



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **141207** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)
A61B 1/00
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 09684	(72) Винахідник(и): Мельничук Віталій Васильович (UA), Юськів Ігор Дмитрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.09.2019	(73) Власник(и): ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНА АГРАРНА АКАДЕМІЯ, вул. Сковороди, 1/3, м. Полтава, 36003 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.03.2020	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2020, Бюл.№ 6	

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОЇ КОПРООВОСКОПІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ НЕМАТОДОЗІВ ТРАВНОГО КАНАЛУ ЖУЙНИХ ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб кількісної копроовоскопічної діагностики нематодозів травного каналу жуйних тварин включає відбір проб, підготовку зразка та дослідження на наявність яєць нематодозів травного каналу шляхом мікроскопії проб з подальшим визначенням рівня інвазованості тварин в перерахунку на 1 г фекалій. Для дослідження використовується весь отриманий після центрифугування однієї проби осад, яким заповнюють три пробірки одночасно, підготовка останніх здійснюється шляхом змішування фекального осаду з флотаційною рідиною, відстоюванням проб впродовж 12-15 хвилин та подальшим підрахунком інвазійних елементів з трьох покривних скелець знятих із дослідних пробірок та визначенням рівня інвазованості.

UA 141207 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме до способів виявлення яєць збудників нематодозів травного каналу жуйних тварин та може бути використана для своєчасного виявлення хворих на нематодози тварин, визначення екстенсивності та інтенсивності інвазії, екстенс- та інтенсефективності антигельмінтних засобів, а також для

5

визначення антигельмінторезистентності збудників гельмінтозів до лікувальних засобів. Способи захиттєвої лабораторної діагностики нематодозів травного каналу у жуйних тварин, що на сьогодні використовуються ветеринарними спеціалістами, не дозволяють чітко оцінити різний ступінь зараження тварин конкретним збудником гельмінтозу. Це пов'язане з використанням якісних методів дослідження фекалій, які є більш доступними в ціновому аспекті та менш ефективні. Натомість, кількісні способи дослідження фекалій від тварин на наявність

10

зародків гельмінтів переважно потребують спеціального обладнання та устаткування або складні у виконанні. Загальновідомим є спосіб Столла (за Г.Г. Смирновым, 1959) підрахунку яєць гельмінтів, згідно з яким у колбу об'ємом 100 мл наливають 56 мл води і на рівні меніска ззовні роблять помітку, потім доливають 4 мл води і знову роблять відмітку, потім воду виливають, а в колбу

15

20

наливають 56 мл 0,1 н розчину їдкого натру і додають фекалій стільки, щоб рівень рідини досяг верхньої відмітки - 60 мл. Далі до колби вносять 10-15 скляних бусинок, за допомогою яких суміш ретельно гомогенізують. Для визначення кількості яєць в 1 г фекалій відразу після збовтування піпеткою відбирають 0,1 мл отриманого гомогенізатору, наносять на предметне скло і досліджують під мікроскопом. З метою встановлення інтенсивності інвазії кількість виявлених яєць множать на 150 [Секретарюк К.В. Гельмінтологічні дослідження тварин і навколишнього середовища у ветеринарній медицині / К.В. Секретарюк, О.А. Сварчевський, Р.І. Тафійчук. - Львів: Сполом, 2005. - 110 с].

25

Вказаний спосіб має недоліки. Під час проведення досліджень слід ретельно стежити за кількістю використовуваної в досліді рідини. Методика включає використання великої кількості додаткового обладнання: піпетки, бусинки, колби. Одночасно вона є затратною в часі (40-50 хв на одне діагностичне дослідження). Рідина, яку використовують для дослідження, містить значну кількість сторонніх решток, що значною мірою перешкоджає процесу мікроскопії. Також існує спосіб підрахунку яєць гельмінтів у фекаліях тварин за Трачем (1992), згідно з

30

35

методикою 5-грамову пробу фекалій гомогенізують у насиченому розчині кухонної солі у хімічному стакані, відфільтровують від грубих часточок фекалій; гельмінтологічною петлею знімають поверхневу плівку, переносять її на предметне скло і підраховують під мікроскопом яйця гельмінтів; перераховують одержане значення на 1 г фекалій, згідно із запропонованими автором формулами [Трач В.Н. Рекомендации по применению нового метода учета яиц гельминтов и цист простейших в фекалиях животных / В.Н. Трач. - К.: НПО "ВАСТА", 1992. - С. 16].

40

Недоліком способу є те, що він потребує затрат часу на перерахунок кількості яєць, виявлених у краплях суміші з петлі, на їх кількість у пробі з урахуванням розмірів діаметрів площі стакана та гельмінтологічної петлі. Також суттєвим недоліком є те, що вказаний спосіб за його виконання потребує значних затрат часу - 30-45 хв.

45

Відомим є спосіб підрахунку яєць гельмінтів у фекаліях за Ляшенко та ін. (2012), який, згідно з методикою, проводиться наступним чином. Для дослідження відбирають 1 г фекалій та вносять їх у скляний стаканчик, додають 5 мл насиченого розчину амонію нітрату (густина розчину $\rho > 1,3$ г/см³), розмішують до утворення однорідної маси. Переціджують через гельмінтологічне ситечко у чистий стаканчик з "носиком" і отриману суміш відразу переливають у циліндричну пробірку з внутрішнім діаметром 1-1,2 см за потреби доливають до рівня горловини розчином флотанту. Відстоювання проводять 20-25 хв, після чого з поверхні суміші знімають поверхневу плівку за допомогою гельмінтологічної петлі діаметром 1 см. Петлею краплину переносять на предметне скло й покривають накривним скельцем та мікроскопують. Підрахована кількість яєць у одній краплі відповідає їх кількості у одному грамі фекалій [Спосіб підрахунку яєць гельмінтів у фекаліях: пат. 69062 Україна: МПК G01N 1/28. № u201109368; заявл. 26.07.2011; опубл. 25.04.2012, Бюл. № 8].

50

Недоліком вказаного способу є те, що методика не враховує кількість втрачених яєць гельмінтів, як наслідок фільтрації гомогенізатору через сито, також одноразове зняття гельмінтологічною петлею поверхневої плівки не гарантує збирання всіх яєць гельмінтів, які піднялися до поверхневого шару рідини.

55

Як аналог використано центрифужно-флотаційну техніку за Taylor et al. (2015) [Veterinary Parasitology: Fourth Edition. / M.A. Taylor, R.L. Coop, R.L. Wall. - Published by John Wiley. Sons, Ltd, 2015. - P. 259-271].

Згідно з методикою, дослідження проводять наступним чином. У пластикову ємність вносять 3 г фекалій та змішують з 42 мл води. Отриману суспензію проціджують крізь дрібне сито. Далі фільтрат вносять у 15 мл пробірку, центрифугують 2 хв за 1500 об/хв. Після зупинки центрифуги пробірки виймають та зливають з них надосадову рідину, а до осаду, що залишився, додають флотаційну рідину до попередньої кількості. Пробірку поміщують у центрифугу й доливають флотант (згідно з пропозицією автора щільність розчинів для виявлення яєць нематод має бути в межах 1,10-1,20 г/см³) до моменту утворення поверхневої плівки у вигляді опуклої лінзи та накривають пробірку накривним скельцем, в такому вигляді пробірки центрифугують впродовж 2 хвилин за 1000 об/хв. Після зупинки центрифуги з пробірки знімають покривне скельце, переносять його на предметне скельце й мікроскопують.

Кількість яєць в 1 г фекалій вираховується за наступною формулою:

$$ЯГК = y \times 15 / x \times 1,2$$

де: У - кількість підрахованих яєць гельмінтів; х - ємність пробірки; 1,2 - коефіцієнт корекції.

Недоліком вказаної методики є те, що для проведення способу необхідно мати центрифуги, які дають можливість регулювати кількість обертів. Проте в більшості випадків лікарі ветеринарної медицини змушені користуватися застарілими моделями центрифуг, оберти яких є нерегульованими, при цьому покривне скельце, яке поміщують на пробірку та центрифугують за режиму більше 1000 об/хв внаслідок обертових рухів відпадає.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу кількісної копроовоскопічної діагностики нематодозів травного каналу жуйних тварин, який має високу діагностичну ефективність, забезпечує гарний ступінь видимості яєць нематод при мікроскопії зразку, що дає змогу не лише встановити діагноз та ступінь ураження тварини (інтенсивності інвазії), а й вивчити особливості морфологічної та морфометричної будови яєць паразита.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що з метою дослідження як флотаційну рідину застосовують розчин кальцієвої селітри, для дослідів використовується весь осад, яким заповнюють три пробірки одночасно, а з метою виявлення та підрахунку яєць нематод проводять мікроскопію трьох покривних скелець, знятих з дослідних пробірок.

Корекція формули для перерахунку яєць нематод дозволяє встановити кількість інвазійних елементів з розрахунку на 1 г фекалій саме для даної моделі виконання способу.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Із загальної проби фекалій від жуйних тварин (овець, кіз, худоби, диких жуйних) відбирають наважку масою 3 г та переносять її у склянку об'ємом до 50 мл. Пробу заливають невеликою кількістю води, ретельно розмішують до отримання гомогенної суспензії. При постійному помішуванні поступово додають воду, доводячи її кількість до 35-40 мл. Після ретельного змішування (впродовж 30-60 с) отриману суспензію фільтрують в іншу склянку крізь дрібне сито з розмірами комірок до 150 мкм. Фільтрат знову ретельно розмішують та переливають у три пробірки об'ємом 15 мл. Далі з зразки однієї проби центрифугують впродовж 2 хвилин за режиму 1000-1500 об/хв. Після зупинки центрифуги пробірки виймають, надосадову рідину зливають, а до осаду в кожному з пробірок додають 8-12 мл флотаційного розчину кальцієвої селітри (син. кальцій азотнокислий, нітрат кальцію, норвезька селітра, неорганічна сіль азотної кислоти - Ca(NO₃)₂) зі щільністю 1,30-1,33 г/см³ (800 г Ca(NO₃)₂ на 1 л води). Далі зразки в пробірках закривають гумовими пробками, добре струшують, відкривають та знову центрифугують 2 хвилин за режиму 1000-1500 об/хв. Після зупинки центрифуги, пробірки виймають, ставлять у штатив і обережно, повільно по стінці пробірки доливають флотаційний розчин до моменту утворення поверхневої плівки у вигляді опуклої лінзи. Зверху пробірки накривають покривними скельцями розміром 19×19 мм не допускаючи утворення пухирців повітря між рідиною та скельцями. У такому вигляді зразки залишають на 12-15 хв, після чого, послідовно, з кожної пробірки вертикальним рухом знімають покривні скельця та переносять не перевертаючи їх на одне предметне скельце. Мікроскопію отриманих препаратів проводять за малого збільшення. Підраховують всю кількість яєць у кожному з трьох зразків однієї проби. З метою перерахунку кількості яєць в 1 г фекалій застосовують формулу з коефіцієнтом запропонованим у методиці прототипу.

$$ЯГФ = \left(\frac{n_1 + n_2 + n_3}{3} \right) \times 15 \times 1,2$$

де:

- ЯГФ - кількість виявлених яєць у зразку (екземплярів яєць нематод / 1 г фекалій); - n₁, n₂, n₃ - кількість яєць у зразку; - 3 - кількість досліджуваних зразків; - 15 - об'єм рідини у пробірці; - 1,2 - коефіцієнт корекції запропонований у способі прототипу.

3 метою визначення показника діагностичної ефективності удосконаленого способу в порівнянні з методикою, яку вибрано як прототип проведено експериментальне дослідження. На першому етапі нами було відібрано проби фекалій від овець віком до 1-місячного віку та проведення їх копроовоскопічного дослідження з метою виключення наявності яєць нематод. На другому етапі проводили дослідження цих фекалій згідно з описами до методик. Попередньо до кожної проби штучно внесено яйця трихурисів у кількості 30 екземплярів з послідовним ретельним розмішуванням. Всього проведено 30 діагностичних досліджень (по 15 кожним зі способів). Проводячи дослідження враховували кількість позитивних проб, середнє значення виявлених яєць у пробі та їх мінімальні й максимальні значення. Результати отриманих даних наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняльна ефективність овоскопічних способів дослідження за експериментального внесення яєць у фекалії овець (n=15)

Спосіб дослідження	Кількість позитивних проб, екз.	Виявлено яєць трихурисів		
		в середньому у пробі, екз., $M \pm m$	min	max
Спосіб прототип	12	3,92±0,48	1	7
Удосконалений спосіб	14	4,81±0,89	2	9

Згідно з отриманими даними, встановлено, що за кількістю позитивних проб удосконалений спосіб виявився ефективнішим за прототип на 14,29 %, а за середнім значенням кількості виявлених яєць на 18,50 %.

Приклад конкретного виконання.

3 метою встановлення ефективності способу в умовах лабораторії проведено експериментальне дослідження. Для цього в умовах вівцегосподарств Полтавської області відбирали фекалії від овець, їх досліджували флотаційним методом за Котельниковим-Хреновим. В досліді використовували проби з інтенсивністю інвазії мінімум 23,64±0,49 яєць нематод у краплині флотаційної рідини (за коливань від 20 до 28 яєць). Загалом було відібрано 25 проб фекалій завідомо інвазованих яйцями нематод (стронгілят, у тому числі й нематодірусів, трихурисів та стронгілоїдесів). Одну й ту ж саму пробу фекалій ретельно гомогенізували у фарфоровій ступці та досліджували за способами: Столла, Трача, Ляшенко й ін., прототипу (Taylor et al., 2015) та удосконаленим.

Критерієм оцінки слугували наступні показники: число позитивних проб, середня кількість яєць нематод в 1 г фекалій та їх мінімальні й максимальні значення, а також наявність сторонніх решток та пухирців повітря різного розміру за мікроскопії препарату (- - незначна кількість дрібних сторонніх решток / пухирців повітря; -- - одночасне виявлення великої кількості дрібних та незначної кількості великих за розмірами решток / пухирців повітря; --- - велика кількість як дрібних, так й значних за розмірами сторонніх решток / пухирців повітря). Результати досліджень наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняльна ефективність способів дослідження фекалій овець на наявність яєць нематод (n=25)

Спосіб дослідження	Позитивних проб, екз.	Виявлено яєць у 1 г фекалій		Наявність сторонніх решток
		min-max	$M \pm m$	
Удосконалений спосіб	25	42-546	311,28±23,95	-
Taylor et al., 2016, (прототип)	25	36-522	293,04±25,08	--
Столла, 1959 (аналог 1)	14	150-450	225,00±26,08 *	---
Трача, 1992, (аналог 2)	23	8-408	193,39±22,45 **	--
Ляшенко й ін., 2012, (аналог 3)	20	21-52	40,65±1,84 ***	---

Примітка: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ - порівняно з показниками удосконаленого способу

Експериментальним шляхом встановлено, що удосконалений спосіб кількісної копроовоскопічної діагностики нематодозів травного каналу жуйних тварин за показником кількості позитивних проб виявився ефективнішим відносно способів Столла, Ляшенко й ін. та Трача на 44,0, 20,0 та 8,0 % відповідно.

5 Слід зазначити що за мінімальними показниками кількості яєць нематод в 1 г фекалій овець удосконалений спосіб перевищив методики Трача - на 80,9 %, Ляшенко й ін. - на 50,0 % та способу прототипу - на 14,3 %. А за максимальними значеннями: Ляшенко й ін. - на 90,5 %, Трача - на 25,3 %, Стоила - на 17,6 % та способу прототипу (Taylor et al.) - на 4,4 %.

10 Також удосконаленого спосіб виявився діагностично ефективнішим у порівнянні зі способами: Ляшенко й ін. - на 86,9 % ($p < 0,001$), Трача - на 37,9 % ($p < 0,01$), Столла - на 27,7 % ($p < 0,05$) та способу прототипу (Taylor et al.) - на 5,9 %.

За проведення мікроскопії препаратів, виготовлених за удосконаленим способом, виявляли найменшу кількість сторонніх решток та пухирців повітря, які не завдавали суттєвих складностей при виявленні та підрахунку яєць нематод.

15 Таким чином за комплексною оцінкою порівнюваних у досліді способів з використанням фекалій від овець встановлено, що найбільшу ефективність при виявленні яєць нематод має спосіб кількісної копроовоскопічної діагностики нематодозів травного каналу жуйних тварин.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20

1. Спосіб кількісної копроовоскопічної діагностики нематодозів травного каналу жуйних тварин, який включає відбір проб, підготовку зразка та дослідження на наявність яєць нематодозів травного каналу шляхом мікроскопії проб з подальшим визначенням рівня інвазованості тварин в перерахунку на 1 г фекалій, який **відрізняється** тим, що для дослідження використовується весь отриманий після центрифугування однієї проби осад, яким заповнюють три пробірки одночасно, підготовка останніх здійснюється шляхом змішування фекального осаду з флотаційною рідиною, відстоюванням проб впродовж 12-15 хвилин та подальшим підрахунком інвазійних елементів з трьох покривних скелець знятих із дослідних пробірок та визначенням рівня інвазованості за формулою:

25

30

$$ЯГФ = \left(\frac{n_1 + n_2 + n_3}{3} \right) \times 15 \times 1,2$$

де:

- ЯГФ - кількість виявлених яєць у зразку (екземплярів яєць нематод / 1 г фекалій); - n_1, n_2, n_3 - кількість яєць у зразку; - 3 - кількість досліджуваних зразків; - 15 - об'єм рідини у пробірці; - 1,2 - коефіцієнт корекції, запропонований у способі прототипу.

35

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як флотаційна рідина використовується флотаційний розчин кальцієвої селітри з питомою вагою 1,30~1,33 г/см³.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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