу та виявлення важкості запального процесу достатньо фарбування звичайними барвниками: гематоксиліном Караці та еозином. Хід фарбування: доведенні до дистильованої води парафінові зрізи поміщаємо у розчин гематоксиліну Караці на 2-10хв., потім промиваємо зрізи у проточній воді 10хв., тут вони повинні посиніти. Поміщаємо на 1 хв. у 1% розчин еозину. Ретельно промиваємо у дистильованій воді, зневоджуємо у спиртах, просвітлюємо у толуолі, потім заключаємо у бальзам. В результаті ядра клітин зафарбовуються у інтенсивно синій колір, цитоплазма рожева різних відтінків, колаген світлий, рожево-червоний, м'язи рожево-червоні, еритроцити - помаранчово-червоні. Дорослі особи демодексу зафарбовуються у різні відтінки червоного кольору: від блідо-рожевого до інтенсивно червоного. Яйця та личинки зафарбовуються у сірий колір.

Спосіб діагностики демодекозу собак шляхом біопсії шкіри дозволяє виявити хворобу у 100% випадків. Крім цього, він дозволяє також оцінити стан шкіри, важкість її ураження, і внаслідок цього дозволяє призначити не тільки адекватну акарицидну, але й патогенетичну терапію.