



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **135968** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
G01N 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 01817	(72) Винахідник(и): Горб Ксенія Олегівна (UA), Євстаф'єва Валентина Олександрівна (UA), Горб Олег Олександрович (UA), Мельничук Віталій Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.02.2019	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2019	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2019, Бюл.№ 14	(73) Власник(и): ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНА АГРАРНА АКАДЕМІЯ, вул. Сковороди, 1/3, м. Полтава, 36003 (UA)

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ПОСТІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ БЛІХ РОДУ STENOCEPHALIDES IN TOTO

(57) Реферат:

Спосіб приготування постійних препаратів бліх роду Stenoccephalides in toto включає збір бліх з тіла тварин, фіксацію, просвітлення, зневоднення та фіксацію в канадському бальзамі на предметному склі. Фіксацію проводять у 70 % розчині етилового спирту 24-48 годин, просвітлення об'єкта у розчині перекису водню з попереднім проколюванням тонкою голкою хітинового покриву комахи з наступним зневодненням та просвітленням хітинових покривів сумішшю ялівцевої та гвоздичної олій у співвідношенні 1:1 на предметному скельці з лункою протягом 4-5 годин.

UA 135968 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме - ветеринарної паразитології, і може бути використана для приготування анатомо-морфологічних препаратів бліх роду *Stenoccephalides* з метою подальшої ідентифікації до виду, а також для вивчення фауни та особливостей морфологічної й морфометричної будови збудників сифонаптерозів собак та котів.

З метою виготовлення постійних препаратів з комах, в тому числі й роду *Stenoccephalides*, використовують різні методики та способи.

Так, відомим є "Спосіб приготування збудників ряду *Mallophaga in toto*", згідно з яким збір малофаг проводять у пробірки для мікропроб об'ємом 1,5 мл з 70°-ним розчином етилового спирту. З пробірки їх переносять на предметне скло, де фарбують 1 %-вим спиртовим розчином діамантового зеленого та витримують в ньому 4-6 хвилин. З метою кращого фарбування черевце паразита попередньо обережно проколюють гострою голкою, намагаючись не пошкодити щетинок і внутрішніх органів. Потім видаляють залишки барвника, промиваючи його дистильованою водою, і переносять для просвітлення в гвоздичне масло. Час витримки в ньому залежить від розміру об'єкта. Просвітлення проводять на предметному склі. Потім піпеткою видаляють гвоздичне масло, надають об'єкта необхідного положення, наносять кілька крапель канадського бальзаму й обережно накривають покривним склом [див. Патент України на корисну модель № 85028 Україна МПК (2013) u201305144, G01N 1/00. Спосіб приготування збудників ряду *Mallophaga in toto* | Євстаф'єва В. О., Клименко О. О., Хижня Л. Ю.].

Недоліками вказаного способу є фарбування препарату перед його фіксацією. Відомо, що диференціація бліх проводиться за особливостями у морфологічній будові комах, що добре видно під мікроскопом після процесу просвітлення, фарбування ж хітинового покриву заважає процесу диференціації.

Як найближчий аналог вибрано "Техніку приготування просвітлених тотальних препаратів бліх", що включає проведення ряду послідовних маніпуляцій з комахами, а саме: витримання бліх у розчині їдкого лугу (70 % NaOH або KOH) від 1 до 2 діб; ретельне відмивання комах у воді; проведення через розчини спиртів зростаючої концентрації (50 %, 70 %, 95 % та абсолютний спирт відповідно) від 1-єї години до 1-єї доби; споліскування свіжевиготовленим абсолютним спиртом; перенесення у розчин ксилолу терміном від 1-єї години до 1-єї доби; перенесення в гвоздичну олію терміном від 1-єї години до 1-єї доби; перенесення на предметне скло з фіксацією комах в канадському бальзамі з використанням покривного скла [Тифлов В. Е. Определитель блох Кавказа / В. Е. Тифлов, О. И. Скалой, Б. А. Ростигаев. Ставрополь.: Ставропольское кн. изд-во. - 1976. -С 16-17].

Недоліком способу є тривале зневоднення комах у розчинах спиртів зростаючої концентрації та використання абсолютного спирту, який є дефіцитним. Ще одним негативним моментом є те, що блохи - це комахи-гематофаги, тобто харчуються кров'ю, а тому їх кишечник, а відповідно й черевце, мають темне забарвлення та погано просвітлюються за використання лише їдкого лугу, що завдає труднощів при вивченні морфологічних та метричних особливостей паразита і, в кінцевому підсумку, негативно впливає на ефективність досліджень.

Задачею корисної моделі є підвищення діагностичної ефективності за рахунок кращого просвітлення хітинових покривів комах та скорочення часу на виготовлення тотального препарату.

Поставлена задача вирішується тим, що фіксація проводиться у 70 % розчині етилового спирту 24-48 годин, просвітлення об'єкта у розчині перекису водню з попереднім проколюванням тонкою голкою хітинового покриву комах з наступним зневодненням та просвітленням хітинових покривів сумішшю ялівцевої та гвоздичної олій у співвідношенні 1:1 на предметному скельці з лункою протягом 4-5 годин.

Для визначення оптимальних режимів виконання методики проведено експериментальне дослідження.

Зберігання комах у 70° розчині етилового спирту є попередньою підготовкою матеріалу для подальших маніпуляцій, що дозволяє видалити зайву вологу та зменшити крихкість бліх. Використання 3 % розчину перекису водню з попереднім проколюванням хітинового покриву тіла блохи сприяє пом'якшенню та первинному просвітленню органів черевця комах, а витримка у комбінованому розчині ялівцевої та гвоздичної олій сприяє кращому допросвітленню хітинового покриву.

Для визначення оптимального часу, за який відбувається максимальне просвітлення хітинових покривів, проведено дослідження 45 екземплярів бліх роду *Stenoccephalides*. Комах зі 70 % розчину етилового спирту переносили в склянку з 3 % розчином перекису водню, попередньо проколовши голкою хітиновий покрив в середній третині черевця, на 12 годин. В подальшому комах зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та просвітлювали в

комбінованій суміші з ялівцевої та гвоздичної олій. Ступінь просвітлення хітинових покривів тіла бліх, а саме голови, грудей та черевця, під дією комбінованої суміші олій визначали шляхом мікроскопії препаратів за збільшення $\times 40$, $\times 50$. Мікроскопію препаратів проводили в проміжках часу: 2-3, 3-4 та 4-5 годин. Показник просвітлення умовно поділили на високий, задовільний та незадовільний. Отримані результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Ступінь просвітлення хітинових покривів тіла бліх роду *Stenoccephalides* за використання пропонованого способу

Хітинові покриви ділянок	Експозиція, годин		
	2-3	3-4	4-5
Голови	*	**	***
Грудей	**	***	***
Черевця	*	*	***

Примітка: *** - високий рівень просвітлення; ** - задовільний рівень просвітлення; * - незадовільний рівень просвітлення

Встановлено, що високий рівень просвітлення всіх хітинових покривів тіла бліх роду *Stenoccephalides* забезпечує витримка комах в комбінованій суміші з ялівцевої та гвоздичної олій в проміжок часу від 4 до 5 годин. У решті випадків рівень просвітлення був менш вираженим.

Дослідженнями встановлено, що найбільш ефективно проводити просвітлення комах для виготовлення постійних препаратів в проміжок часу від 4 до 5 годин.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Зібраних та фіксованих у 70 % розчині етилового спирту бліх переносять на 12 годин у склянку з 3 % розчином перекису водню, попередньо проколовши голкою хітиновий покрив в середній третині черевця. Далі комах виймають з перекису водню і ретельно промивають водою. З метою зневоднення комах поступово проводять через спирти зростаючої концентрації (70,0 %, 80,0 % та 96,0 %), в кожному з яких об'єкт витримують впродовж 60 хвилин. В подальшому бліх обережно переносять на предметне скельце з лункою, в яку попередньо вносять комбіновану суміш ялівцевої та гвоздичної олій у співвідношенні 1:1 та залишають у спокої на 4-5 годин. Після бліх поміщають на предметне скельце, розмістивши на правий бік, та видаляють залишки олії за допомогою нанесення кількох крапель ксилолу, за допомогою скляної палички на об'єкт наносять невелику кількість канадського бальзаму, тонкою голкою надають бажаного положення й накривають чистим покривним склом, не допускаючи появи бульбашок повітря.

Приклад. Було проведено дослідження 75-ти екземплярів бліх роду *Stenoccephalides*. Матеріал досліджували через 24 години після фіксації в 70,0 % розчині етилового спирту за способом прототипу з мінімальними та максимальними межами у часі виконання маніпуляцій з комахами та пропонованим способом. Оцінювання проводили за показниками інтенсивності просвітлення хітинових покривів тіла бліх, а саме - голови, грудей та черевця шляхом мікроскопії за 5-ти бальною шкалою (де: 1 - практично відсутнє просвітлення, 2 - незначне просвітлення, 3 - задовільне частково нерівномірне просвітлення, 4 - задовільне рівномірне просвітлення, 5 - добре просвітлення) та за часом, витраченим на приготування одного тотального макропрепарату (не враховуючи час на висихання). Результати досліджень відображені в таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняльна ефективність способів виготовлення тотальних препаратів з бліх роду *Stenoccephalides*, $M \pm m$

Показники	Спосіб дослідження		
	Прототип		Пропонований, n=25
	min, n=25	max, n=25	
Просвітлення хітинового покриву ділянок:			
- голови	2,96 \pm 0,18***	3,96 \pm 0,17***	4,96 \pm 0,04
- грудей	3,92 \pm 0,13***	4,24 \pm 0,13***	5,00
- черевця	2,68 \pm 0,18***	3,32 \pm 0,11***	4,84 \pm 0,07
Загальна оцінка просвітлення	3,19 \pm 0,14***	3,84 \pm 0,11***	4,93 \pm 0,04
Час, витрачений на приготування макропрепарату, хв	29,39 \pm 0,09***	168,23 \pm 0,10***	20,50 \pm 0,09

Примітки: min - виконання способу за мінімальних витрат часу; max - виконання способу за максимальних витрат часу; ***- $p < 0,001$ - порівняно з показниками пропонованого способу.

За використання способу, який вибрано як найближчий аналог, за мінімальних меж витрат часу на маніпуляцію з комахою, в середньому загальна оцінка просвітлення становила $3,19 \pm 0,14$ балів. Встановлено, що краще просвітлюються хітиновий покрив голови ($3,92 \pm 0,13$ балів), дещо гірше голови та грудей комахи ($2,96 \pm 0,18$ та $2,68 \pm 0,18$ балів відповідно). На виготовлення одного макропрепарату витрачається в середньому $29,39 \pm 0,09$ хв.

Вищі показники просвітлення було отримано за виконання вказаної методики з максимальними витратами часу на маніпуляцію з комахою порівняно з попередніми параметрами виконання способу. В середньому загальна оцінка просвітлення бліх становила $3,84 \pm 0,11$ балів. Так, просвітлення хітинового покриву ділянки грудей в середньому склало $4,24 \pm 0,13$ балів, а голови та черевця $3,96 \pm 0,17$ та $3,32 \pm 0,11$ балів відповідно. Слід зазначити, що на виготовлення тотального препарату в середньому йде $168,23 \pm 0,10$ годин.

Використання пропонованого способу призводило до підвищення просвітлення хітинового покриву бліх роду *Stenocerphalides*. Так, в середньому загальна оцінка просвітлення склали $4,93 \pm 0,04$ балів. За використання вказаного способу найкраще просвітлилися хітинові покриви ділянки грудей комахи ($5,00$ балів), меншою мірою голови та черевця, в середньому $4,96 \pm 0,04$ та $4,84 \pm 0,07$ балів відповідно, а на виготовлення одного макропрепарату в середньому витрачається $20,50 \pm 0,09$ годин.

Таким чином, використання пропонованого способу виявилось ефективнішим при просвітленні хітинових покривів бліх роду *Stenocerphalides* у порівнянні з найближчим аналогом за виконання способу з мінімальними та максимальними межами у часі виконання маніпуляцій з комахами за загальною оцінкою на $35,3\%$ та $22,11\%$ відповідно ($p < 0,001$). За показниками просвітлення хітинового покриву в ділянці: голови на $40,32\%$ та $20,16\%$; грудей на $21,6\%$ та $15,2\%$; черевця на $44,63\%$ та $31,41\%$; а також за показником витраченого часу на приготування одного мікропрепарату на $30,25\%$ та $87,82\%$ ($p < 0,001$), що підтверджується статистично.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб приготування постійних препаратів бліх роду *Stenocerphalides in toto*, що включає збір бліх з тіла тварин, фіксацію, просвітлення, зневоднення та фіксацію в канадському бальзамі на предметному склі, який **відрізняється** тим, що фіксацію проводять у 70% розчині етилового спирту $24-48$ годин, просвітлення об'єкта у розчині перекису водню з попереднім проколюванням тонкою голкою хітинового покриву комахи з наступним зневодненням та просвітленням хітинових покривів сумішшю ялівцевої та гвоздичної олій у співвідношенні $1:1$ на предметному скельці з лункою протягом $4-5$ годин.

Комп'ютерна верстка В. Юкін

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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