



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **76434**

(13) **U**

(51) МПК

C12M 3/10 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 05425**

(22) Дата подання заявки: **03.05.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.01.2013**

(46) Публікація відомостей **10.01.2013, Бюл.№ 1**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Баран Володимир Іванович (UA),
Приходько Юрій Олександрович (UA)**

(73) Власник(и):

**ХАРКІВСЬКА ДЕРЖАВНА
ЗООВЕТЕРИНАРНА АКАДЕМІЯ,
п.в. М. Данилівка, Дергачівський р-н,
Харківська обл., 62341 (UA)**

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ЯЄЦЬ TRICHURIS MURIS

(57) Реферат:

Спосіб культивування яєць гельмінтів *Trichuris muris* належить до ветеринарії. Спосіб культивування яєць гельмінтів проводять шляхом застосування нового фунгіцидного препарату тербінафіну у концентрації 1 % забезпечує отримання необхідної кількості життєздатної інвазійної культури яєць трихурисів, не потребує економічних витрат.

UA 76434 U

Корисна модель належить до ветеринарії, а саме до способів культивування яєць гельмінтів з метою отримання лабораторної моделі для випробування ефективності антигельмінтних препаратів.

Експериментальні моделі паразитозів мають багато призначень. Вони дозволяють вирішити теоретичні і та прикладні у різних областях паразитологічної науки і медично-ветеринарної практики. Моделювання та лабораторних тваринах досліди *in vitro* дозволяють швидко і правильно отримати вірогідні результати експерименту. Обов'язковою умовою є використання експериментальних моделей паразитозу при розробці методів діагностики, хіміотерапії гельмінтозів, скринінгу та вивчення антгельмінтиків.

Однією із економічних та простою у відтворенні експериментальною моделлю є трихуроз мишей, збудником якого є *Trichuris muris*. Schrank, 1788. Але для відтворення моделі трихурозу необхідно отримати певну кількість інвазійних яєць гельмінту, що потребує удосконалення методики культивування яєць *Trichuris muris*.

Існують способи культивування яєць трихурисів, за допомогою яких відбувається накопичення інвазійної маси.

Так, є спосіб культивування яєць *Trichuris muris* згідно з методикою, описаною у посібнику [Б.А. Астафьев, Л.С. Яроцкий, М.Н. Лебедева - М.: Наука, 1989, 280 с.]. Спочатку необхідно отримати інвазійний матеріал. Яйця гельмінтів отримували із фекалій інвазованих збудником *Trichuris muris* мишей флотаційно - центрифужним методом. Для цього використовували насичений розчин повареної солі (в 1000 мл води розчиняють 400 г NaCl). Фекалії ретельно розмішують у цьому розчині у співвідношенні 1:10. Отриману суміш розливають у центрифужні пробірки і центрифугують впродовж 5-7 хвилин зі швидкістю 1500 обертів/хв. Яйця, що піднялися, разом з поверхневою плівкою знімають металевою петлею і струшують у стаканчик з дистильованою водою. Яйця, що осідають на дно 7-8 разів промивають, переносять на годинникове скло, яке поміщають у чашку Петрі (для створення умов вологої камери) для проведення подальшого культивування за температури 29 °С. Згідно з цією методикою автори для запобігання росту міцелію плісневих грибів у середовищі для культивування яєць трихурисів використовували 2 % розчин соляної кислоти. Слід зазначити, що у наших дослідах застосування 2 % розчину соляної кислоти не завжди сприяло профілактиці розростання міцелію пліснявих грибів під час культивування. При цьому способі отримані інвазійні яйця трихурисів приблизно до 40 % яєць не досягали інвазійної стадії, а в останніх (60 %) розвиток рухливої личинки реєстрували через 35 діб з початку культивування.

Існує спосіб культивування яєць трихурисів за методикою А.І. Кротова [А.И. Кротов - М.: Медицина, 1973, 272 с.]. Для виділення яєць також використовували флотаційно - центрифужний метод з використанням насиченого розчину повареної солі. Метод заснований на використанні при культивуванні яєць протигрибкового препарату - ністатину у 1 % концентрації. Але введення суспензії ністатину у культуру яєць *Trichuris muris* не попереджало розростання міцелію гриба і спричиняло загибель культури яєць.

Є модифікація, запропонована Т.К. Конопльовою, А.І. Кротовим (1984), для культивування яєць гангулетеракісів та трихурисів [Котельников Г.А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды - М., 1984, 53 с.]. Яйця гельмінтів отримували флотаційно-центрифужним методом з використанням розчину нітрату амонію (NH_4NO_3), який забезпечує більший вихід яєць трихурисів, ніж при використанні насиченого розчину солі (питома вага розчину нітрату амонію вища порівняно з насиченим розчином натрію хлориду, що забезпечує спливання більшої маси яєць на поверхню цього розчину). Для запобігання росту міцелію плісневих грибів під час культивування використовували 2 % розчин ністатину. Цей спосіб може бути прототипом. Але культивування яєць *Trichuris muris* повинно відбуватися за умов використання іншого фунгіцидного препарату.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб культивування яєць гельмінтів *Trichuris muris* шляхом застосування нового фунгіцидного препарату тербінафіну, що дає змогу забезпечити отримання необхідної кількості життєздатної інвазійної культури яєць урисівал.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі культивування яєць гельмінтів, який включає спочатку виділення яєць гельмінту *Trichuris muris* з калу мишей за допомогою флотаційно-центрифужного методу з використанням розчину нітрату амонію (гранульована аміачної селітри); або при вилученні їх із маток самиць статевозрілих гельмінтів, яких отримували із кишечника мишей, експериментально інвазованих яйцями трихурисів, згідно з запропонованою моделлю, для подальшого культивування замість рекомендованих у методиках протигрибкових препаратів соляної кислоти та ністатину застосовується 1 % розчин тербінафіну.

Приклад конкретного виконання

Проводять відбір проб калу для дослідження у поліетиленові пакети, розміром 5×7 см. Із загальної проби калу беруть наважку масою 1 г та переносять у склянку, додають 30 см³ дистильованої води та ретельно перемішують скляною палицею. Загальний об'єм поступово доводять до 50 см³. Завись фільтрують через подвійне ситечко в іншу склянку. Потім завись переносять в центрифугальну склянку, додають розчин нітрату амонію та центрифугують 10 хвилин при 1000 об./хв. Яйця, що знаходяться у поверхневій плівці збирають скляною піпеткою, переносять у чашку Петрі, промивають 2-3 рази стерильним фізіологічним розчином, та переносять на годинникові скельця для подальшого культивування. Другим способом отримання яєць *Trichuris muris* було вилучення їх із маток самиць статевозрілих гельмінтів, що отримували із кишечника мишей, експериментально інвазованих яйцями трихурисів. Евтаназію тварин здійснювали згідно з правилами етичних норм (передозування за слабого ефірного наркозу). Самиць нематод поміщали у стерильний фізіологічний розчин та декілька разів відмивали від вмісту кишечника. Потім самиць переносили у ступку з фізіологічним розчином і обережно розтирали для вилучення яєць з рогів матки. Залишки матки і її роги видаляли, заливаючи стерильним фізіологічним розчином, давали відстоятись 15 хвилин для осідання яєць на дно чашки. Надосадову рідину відбирали і замінювали новою. Цю процедуру повторювали 3-4 рази до повного просвітлення рідини і видалення всіх залишених частинок матки. Отриману чисту осаджену культуру яєць заливали стерильним фізіологічним розчином, який покривав культуру не більше ніж на 2 мм. Підрахування яєць гельмінтів проводять за допомогою мікроскопу при збільшенні 7×8.

Перед початком культивування термостат, Інструменти (скальпелі, пінцети, лопатки, ножиці), чашки Петрі і фізіологічний розчин піддавали обов'язковій стерилізації. Отриману культуру яєць *Trichuris muris* розміщували на годинникові скельця у чашках Петрі в умовах вологої камери по 500±10 яєць у кожній. Заливали стерильним фізіологічним розчином, який покривав культуру не більше ніж на 2 мм. У кожну чашку додавали по 2 краплі розчину тербінафіну 1 % концентрації з інтервалом 6 діб до закінчення строку розвитку яєць. Щоденно культура підлягала аерації впродовж однієї години і один раз у 2-3 доби здійснювали спостереження за процесом розвитку яєць під мікроскопом. Культивування вели в термостаті за температури +30 °С. Наявність перших рухливих личинок у культурі яєць *Trichuris muris* реєстрували на 12 добу з початку культивування, а до 25 доби їх кількість становила 80 %,

Приклад. Культивування яєць *Trichuris muris* в лабораторних умовах, отриманих від мишей-донорів. Відбір проби калу проводили на 40 добу після експериментального зараження мишей у поліетиленовий пакет розміром 5×7 см. Пробу калу перемішали та наважку калу масою 1 г перенесли у склянку, залили 30 см³ дистильованої води, ретельно перемішали скляною палицею та довели загальний об'єм до 50 см³. Профільтрували завись через подвійне ситечко в іншу склянку. Перенесли завись в центрифугальну пробірку, процентрифугували 10 хвилин при 1000 об./хв. Поверхневу рідину зібрали скляною піпеткою, перенесли у чашку Петрі, 2-3 рази відмили. Пробу мікроскопували при збільшенні 7×8, підраховуючи кількість яєць гельмінту *Trichuris muris*. Пробу яєць перенесли на годинникові скельця по 500±10 яєць у кожній, які розмістили у чашках Петрі в умовах вологої камери (додали на дно чашки 5 см³ дистильованої води). Додали стерильного фізіологічного розчину, який покривав культуру не більше ніж на 2 мм та по 2 краплі розчину тербінафіну 1 % концентрації з інтервалом 6 діб впродовж 30 діб і розмістили у термостаті за температури +30 °С. Аерацію культури здійснювали щоденно впродовж однієї годин з контролем за розвитком яєць один раз за 2-3 доби. На 12-13 добу реєстрували появу 25 % рухливих личинок у культурі яєць *Trichuris muris*, а на 28-30 добу їх кількість сягала 83-90 %. Яйця бочкоподібної форми, коричневого кольору, з пробками на обох полюсах, розмір яєць 0,0594×0,032 мм.

Таким чином спосіб культивування яєць гельмінтів *Trichuris muris* шляхом застосування нового фунгіцидного препарату тербінафіну у концентрації 1 % дає змогу забезпечити отримання необхідної кількості життєздатної інвазійної культури яєць трихурисів, є відносно швидким та не потребує великих економічних витрат.

Список джерел:

1. Астафьев Б.А., Яроцкий Л.С., Лебедева М.Н. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине. - М.: Наука, 1989. - 280 с.
2. Кротов А.И. Основы экспериментальной терапии гельминтозов. - М.: Медицина, 1973. - 272 с.
3. Вязов О.Е. Лабораторные методы получения возбудителей гельминтозов. - М.: Медицина, 1997. - 234 с.

4. Котельников Г.А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды - М., 1984. - 53 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб культивування яєць гельмінтів, який включає спочатку виділення яєць гельмінту *Trichuris muris* з калу мишей за допомогою флотаційно - центрифужного методу з використанням розчину нітрату амонію (гранульована аміачної селітри); або при вилученні їх із маток самиць статевозрілих гельмінтів, яких отримували із кишечника мишей, експериментально інвазованих

10

яйцями трихурисів, який **відрізняється** тим, що для подальшого культивування замість рекомендованих у методиках протигрибкових препаратів соляної кислоти та ністатину застосовують 1 % розчин тербінафіну.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601