



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **147981** (13) **U**
(51) МПК (2021.01)
A61D 99/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2021 00900	(72) Винахідник(и): Хорольський Анатолій Анатолійович (UA), Євстаф'єва Валентина Олександрівна (UA), Мельничук Віталій Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 25.02.2021	(73) Володілець (володільці): ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНА АГРАРНА АКАДЕМІЯ, вул. Сковороди, 1/3, м. Полтава, 36003 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 24.06.2021	(74) Представник: Іванов Олег Миколайович
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 23.06.2021, Бюл.№ 25	

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ЯЄЦЬ НЕМАТОД PASSALURUS AMBIGUUS

(57) Реферат:

Спосіб культивування яєць нематод *Passalurus ambiguus* включає вилучення із самок гельмінтів гонад з яйцями, гомогенізацію їх із фізіологічним розчином (з використанням ступки, товкачика, препарувальних голок) до утворення однорідної субстанції та культивування отриманих яєць у термостаті, за постійної температури. Культивування проводять в годинникових скельцях. Як субстрат, на якому культивують яйця *Passalurus ambiguus*, використовують тіогліколеве середовище.

UA 147981 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме - ветеринарної паразитології, і може бути використана для вивчення ембріональних стадій розвитку збудника пасалурозу кролів; отримання лабораторної моделі паразитозу; визначення дезінвазійних властивостей дезінвазійних та дезінфікуючих речовин та засобів; випробування ефективності антигельмінтних препаратів.

Існує спосіб культивування личинок і яєць гельмінтів та ооцист найпростіших [Патент U 79560 Україна, МПК (20.13.01), A61D 99/00. Спосіб культивування личинок, яєць гельмінтів та найпростіших/С.В. Митрофанов, Н.М. Сорока, Ю.В. Кичилук; власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. - № 201212466; заявл. 31.10.12, опубл. 25.04.13, Бюл. № 8. - 2 с.], згідно з яким, як субстрат для культивування використовують кристали аграрного гідрогелю з розмірами кристалів 0,5-1 мм. Проводять відбір фекалій від тварин. Отриманий матеріал змішується з аграрним гідрогелем у відповідних пропорціях (для рідких фекалій і надмірно вологих, а також від свиней, корів, птахів, котів, собак, ящірок, черепах, плазунів використовують сухий аграрний гідрогель з розрахунку 1-2 г речовини на 50-100 г дослідного матеріалу; для помірно вологих фекалій і фекалій від кіз, овець, косуль, кролів, шиншил, мишей, щурів, ховрахів проводять попереднє розведення аграрного гідрогелю 1:50 з водою; за малої кількості фекалій (до 10 г) змішують в пропорції 1:1). Отриману суміш ретельно перемішують і поміщають в широкую пластикову ємність. Для кращої аерації в кришці виконують отвори (4 отвори на 2 см² площі поверхні; діаметр отворів 2 мм). Культивування проводять в термостаті при 25-30 °С протягом 10-14 діб, залежно від виду паразитів, що досліджуються. Зволоження та спущення фекалій здійснюється при необхідності на кожну 3-5 добу культивування.

Відомий спосіб культивування яєць *Trichuris muris* [Б.А. Астафьев, Л.С. Яроцкий, М.Н. Лебедева - М.: Наука, 1989. - 280 с.]. Згідно з методикою, яйця гельмінтів отримували із фекалій, інвазованих збудником *Trichuris muris*, мишей флотаційно-центрифугальним методом. Для цього використовують насичений розчин кухонної солі. Фекалії ретельно розмішують у цьому розчині у співвідношенні 1:10. Отриману суміш розливають у центрифугальні пробірки і центрифугують впродовж 5-7 хвилин зі швидкістю 1500 обертів/хв. Яйця, що піднімаються, разом з поверхневою плівкою знімають металеву петлею і струшують у стаканчик з дистильованою водою, після їх осідання на дно, ще 7-8 разів промивають дистильованою водою, переносять на годинникове скло, яке поміщають у чашку Петрі (для створення умов вологості камери) для проведення подальшого культивування за температури 29 °С.

Недоліками вищенаведених способів є те, що для отримання культури яєць гельмінтів використовуються фекалії, що не є доцільним для збудника *Passalurus ambiguus*, адже згідно з біологією розвитку самка відкладає яйця на шкіру прианальної ділянки та шерсть навколо ануса, а тому в фекаліях яйця виявляють вкрай рідко та в малій кількості.

Найбільш близьким аналогом корисної моделі вибрано "Методику культивування аскаридних яєць" [Смирнов Г.Г. К вопросу о патологических изменениях при миграции аскаридных личинок в теле хозяина. Экспериментальное исследование. Часть первая. Известия Академии наук СССР. VI серия. 1927. Том 21 (7), 1275-1298].

Методика культивування яєць полягає в наступному: проводиться розтин самок паразитів з наступним виділенням матки, яку в подальшому, розрізають на частини та переносять їх в чашки Петрі на різні зволожені середовища й поміщають в термостат за температури 28-30 °С. Вологість культур підтримується шляхом внесення до культури води. Як субстрати запропоновано використовувати землю (звичайну та прожарену), стерильний пісок, фізіологічний розчин, кісткове та тваринне вугілля.

Недоліком вказаної методики є те, що яйця нематоди *Passalurus ambiguus* є дуже чутливими як до надмірної вологості, так і до пересихання, а за використання запропонованих середовищ для культивування це важко контролювати.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу культивування яєць нематод *Passalurus ambiguus*, який дозволяє враховувати чутливість яєць до вологості; дає змогу в кінцевому результаті отримати високий вихід інвазійних яєць в дослідній культурі; дає змогу проводити мікроскопічні дослідження та мікрофотозйомку без вилучення яєць з субстрату, в якому відбувається культивування.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що для отримання культури яєць *P. ambiguus* для культивування, яйця виділяють з гонад мінімум 15 самок гельмінтів, процес підготовки культури яєць включає вилучення гонад із самок гельмінтів та гомогенізацію їх з фізіологічним розчином, при цьому використовуються ступка, товчачик й препарувальні голки, а культивування яєць пасалурисів проводять в годинниковому скельці з субстратом, запропоновано тіогліколеве середовище.

Спосіб здійснюють наступним чином:

Яйця нематод *P. ambiguus* вилучають з гонад мінімум 15 самок гельмінтів. Процес вилучення гонад із самок проводять на предметному скельці за допомогою препарувальних голків, рештки самок видаляють, а отриманий матеріал змивають фізіологічним розчином (1,5-2,5 мл) до ступки й гомогенізують товкачиком до отримання гомогенної суспензії. В подальшому 0,3-0,5 мл отриманої суспензії переносять на попередньо підготовлене годинникове скельце з субстратом для культивування, рівномірно розподіливши її по всій поверхні. Як субстрат для культивування використовують тьогліколевое середовище, яке попередньо розливають в годинникові скельця та охолоджують до застигання.

Годинникове скельце з культурою яєць поміщають в чашку Петрі, на дні якої розміщений зволожений фізіологічним розчином чи водою ватний диск або фільтрувальний папір, чашку закривають та поміщають до термостата за температури 35 °C й проводять культивування впродовж 3-5 діб. Щоденно здійснюють аерацію культури шляхом відкривання кришки на чашці Петрі, за потреби проводять зволоження культури фізіологічним розчином (не більше 0,5 мл розчину на одне годинникове скельце).

Приклад конкретного виконання

Для встановлення ефективності способу культивування яєць в умовах лабораторії проведено експериментальне дослідження, в якому порівняли запропонований спосіб з найближчим аналогом за кількістю інвазійних яєць в кінці культивування при використанні однакового температурного режиму (35 °C). Було проведено 20 дослідів аналогів, в яких культивували яйця *P. ambiguus*, в різних субстратах за різними способами:

методика культивування аскаридних яєць (спосіб - найближчий аналог) з використанням як субстрату для культивування - фізіологічного розчину;

спосіб культивування яєць нематод *Passalurus ambiguus* (пропонований спосіб) з використанням як субстрату для культивування - тьогліколевого середовища.

Оцінювання проводили за показниками кількості інвазійних яєць (з личинкою всередині) на 5-ту добу від початку культивування, та яєць, що загинули або зупинилися в розвитку на кінець досліду (на 5-ту добу досліду). Розрахунок інвазійних яєць, а також яєць, що загинули й зупинилися в розвитку, проводили шляхом мікроскопії культур за допомогою мікроскопа з розрахунку на 100 підрахованих яєць. Отримані результати експериментальних досліджень відображено в таблиці.

Таблиця

Порівняльна ефективність способів культивування яєць нематод *P. ambiguus*, n=20 (M±m)

Спосіб дослідження	Кількість яєць на 5-ту добу досліду			% яєць, що не досягли інвазійної стадії
	інвазійні	зупинилися в розвитку	загинули	
Спосіб - найближчий аналог	27,65±0,94	26,20±1,36	46,15±1,65	72,35
Корисна модель	71,35±1,41***	10,95±0,69***	17,70±1,09***	28,65

Примітка: *** p<0,001 - порівняно з показниками способу найближчого аналога

За використання способу - найближчого аналога, в середньому на 100 яєць нематоди *P. ambiguus* 27,65 яєць в культурі досягає інвазійної стадії, 26,20 - зупиняється в розвитку а 46,15 - гине. Загалом 72,35 % яєць у дослідній культурі не досягли інвазійної стадії.

За використання пропонованого способу (спосіб культивування яєць нематод *Passalurus ambiguus*) на 100 підрахованих яєць в культурі у середньому 71,35 яєць розвивалися до інвазійної стадії, що більше на 38,75 % порівняно зі способом - найближчим аналогом (p<0,001), а 10,95 й 17,70 яєць зупинилися в розвитку й гинули відповідно, що на 41,79 й 38,35 % менше порівняно зі способом - найближчим аналогом (p<0,001).

Таким чином, позитивний ефект заявленої корисної моделі полягає у тому, що запропонований спосіб дозволяє:

1) за культивування отримати більшу кількість інвазійних яєць в культурі (на 38,75 %) порівняно зі способом аналогом;

2) зменшити в культурі кількість яєць, що зупинилися в розвитку та загинули (на 41,79 та 38,35 % відповідно);

3) проводити мікроскопію та мікрофотозйомку дослідної культури яєць безпосередньо на годинниковому скельці без вилучення яєць із субстрату.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб культивування яєць нематод *Passalurus ambiguus*, який включає вилучення із самок гельмінтів гонад з яйцями, гомогенізацію їх із фізіологічним розчином (з використанням ступки, товкачика, препарувальних голок) до утворення однорідної субстанції та культивування отриманих яєць у термостаті, за постійної температури, який **відрізняється** тим, що культивування проводять в годинникових скельцях, а як субстрат, на якому культивують яйця *Passalurus ambiguus*, використовують тіогліколеве середовище.

10