



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **60180** (13) **U**
(51) **МПК**
C12M 3/10 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ЛИЧИНОК ГЕЛЬМІНТІВ У ТВАРИН

1

(21) u201014576

(22) 06.12.2010

(24) 10.06.2011

(46) 10.06.2011, Бюл.№ 11, 2011 р.

(72) КОРЧАН ЛЕОНІД МИКОЛАЙОВИЧ, ПРИХОДЬКО ОЛЕНА ЮРІЇВНА, ПРИХОДЬКО ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, КОРЧАН МИКОЛА ІВАНОВИЧ

(73) КОРЧАН ЛЕОНІД МИКОЛАЙОВИЧ, ПРИХОДЬКО ОЛЕНА ЮРІЇВНА, ПРИХОДЬКО ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, КОРЧАН МИКОЛА ІВАНОВИЧ

2

(57) Спосіб культивування личинок гельмінтів у тварин, що включає їх культивування, виділення та підрахунок, який **відрізняється** тим, що для вирощування личинок використовують комплект двох поліпропіленових стаканчиків, додатково фекалії зволожують 0,1 % водним розчином стрептоциду, виділення личинок проводять без перенесення проб фекалій, а облік личинок гельмінтів здійснюють з використанням лічильної камери.

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме до паразитології та інвазійних хвороб тварин. Може бути використана для прижиттєвої діагностики деяких гельмінтозів у тварин.

Прижиттєва діагностика різноманітних стронгілятозів дрібної та великої рогатої худоби, коней і інших видів тварин методами гельмінтоовоскопії (виявлення яєць гельмінтів) не дає надійних результатів, так як яйця більшості нематод підряду Strongylata мають досить подібну морфологічну будову і приблизно однаковий розмір. Тому для прижиттєвої діагностики стронгілятозів тварин рекомендують використовувати гельмінтоларвоскопічні методи (виявлення личинок паразитів). Для цього необхідно з яєць стронгілят за сприятливих умов виростити личинки інвазійної стадії й за особливостями морфологічних ознак їх тіла визначити збудника.

Культивування личинок проводять за способами Петрова А.М. і Гагаріна В.Г.; Акуліна Н.А.; Величкіна П.А.; Попової Г.І.; Нікітіна В. та Павласика І.; Пономаря С.І. і Сороки Н.М. та ін.. (Орлов Ф.М. Ветеринарная лабораторная практика / Ф.М.Орлов. - М.: Сельхозиздат, 1963. - Т.2. - С.219-220; Рекомендації щодо гельмінтологічних досліджень тварин / Пономар С.І., Сорока Н.М., Литвиненко О.П. та ін. - Біла Церква, 2008. - С.20-23; Дахно І.С., Дахно Ю.І. Екологічна гельмінтологія: навчальний посібник / Дахно І.С., Дахно Ю.І. - Суми: Козацький вал, ВАТ "Сумська обласна друкарня", 2010. - С.94-97).

Найбільш простим, поширеним та близьким до запропонованого являється спосіб культивування личинок у тварин за Петровим А.М. і Гагаріним В.Г., який здійснюється наступним чином. Пробу фекалій (10 г) кладуть у склянки або чашки Петрі, злегка зволожують, закривають кришкою і ставлять у термостат при температурі 25-30°C на 7-10 днів.

Кожного дня склянки чи чашки Петрі відкривають для аерації яєць і зволоження фекалій. За цей період у яйцях розвиваються личинки гельмінтів та виходять із яйцевих оболонок. Через 7-10 днів проби фекалій переносять на 4-6 годин у апарат Бермана. Личинки виходять із фекалій і опускаються на дно гумової трубки до перекриття її затискачем. Якщо на нижньому кінці гумової трубки знаходиться пробірка замість затискача, то личинки опускаються на дно пробірки. Осад з личинками гельмінтів переносять на предметне скло і проводять мікроскопічне дослідження. У личинок вивчають морфологічні особливості - величину, форму і кількість кишкових клітин, форму й величину хвостового кінця без чохла та в чохлах.

Проте, цей відомий спосіб культивування личинок гельмінтів має ряд недоліків, пов'язаних з тим, що при надмірному зволоженні проб фекалій у склянках вода не встигає випаровуватись і створюються умови для гниття, що пригнічує розвиток личинок. При тривалому зануренні фекалій у воду утворюється досить густа їх суспензія, що ускладнює проведення огляду препарату і об'єктивного підрахунку личинок при мікроскопії осаду. За висо-

(13) **U**(11) **60180**(19) **UA**

кої вологості і постійного температурного режиму в термостаті виникають сприятливі умови для розвитку різноманітних бактерій і грибків ("плісняви"), які можуть затримувати розвиток яєць і створювати небезпеку для довкілля й дослідника. Крім того, відомий метод культивування личинок потребує трудомістких робіт по монтуванню для кожної проби фекалій апарату Бермана та значних матеріальних затрат. При перенесенні проб фекалій зі склянок у апарат Бермана можлива втрата личинок і забруднення довкілля.

Відомий метод також має ненадійний спосіб обліку личинок, оскільки при середній і високій інтенсивності інвазії виникають труднощі в процесі їх підрахунку на предметному або часовому склі, бактеріологічних чашках під покривним склом або у краплі осаду. Вони полягають у затраті значного часу для максимального огляду приготовлених препаратів і можливого повторного вивчення однієї й тієї ж ділянки, тобто проводиться орієнтовний облік інтенсивності інвазії.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб культивування личинок гельмінтів у тварин, шляхом удосконалення відомого способу досягти можливості отримання більш чистої культури личинок, здатності відділяти личинки окремих видів гельмінтів, уникнути використання складного і дорогого обладнання, значних затрат часу для проведення досліджень, забезпечити надійну санітарну безпечність довкілля й дослідника та підвищити ступінь достовірності результатів дослідження.

Поставлену задачу вирішують створенням способу культивування личинок гельмінтів у тварин, що включає культивування, виділення і підрахунок личинок, який, згідно корисної моделі, відрізняється тим, що вирощування личинок проводять у спеціальному комплекті двох поліпропіленових стаканчиків, додатково фекалії зволожують 0,1% водним розчином стрептоциду, виділення личинок здійснюють без перенесення проб фекалій, а для їх підрахунку використовують лічильну камеру для гельмінтоларвоскопічних досліджень.

Запропонований спосіб культивування личинок у тварин здійснюється наступним чином.

Беруть комплект звичайних, бажано прозорих, поліпропіленових стандартних стаканчиків для гарячих і холодних продуктів об'ємом 100-150мл із внутрішнім діаметром дна 4-4,5см. Кожний комплект складається з зовнішнього і внутрішнього стаканчиків. На дні внутрішнього стаканчика роблять дрібні отвори діаметром 0,8мм (сітку).

На дно внутрішнього стаканчика розміщують одним шаром досліджувану пробу фекалій (5г) і опускають його в зовнішній стаканчик на відстані 1,5см від його дна. Такий рівень занурення стаканів фіксується металевою паличкою (голкою від одноразового шприца), вставленою в стінку відповідної висоти внутрішнього стаканчика.

Пробу фекалій і стінки внутрішнього стаканчика зволожують (можна користуватися побутовим розпилювачем) 0,1% водним розчином стрептоциду. Така концентрація розчину стрептоциду не знижує життєздатність яєць гельмінтів, не вбиває личинок, що вилуплюються з них та попереджує

розвиток різноманітних бактерій і грибків, які можуть затримувати розвиток яєць і створювати небезпеку для довкілля й дослідника. Зайва рідина просочується крізь сітку внутрішнього стаканчика у зовнішній, який слугує резервуаром для підтримання вологості фекалій за інкубації в термостаті.

Для стандартизування температурного режиму в різні періоди року і в різних умовах лабораторії, стаканчики з досліджуваними пробами ставлять у термостат, інкубація за температури $27\pm 1^{\circ}\text{C}$. Для забезпечення умов диференціювання личинок до інвазійної стадії фекалії жуйних тварин і коней культивують 10-14 днів, собак - 10 днів, свиней - 4 дні (з урахуванням терміну розвитку личинок стронгілат та рабдитат різних видів до інвазійної стадії).

Щоденно проби виймають із термостату, злегка зволожують розчином стрептоциду і проводять їх аерацію протягом 30 хвилин (витримують поза термостатом). Раз у три дні фекалії обережно перевертають скляною паличкою.

У випадку забруднення рідини у зовнішньому стакані, її можна замінити, попередньо перевірив у ній вміст і стадійність розвитку личинок гельмінтів.

Після закінчення терміну культивування для виділення личинок в зовнішній стаканчик доливають до 30,0мл теплої води (40°C). Внутрішній стаканчик опускають у зовнішній до тих пір, щоб розкладений шар фекалій лише стикався із теплою водою, а не занурювався в неї. Такий рівень занурення фекалій у теплу воду фіксується металевою паличкою (голкою від одноразового шприца) вставленою в стінку відповідної висоти внутрішнього стаканчика. Дослідні проби ставлять у термостат ($40\pm 1^{\circ}\text{C}$) і витримують протягом двох годин. За цей час внаслідок підсихання верхньої й зволоження нижньої частин фекалій, личинки переходять в активний стан і мігрують у теплу воду. Вони не здатні плавати й осідають на дно зовнішнього стаканчика.

Через дві години внутрішній стаканчик обережно виймають. Половину об'єму води із зовнішнього стаканчика виливають у першу центрифужну пробірку, а залишок рідини змішують із осадом і виливають у другу центрифужну пробірку. Для запобігання втрати личинок дно зовнішнього стаканчика ополіскують чистою водою першої пробірки. Пробірки центрифугують при 1000об./хв. протягом двох хвилин. Потім рідину із пробірок відбирають, а осад ресуспендують в 1мл надосадкової рідини, розносять по коміркам запропонованої нами лічильної камери для гельмінтоларвоскопічних досліджень (Пат. 25476 Україна, МПК C12M3/00. Камера для гельмінтоларвоскопічних досліджень / Корчан Л.М., Корчан М.І. Бородай А.Б. (UA). - №U200703576; заявл. 02.04.2007; опубл. 10.08.2007, бюл. №12/2007) і проводять мікроскопію (підрахунок личинок в 1мл суспензії, отриманої із 5г фекалій).

За високої інтенсивності інвазії (високої концентрації личинок гельмінтів) можна зробити більше розведення осаду личинок перед проведенням мікроскопії з наступним урахуванням його під час математичних підрахунків.

Таким чином, запропонований спосіб культивування личинок гельмінтів у тварин досить ефективний. Точність дослідження запропонованим способом обумовлена в більшості стандартизацією проведених у ньому дій, має надійний і простий кількісний облік личинок у пробі або в 1г досліджуваних фекалій при середній і високій інтенсивності інвазії з використанням лічильної камери. Його використання не потребує складного обладнання й значних затрат часу для дослідження, сприяє

більшій санітарній безпечності, попереджує розвиток різноманітних бактерій і грибків, які можуть затримувати розвиток яєць та створювати небезпеку для довкілля й дослідника. Спосіб також дає можливість отримати чистішу культуру личинок, що полегшує проведення її мікроскопії; відділяти, за необхідності, личинок окремих видів гельмінтів. Все це значно сприяє підвищенню ефективності лікування тварин, удосконаленню проведення основних протипаразитарних заходів.