



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 3489

(13) U

(51) 7 G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ЛИЧИНОК NIPPOSTRONGYLUS BRAZILIENSIS

1

2

(21) 2004031946

(22) 16.03.2004

(24) 15.11.2004

(46) 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.

(72) Веселий Віктор Анатолійович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб культивування личинок *Nippostrongylus braziliensis* з використанням фунгіциду, який **відрізняється** тим, що як фунгіцид використовують 0,5 %-ий водний розчин ністатину.

Корисна модель, що передбачається відноситься до ветеринарії, а саме до способів культивування личинок гельмінтів *Nippostrongylus braziliensis* з подальшим використанням їх у якості експериментальної моделі на білих щурах.

Nippostrongylus braziliensis (Travassos, 1914) відносять до підзарону Strongilata, надсімейству Trihostrongiloidea, сімейству Heligmostomatidae, підсімейству Heligmostomatinae, рід *Nippostrongylus*. Існує декілька синонімів цього гельмінта: *Heligmosomum muris* (Yokogama, 1920), *Nippostrongylus muris* (Yokogama, 1920, Lane, 1923), *Strongylus spirillum* Lutz (Travassos, 1921).

У природних умовах хазяями ніппостронгілюсів є пацюк *Rattus norvegicus*, чорний щур *Rattus rattus*, американська миша *Peromyscus maniculatus*, місце локалізації тонкий кишечник. (Астафьев Б. А., Яроцкий Л. С., Лебедева М. Н. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине. - М.: Наука, 1989).

Прототипом запропонованого нами способу є метод культивування личинок ніппостронгілюсів розроблений Корнвеллом та модифікований А.І.Кротовим. (Кротов А. И. Методы моделирования и экспериментальной терапии гельминтов // Биохимия и физиология гельминтов и иммунитет при гельминтозах / Тр. ГЕЛАН СССР. - М, 1984. - Т. 32. - С. 48-68).

Кал щурят (донорів) з 9-го по 15-й день після зараження личинками *Nippostrongylus braziliensis*, що зміщує в тонкому мазку не менше 2-7 яєць паразитів в полі зору мікроскопу при збільшенні 7×8, зволожують 0,1%-ним розчином саліциламідю, виготовленому на дехлорованій воді для попередження росту плісені, і змішують з рівною кількістю активованого вугілля. Цю сметаноподібну за консистенцією масу наносять на круг фільтрувального

паперу діаметром 8,5см. Товщина нанесеного шару вказаної суміші не повинна перевищувати 0,5см, а краї фільтрувального паперу у вигляді кільця завширшки 1см, повинні лишатись вільними. Потім цей папір розміщують у чашку Петрі, на дно якої попередньо укладають зволожену губку, або інший вологоємкий матеріал. Чашку Петрі накривають кришкою і поміщують у термостат при температурі 27-28°C. Культуру щоденно зволожують дехлорованою водопровідною водою. В цих умовах більшість личинок виходить із яєць через 16-18 годин. З третьої доби культивування личинки починають збиратись на краю фільтрувального паперу. Найбільша їх кількість скупчується тут на 8-му добу. Потім більшість личинок переходять на дно чашки Петрі. Тому на 8-му добу від початку культивування краї фільтрувального паперу обрізають і розміщують для збору личинок в апарат Бермана на дрібне сито. В 0,7%-му розчині натрію хлориду при кімнатній температурі (17-20°C) личинки виділяються протягом доби. Після цього личинок промивають 0,85%-ним розчином натрію хлориду, осаджуючи їх центрифугуванням при 1500-2000 обертів за хвилину; цю процедуру повторюють 2-3 рази. При цьому частково видаляються калові та інші домішки.

Недоліком цього способу є те, що при культивуванні личинок ніппостронгілюсів за приведеним вище методом реєстрували інтенсивний ріст плісені на поверхні суміші калу з активованим вугіллям та фільтрувальному папері, що перешкоджало пересуванню личинок на край паперу і знижувало життєздатність та загальну кількість отриманих личинок.

В основу корисної моделі, що передбачається, поставлено задачу розробити спосіб культивуван-

(13) U

(11) 3489

(19) UA

ня личинок *Nippostrongylus braziliensis* шляхом використання як фунгіциду 0,5% водного розчину ністатину для зволоження фекалій щурів, щоб запобігти розвитку плісень та забезпечити ефективність способу культивування.

Приклад 1. Перед початком культивування термостат, всі інструменти, які використовували при роботі: пінцети, шпателі, чашки Петрі, порошкову губку піддавали обов'язковій стерилізації.

Відібраний від щурят "донорів" кал, ретельно перемішавши, розділяли на чотири рівні частини.

Першу зволожували 0,1 % розчином саліциламідів на дехлорованій водопровідній воді, а три інші розчином ністатину відповідно у 0,1%, 0,3% та 0,5% концентраціях. Далі культивування продовжували за вище зазначеним методом, під час якого фіксували термін появи плісняви. По завершенні культивування проводили підрахунок кількості личинок, отриманих окремо з чашок в залежності від використаного фунгіциду (табл.1).

Таблиця 1

Кількість чашок	Концентрація фунгіциду %	Дні спостережень Кількість чашок з пліснявою							Кількість отриманих личинок
		1	2	3	4	5	6	7	
10	ністатин 0,5	0	0	0	0	0	0	0	1546
10	ністатин 0,3	0	0	0	0	2	3	3	1313
10	ністатин 0,1	0	0	1	1	3	4	4	1177
10	саліциламід 0,1	0	0	2	3	5	5	7	918

Таким чином слід зазначити, що з випробуваннями різних концентрацій ністатину найкращий ефект отриманий при застосуванні 0,5% розчину, у калі зволоженому саліциламідом і розчином ністатину у концентрації 0,1% та ністатину 0,3%, починаючи з третьої і п'ятої доби культивування почала з'являтися пліснява, що відповідним чином позначилось на кількості отриманих личинок.

Зміна фунгіциду при культивуванні личинок ніппостронгілюсів могла вплинути на їх інвазійну здатність. Тому по закінченні строку культивування, інвазійність отриманих личинок перевіряли

шляхом зараження білих щурів з подальшим визначенням інтенсивності інвазії.

Приклад 2. Для зараження було використано 6 білих щурят масою 40-50г. Зараження проводили методом підшкірної ін'єкції в ділянці холки, у об'ємі суспензії 0,3см³ і дозі 300 личинок на голову.

Через вісім діб після зараження білих щурів евтаназували за слабого ефірного наркозу, піддавали розтину, діставали тонкий кишечник в яком підраховували кількість статевозрілих ніппостронгілюсів (табл. 2).

Таблиця 2

№ тварин	Кіл-ть личинок, екз.	Концентрація фунгіциду, %	Личинки, що прижилися,	
			M+m	%
1	300	ністатин 0,5	67,0±5,5	22,3
2	300			
3	300			
4	300	саліциламід 0,1	61,7±6,3	20,5
5	300			
6	300			

Застосування ністатину замість саліциламідів не впливало на інвазійність личинок ніппостронгілюсів.

Спосіб культивування личинок гельмінтів роду *Nippostrongylus* з використанням 0,5% розчину ністатину, є ефективним для запобігання росту плісняви, що забезпечує отримання більшої кількості інвазійних личинок.