



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112615** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61B 5/0275 (2006.01)
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 06146	(72) Винахідник(и): Бойко Олександра Олександрівна (UA), Дуда Юлія Вікторівна (UA), Бригадиренко Віктор Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.06.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.12.2016	(73) Власник(и): Бойко Олександра Олександрівна, вул. Будьонного, 43, к. 76, м. Дніпропетровськ, 49102 (UA), Дуда Юлія Вікторівна, вул. Коробова, 24, к. 38, м. Дніпропетровськ, 49099 (UA), Бригадиренко Віктор Васильович, вул. Флангова, 7, к. 2, м. Дніпропетровськ, 49035 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.12.2016, Бюл.№ 24	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЛИЧИНОК НЕМАТОД НАЕМОНCHUS CONTORTUS, MULLERIUS SP. І STRONGYLOIDES PAPILLOSUS

(57) Реферат:

Спосіб визначення личинок нематод *Haemonchus contortus*, *Mullerius sp.* і *Strongyloides papillosus* включає їх морфологічні особливості. Проводять контрастне забарвлювання кутикули личинок з використанням діамантового синього, метиленового синього, діамантового зеленого, фуксину Циля, розчину Люголя (за умов нагрівання препаратів та без температурної фіксації).

UA 112615 U

Корисна модель стосується біології та ветеринарії, вона може бути використана як експрес-діагностика личинок нематод *Haemonchus contortus* (Rundolphi, 1803), *Strongyloides papillosus* (Wedl, 1856) і *Mullerius* sp. без знерухомлення формаліном або спиртом, скорочуючи час на їх визначення.

- 5 Морфологічні особливості гельмінтів не завжди чітко проглядаються, тому іноді до препаратів додають різні розчини барвників. Використовують розчин Люголя (Dancescu P., Mahjoub M. 1981. Identification of nematode larvae by coal cultures in closed boxes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 838.; Devaney J.A., Craig T.M., Rowe L.D., Wade C, Miller D.K. 1992. Effects of low levels of lice and internal nematodes on weight gain and blood parameters in calves in Central Texas. J. Econ. Entomol. 85: 144-149., Amarante A.F.T., Craig T.M., Ramsey W.S., El-Sayed N.M., Desouki A.Y., Bazer F.W. 1999. Comparison of naturally acquired parasite burdens among Florida Native, Rambouillet and crossbreed ewes. Vet. Parasitol. 85: 61-69., McMurtry L.W., Donaghy M.J., Vlassoff A., Douch P.G.C. 2000. Distinguishing morphological features of the third larval stage of ovine *Trichostrongylus* spp. Vet. Parasitol. 90: 73-81), забарвлювання ауromіном О (Afzal, A.S., Steven, L.B., 2001. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. Clinical Infectious Diseases, 33: 1040-1047), малахітовий зелений (Hastings R.J., Bosher J.E., 1938. A study of the pathogenicity of the meadow nematode and associated fungus *Cylindrocarpon radicola* Wr. Canadian Journal of Forest Research, 16: 225-229; Williams A.B., Stirling, G.R., Hayward, A.C., Perry, J., 1989. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). Journal of Applied Bacteriology, 67: 145-156), метиленовий синій (див. патент України на винахід № 43033 Спосіб діагностики життєздатності яєць нематод МПК (2009) C02F 1/46, C02F11/00. Опубл. 27.07.2009), фарбу Романовського-Гімзе (Martinez-Palomo, A., Martinez-Baez, M., 1977. Ultrastructure of the microfilaria of *Onchocerca volvulus* from Mexico. Journal of Parasitology, 63: 1007-1018; Kozek, W.J., Eberhard, M.L., Raccurt, C, 1983. Comparative morphology of *Mansonella ozzardi* microfilariae from Colombia and Haiti. A light microscope study. Tropical Medicine and Parasitology, 34: 33-37; Tocidowski, M.E., Spelman, L.H., Sumner, P.W., Stoskopf, M.K., 2000. Hematology and serum biochemistry parameters of North American river otters (*Lontra canadensis*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 31: 484-490; Egyed, Z., Sreter, T., Szell, Z., Beszteri, B., Oravec, O., Marialigeti, K., Varga, I., 2001. Morphologic and genetic characterization of *Onchocerca lupi* infecting dogs. Veterinary Parasitology, 102: 309-319). Недоліками цих методів є те, що барвники не використовують для диференціальної діагностики личинок нематод дихальної системи та шлунково-кишкового тракту.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30

Корисна модель порівняно з прототипами дозволить збільшити вибір кількості барвників та швидше проводити діагностику личинок нематод *H. contortus*, *S. papillosus* і *Mullerius* sp.

- 35 В основу корисної моделі поставлено задачу створення нових методів забарвлювання личинок нематод і визначення барвників, придатних для диференціальної діагностики *H. contortus*, *S. papillosus* і *Mullerius* sp. - одних із найпоширеніших паразитів ратичних тварин Європи.

- 40 Поставлена задача вирішується тим, що створено нові методи забарвлювання личинок нематод без знерухомлення формаліном або спиртом для скорочення часу на їх визначення.

В експерименті використовували личинок нематод *H. contortus*, *S. papillosus* і *Mullerius* sp. Личинок *H. contortus* третьої стадії та *S. papillosus* різних стадій розвитку культивували 8 діб за температури +25 °C, личинок *Mullerius* sp. збирали з екскрементів дрібної рогатої худоби.

- 45 Для їх забарвлювання брали 14 барвників: алізариновий червоний, діамантовий синій, розчин Тюрка, діамантовий зелений, метиленовий синій, амід чорний 10В, еозин, фуксин Циля, розчин Люголя, генціанвіолет, фарба за Романовським, судан, бромфеноловий синій, помаранчевий G. 0,1 мл розчину барвника додавали до 0,1 мл препарату з личинками нематод. Експерименти проводили без зміни температури препарату, а також із нагріванням предметного скла до +60 °C. Методика приготування барвників:

- 50 1) 1 % алізариновий червоний (0,1 г алізаринового червоного в 10 мл дистильованої води);
- 2) 1 % діамантовий синій (0,1 г діамантового синього в 10 мл дистильованої води);
- 3) розчин Тюрка (0,1 г метиленового синього у 3 % оцтовій кислоті);
- 4) 1 % діамантовий зелений (0,1 г діамантового зеленого в 10 мл 60 % етилового спирту);
- 5) 1 % метиленовий синій (0,1 г метиленового синього в 10 мл 60 % етилового спирту);
- 55 6) 1 % амід чорний 10В (0,1 г амід чорного 10В у 10 мл дистильованої води);
- 7) 1 % еозин (0,1 г еозину в 10 мл дистильованої води);
- 8) фуксин Циля (10 мл насиченого спиртового розчину фуксину, 90 мл 5 % карболової кислоти);
- 9) розчин Люголя (5 частин йоду, 10 частин йодиду калію та 85 частин води);
- 60 10) 1 % генціанвіолет (0,1 г генціанвіолету в 10 мл дистильованої води);

- 11) барвник за Романовським (0,1 % розчину Азура та 0,1 % розчину еозину);
- 12) 1 % судан (0,1 г судану в 10 мл дистильованої води);
- 13) 1 % бромфеноловий синій (0,1 г бромфенолового синього в 10 мл дистильованої води);
- 14) 1 % помаранчевий G (0,1 г помаранчевого G у 10 мл дистильованої води).

Результати досліджень без температурної фіксації показали різний ступінь забарвлювання алізариновим червоним, діамантовим синім, розчином Тюрка, діамантовим зеленим, метиленовим синім, амідом чорним 10В, еозином, фуксином Циля, розчином Люголя, генціанвіолетом, барвником за Романовським, суданом, бромфеноловим синім, помаранчевим G личинок *H. contortus*, *S. papillosus* і *Mullerius* sp. Стійкими до алізаринового червоного, діамантового синього, розчину Тюрка, амідом чорного 10В, еозину, генціанвіолету, барвника за Романовським, Судану, бромфенолового синього, помаранчевого G виявилися всі досліджувані види личинок нематод, їх покриви пропускали діамантовий зелений, метиленовий синій, фуксин Циля та розчин Люголя. При цьому забарвлювалися лише личинки *H. contortus*. Високий ступінь забарвлювання проявили діамантовий зелений, фуксин Циля та розчин Люголя. За використання діамантового зеленого личинки набули рівномірно зеленого забарвлення. Цей барвник проникав не тільки під чохлик, а й у кишечник, його клітини забарвлювалися інтенсивніше.

За фарбування фуксином Циля личинки набували рожевого кольору, клітини кишечника погано диференціювалися. За використання розчину Люголя личинки *H. contortus* забарвлювалися у світло-коричневий колір. При цьому чохлик та клітини кишечника за ступенем забарвлювання не розрізнялися.

Більш бліде забарвлення личинкам надавав метиленовий синій. На відміну від результатів попередніх експериментів цей барвник проникав тільки крізь чохлик личинки та надавав їй фіолетового відтінку. Каудальний кінець тіла *H. contortus* ставав темно-фіолетовим. Клітини кишечника личинок залишалися незабарвленими.

Використання діамантового зеленого не зменшує життєздатності личинок *H. contortus*, але дещо зменшує їх активність. Відмінні результати дали метиленовий синій, фуксин Циля та розчин Люголя: личинки знерухомлювалися, клітини їх кишечника ставали чітко помітними.

Покриви личинок *S. papillosus* і *Mullerius* sp. пропускали тільки розчин Люголя. Личинки *S. papillosus* забарвлювалися в яскраво-коричневий колір, їх стравохід та клітини кишечника стали темнішими, ніж інші ділянки тіла.

Личинки *Mullerius* sp. забарвлювалися у світло-коричневий колір, при цьому хвостовий кінець був світлішим, ніж кишечник і апікальний кінець тіла.

Для забарвлювання личинок із температурною фіксацією використано ті самі види нематод. Покриви личинок досліджених видів не пропускали розчин Тюрка, амідом чорний 10В, еозин, барвник за Романовським і помаранчевий G.

Високий ступінь фарбування в усіх досліджуваних видів показали метиленовий синій, фуксин Циля та розчин Люголя. Використання метиленового синього викликало дуже темне забарвлювання стравоходу та кишечника личинок *S. papillosus*. У личинок *Mullerius* sp. спостерігали рівномірне забарвлювання всього тіла в яскраво-синій колір (за винятком каудального кінця, який мав світліше забарвлення). Личинки *H. contortus* також рівномірно забарвлювалися в синій колір. При використанні фуксину Циля та розчину Люголя за підігріву препаратів всі личинки ставали яскраво-рожевими та коричневими, відповідно.

Інші результати показав барвник алізариновий червоний: личинки досліджуваних видів також однаково забарвлювалися, але з меншою інтенсивністю. Вони набували світло-рожевого відтінку. Інші барвники проникали через покриви личинок різною мірою. Личинки *Mullerius* sp. схильні до забарвлювання діамантовим синім за умов нагрівання: їх тіло рівномірно забарвлюється в яскраво-синій колір. Личинки *H. contortus* набувають світлішого забарвлення, але в них також рівномірно забарвлюється чохлик, стравохід та кишечник. У *S. papillosus* у світло-фіолетовий колір забарвлюється тільки стравохід та клітини кишечника.

В експерименті з діамантовим зеленим найяскравішого забарвлення набували *H. contortus* і *S. papillosus*. У *S. papillosus* при забарвлюванні чітко проявлявся яскраво-зелений колір усього тіла, темно-зелене забарвлення стравоходу та кишечника. Покриви личинок *Mullerius* sp. характеризуються меншою проникністю для даного барвника. За результатами забарвлювання личинки набували рівномірного блідо-зеленого забарвлення. Тіло личинок *H. contortus* рівномірно забарвлювалося в яскраво-зелений колір, апікальний і хвостовий кінці чохлика набували дещо світлішого забарвлення.

Подібні результати дало забарвлювання личинок бромфеноловим синім: найяскравішого забарвлення набували личинки *H. contortus* і *S. papillosus*. Максимальний ступінь забарвлювання спостерігали у *S. papillosus*. Покриви личинок *Mullerius* sp. також були чутливі до

цього барвника за умов підігріву препаратів, але ступінь їх забарвлювання був нижчим. У *Mullerius* sp. спостерігали нерівномірне забарвлення: в яскраво-синій колір забарвлювався тільки апікальний кінець личинки, інша частина тіла була блідо-блакитною.

Порівняно з попередніми барвниками, покриви личинок трьох досліджуваних видів нематод виявилися стійкішими до генціанвіолету. Тіло слабо забарвлювалося у фіолетовий відтінок. При цьому у личинок *S. papillosus* зареєстровано зміну забарвлення тільки навколо стравоходу та клітин кишечника, личинки *Mullerius* sp. набували рівномірного фіолетового відтінку, а у личинок *H. contortus* чохлик забарвлювався тільки навколо кишечника, хвостовий кінець не пропускав барвник.

Личинки *S. papillosus* на різних стадіях розвитку мають розміри, які істотно відрізняються. У перші декілька годин їх розмір відповідає розміру личинок нематод дихальних шляхів дрібної рогатої худоби - представників родини Protostrongylidae. Тому їх складно диференціювати за малого збільшення мікроскопа. Для ідентифікації личинок цих двох видів нематод можна використовувати розчин Люголя. При цьому змінювати температуру препарату не потрібно. Личинки *S. papillosus* рівномірно забарвлюються в коричневий колір, а личинки *Mullerius* sp. набувають світло-коричневого забарвлення.

Для диференціації личинок нематод травного тракту - представників рядів Strongylida (*H. contortus*) і Rhabditida (*S. papillosus*) - можна використовувати метиленовий синій, діамантовий зелений, фуксин Циля, розчин Люголя. Для визначення личинок досить скористатися одним із барвників. Забарвлювання цим способом не вимагає підігрівання препаратів.

Дані щодо використання діамантового синього для забарвлювання паразитичних об'єктів у літературі відсутні. За результатами наших досліджень нагрівання личинок ряду Strongylida (*H. contortus* і *Mullerius* sp.) із діамантовим синім надає їм яскраво-синього однотонного забарвлення, на відміну від личинкових стадій нематод ряду Rhabditida. Їх стравохід і кишечник має світло-фіолетовий відтінок. Додавання діамантового зеленого у препарат із *H. contortus* забарвлює їх без нагрівання у світло-зелений колір. Личинки *S. papillosus* і *Mullerius* sp. набувають зеленого забарвлення тільки за умов нагрівання.

Подібні результати показав експеримент із використанням метиленового синього. Його додавання у препарат без нагрівання зумовлювало забарвлення личинок *H. contortus*. За результатами нашого експерименту, личинки інших видів нематод дихальних шляхів також здатні забарвлюватися, але лише за умов нагрівання. Яскраво-синього забарвлення при цьому набувають личинки *Mullerius* sp. Даних щодо ідентифікації личинок *S. papillosus* за умов застосування метиленового синього в літературі також не виявлено.

Один із поширених барвників для нематод у світовій практиці - розчин Люголю. Він здатний забарвлювати личинок гельмінтів ряду Strongylida. Його часто використовують із метою поліпшення достовірності ідентифікації личинок. За результатами наших експериментів цей барвник надає личинкам *H. contortus*, *Mullerius* sp. і *S. papillosus* коричневого відтінку (при цьому нагрівання препарату не обов'язкове).

Фуксин Циля та генціанвіолет не використовуються для ідентифікації паразитів. У нашому експерименті фуксин Циля за умов нагрівання препаратів забарвлює *H. contortus*, *Mullerius* sp. і *S. papillosus* у рожевий колір.

Бромфеноловий синій часто використовується у зоопаразітології. Із метою ідентифікації паразитів тварин даний барвник не знайшов застосування. За нашими даними використання бромфенолового синього забарвлює личинок *H. contortus*, *Mullerius* sp. і *S. papillosus* тільки за умов підвищеної температури. *H. contortus* і *S. papillosus* набувають рівномірного яскраво-синього забарвлення. У личинок *Mullerius* sp. спостерігають такі результати забарвлювання тільки на апікальному кінці, інші частини тіла личинок стають блідо-блакитними.

Таблиця 1

Результати забарвлювання личинок нематод

Барвник	без температурної фіксації			із температурною фіксацією		
	<i>H. contortus</i>	<i>S. papillosus</i>	<i>Mullerius</i> sp.	<i>H. contortus</i>	<i>S. papillosus</i>	<i>Mullerius</i> sp.
Алізариновий червоний	-	-	-	++	++	++
Діамантовий синій	-	-	-	++	+	+++
Розчин Тюрка	-	-	-	-	-	-
Діамантовий зелений	++	-	-	+++	+++	+
Метиленовий синій	+	-	-	+++	+++	+++

Таблиця 1

Результати забарвлювання личинок нематод

Барвник	без температурної фіксації			із температурною фіксацією		
	H. contortus	S. papillosus	Mullerius sp.	H. contortus	S. papillosus	Mullerius sp.
Амідо чорний 10В	-	-	-	-	-	-
Еозин	-	-	-	-	-	-
Фуксин Циля	++	-	-	+++	+++	+++
Розчин Люголя	++	+++	+	+++	+++	+++
Генціанвіолет	-	-	-	+	+	+
Фарба за Романовським	-	-	-	-	-	-
Судан	-	-	-	-	-	-
Бромфеноловий синій	-	-	-	++	+++	++
Помаранчевий G	-	-	-	-	-	-

Примітки: ступінь забарвлювання +++ - інтенсивний, ++ - середній, + - слабкий, - - забарвлення відсутнє.

Таблиця 2

Диференціальна діагностика личинок
S. papillosus і Mullerius sp. із застосуванням розчину Люголя

Характеристика	S. papillosus	Mullerius sp.
Забарвлення головного кінця	світло-коричневе	коричневе
Забарвлення стравоходу	відрізняється від забарвлення тіла, темно-коричневе	не відрізняється від забарвлення тіла, коричневе
Забарвлення кишечника	відрізняється від забарвлення тіла, темно-коричневе	не відрізняється від забарвлення тіла, коричневе
Забарвлення хвостового кінця	світло-коричневе, рівномірне	відрізняється від забарвлення тіла, світло-коричневе

Таблиця 3

Диференціальна діагностика личинок H. contortus і S. papillosus за допомогою барвників

Характеристика	H. contortus				S. papillosus			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Забарвлення головного кінця	синє	зелене	рожеве	коричневе	відсутнє	відсутнє	відсутнє	світло-коричневе
Забарвлення стравоходу	синє	зелене	рожеве	коричневе	відсутнє	відсутнє	відсутнє	темно-коричневе
Забарвлення кишечника	не пофарбовані	темно-зелене	рожеве	оболонки та ядра клітин темно-коричневі	відсутнє	відсутнє	відсутнє	темно-коричневе
Забарвлення хвостового кінця чохлика	темно-синє	зелене	рожеве	коричневе	відсутнє	відсутнє	відсутнє	яскраво-коричневе
Забарвлення чохлика	синє	зелене	рожеве	коричневе	-	-	-	-

Примітки: 1 - метиленовий синій, 2 - діамантовий зелений, 3 - фуксин Циля, 4 - розчин Люголя; прочерк у S. papillosus означає відсутність чохлика.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб визначення личинок нематод *Haemonchus contortus*, *Mullerius* sp. і *Strongyloides papillosus*, який включає їх морфологічні особливості, який **відрізняється** тим, що проводять контрастне забарвлювання кутикули личинок з використанням діамантового синього, метиленового синього, діамантового зеленого, фуксину Циля, розчину Люголя (за умов нагрівання препаратів та без температурної фіксації).

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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

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