



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **151306** (13) **U**  
(51) МПК (2022.01)  
**A61D 99/00**  
**G01N 33/48** (2006.01)

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

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2022 00860</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>24.02.2022</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>30.06.2022</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>29.06.2022, Бюл.№ 26</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Долгін Олександр Сергійович (UA), Євстаф'єва Валентина Олександрівна (UA), Мельничук Віталій Васильович (UA), Сіренко Олена Вікторівна (UA), Дмитренко Надія Іванівна (UA), Прийдак Тетяна Борисівна (UA)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці): <b>ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Сковороди, 1/3, м. Полтава, 36003 (UA)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Іванов Олег Миколайович</b></p>
---	---

**(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ЯЄЦЬ НЕМАТОД TRICHURIS VULPIS**

**(57) Реферат:**

Спосіб культивування яєць нематод *Trichuris vulpis* включає отримання культури яєць *Trichuris vulpis* з фекалій від хворих собак, відмивання отриманих яєць від сторонніх решток дистильованою водою або фізіологічним розчином (з використанням склянок, гумових груш) та культивування отриманих яєць у термостаті, за постійної температури. При цьому культивування здійснюють в годинникових скельцях, а як субстрат, на якому культивують яйця *Trichuris vulpis*, використовують мікробіологічне середовище Мюллера-Хінтона, яке періодично зволожують розчином стрептоциду.

**UA 151306 U**



Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме - ветеринарної паразитології, і може бути використана з метою: вивчення ембріональних стадій розвитку збудника трихуридозу собак; отримання лабораторної моделі паразитозу; визначення дезінвазійних властивостей дезінвазійних та дезінфікуючих речовин та засобів щодо екзогенних стадій розвитку нематоди *Trichuris vulpis*; випробування ефективності антигельмінтних препаратів.

На сьогодні відома велика кількість різних способів і методик культивування яєць гельмінтів у лабораторних умовах. Зокрема існує спосіб культивування яєць *Trichuris muris* [Б.А. Астаф'єв, Л.С. Яроцкий, М.Н. Лебедева. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине. - М.: Наука, 1989. - 280 с.]. Суть способу полягає в тому, що яйця гельмінтів отримують із фекалій інвазованих збудником *Trichuris muris* мишей флотаційно-центрифужним методом. Для цього використовують насичений розчин кухонної солі. Фекалії ретельно розмішують у цьому розчині у співвідношенні 1: 10. Отриману суміш розливають у центрифужні пробірки і центрифугують протягом 5-7 хвилин зі швидкістю 1500 обертів/хв. Яйця, що піднімаються, разом з поверхневою плівкою знімають металевою 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 проведення подальшого культивування за  $t$  29 °С.

Недоліком вказаного способу є те, що культивування яєць здійснюється у воді, а отже це знижує доступ повітря до культури, що може істотно впливати на процес ембріогенезу у таких зразках.

Загальновідомою є "Методика 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). - С. 1275-1298]. У методиці автор пропонує проводити розтин самок паразитів з послідовним видаленням з їх тіла матки, та внесенням її частин для культивування у різні поживні середовища, такі як: земля, фізіологічний розчин, стерильний пісок, кісткове вугілля. Яйця культивуються у чашках Петрі у термостаті за  $t$  28-30 °С, вологість контролюють шляхом внесення води до цих чашок.

Недоліком наведеного способу, є те, що при використанні як субстрату землі, стерильного піску чи кісткового вугілля виникає потреба в постійному відмиванні яєць від субстрату при кожному наступному дослідженні, а отже й частковій втраті культури. А за використання як середовища для культивування фізіологічного розчину - знижується доступ повітря до культури яєць.

Найбільш близьким, вибраним як найближчий аналог, є "Спосіб культивування яєць нематод *Passalurus ambiguus*" [Хорольський А.А., Євстаф'єва В.О., Мельничук В.В. Спосіб культивування яєць нематод *Passalurus ambiguus*: пат. № 147981, Україна: МПК (2021.01) А61D 99/00 і 2021 00900; заявл. 25.05.2021; опубл. 23.06.2021. Бюл. № 25. 4 с.].

Суть способу полягає у тому, що для дослідження потрібно щонайменше 15 самок збудника. З відібраних нематод із гонад виділяють яйця, далі гомогенізують отриману масу із фізіологічним розчином та вносять 0,3-0,5 мл отриманої суспензії на годинникові скельця із заздалегідь підготовленим субстратом, як такий використовується тіогліколеве середовище. Годинникові скельця переносять у чашки Петрі із розміщеним на дні зволеним ватним диском, далі чашки ставлять для культивування у термостат за температури 35 °С, культивування здійснюється від 3 до 5 днів.

Недоліком даного способу є те що період культивування *Passalurus ambiguus* значно коротший за період культивування нематод *Trichuris vulpis* і тому, за використання тіогліколевого середовища, як субстрату воно втрачає прозорість та на ньому починається ріст мікроорганізмів, що чинить суттєві проблеми при проведенні перегляду культур під мікроскопом та здійсненні мікрофотозйомки.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу культивування яєць нематод *Trichuris vulpis*, який: дозволяє враховувати чутливість яєць до вологи; дає змогу в кінцевому результаті отримати високий вихід інвазійних яєць в дослідній культурі; дає змогу проводити мікроскопічні дослідження і мікрофотозйомку без вилучення яєць із субстрату, в якому відбувається культивування.

Поставлена задача вирішується шляхом отримання культури яєць *Trichuris vulpis* з фекалій від хворих собак, згідно з методикою, описаною в патенті "Спосіб отримання щільної фекальної культури яєць гельмінтів роду *Trichuris* виділених від овець" [Мельничук В.В., Юськів І.Д. Спосіб отримання щільної фекальної культури яєць гельмінтів роду *Trichuris*, виділених від овець: пат. № 134550, Україна: МПК (2006) G01N 1/00 G01N 33/48 (2006.01) і 201812231; заявл. 10.12.2018;

опубл. 27.05.2019. Бюл. № 10. 4 с.]. Процес підготовки культури яєць включає їх відмивання від сторонніх решток дистильованою водою або фізіологічним розчином з використанням склянок об'ємом 50 мл й гумової груші, а культивування яєць здійснюється в термостаті за постійної температури 25 °С на годинниковому скельці з субстратом, як таке використовується

5

мікробіологічне середовище Мюллера-Хінтона, періодично зволожуючи культуру розчином стрептоциду.

Спосіб виконують наступним чином.

Після отримання щільної фекальної культури яєць нематод *Trichuris vulpis* їх ретельно 7-8 разів відмивають дистильованою водою або фізіологічним розчином. Відмиту культуру яєць переносять на годинникове скло із заздалегідь підготовленим субстратом. Як субстрат використовують середовище Мюллера-Хінтона, яке заздалегідь розливають у годинникові скельця та охолоджують.

10

Годинникове скельце з культурою яєць поміщають в скляну чи пластикову чашку Петрі, на дно такої чашки розміщують ватний диск зволожений фізіологічним розчином. Чашку Петрі закривають, і в такому стані поміщають у термостат для культивування. Оптимальна температура для проведення культивування складає 25 °С, а процес ембріогенезу відбувається 22 доби. Щоденно чашки з культурами відкривають для проведення аерації, окрім того, за потреби здійснюють зволоження як самої культури яєць, так й ватного диска 0,5 % розчином стрептоциду для підтримання вологості та попередження росту на середовищі мікроорганізмів.

15

Приклад конкретного виконання.

З метою встановлення ефективності запропонованого способу культивування яєць в лабораторних умовах проведено експериментальне дослідження, в якому порівняли запропонований спосіб із способом найближчим аналогом при використанні однакового температурного режиму (25 °С). Було проведено 10 дослідів аналогів, в яких культивували яйця *T. vulpis*, у різних субстратах за різними способами:

20

- "спосіб культивування яєць нематод *Passalurus ambiguus*" з використанням як субстрату для культивування тіогліколевого середовища (спосіб найближчий аналог);

- спосіб культивування яєць нематод *Trichuris vulpis* з використанням як субстрату для культивування середовища Мюллера-Хінтона (пропонований спосіб).

30

Оцінювання проводили за показниками кількості інвазійних яєць (з личинкою в середині), та яєць, що загинули або зупинилися в розвитку на кінець 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.

35

Таблиця

Порівняльна ефективність способів культивування яєць *T. vulpis* ( $x \pm SD$ ,  $n=100$ )

Спосіб дослідження	Кількість яєць на кінець досліду, екз.			% яєць, що не досягли інвазійної стадії
	інвазійних	зупинилося в розвитку	загинуло	
Найближчий аналог	81,50±4,25***	13,70±4,19***	4,80±1,93**	18,5
Пропонований	92,20±3,52	5,50±3,57	2,30±1,25	7,8

Примітка: \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  - порівняно з показниками пропонованого способу.

Проведеними дослідженнями встановлено, що за використання з метою культивування яєць *Trichuris vulpis* способу аналога "Спосіб культивування яєць нематод *Passalurus ambiguus*" зі 100 яєць в культурі у середньому 81,50±4,25 екз. яєць розвинулися до інвазійної стадії. Поряд із цим, кількість яєць, що не досягли інвазійної стадії становила 18,5 %. З них 13,70±4,19 й 4,80±1,93 екз. яєць зупинилися в розвитку та загинули відповідно.

40

За використання пропонованого способу (спосіб культивування яєць нематод *Trichuris vulpis*) на 100 підрахованих яєць в культурі у середньому 92,20±3,52 екз. розвинулося до інвазійної стадії, що на 11,61 % більше порівняно зі способом аналогом ( $p < 0,001$ ). Використання пропонованого способу сприяло зменшенню кількості яєць, що не досягли інвазійної стадії до 7,8 %. З яких 5,50±3,57 й 2,30±1,25 екз. яєць зупинилися в розвитку та загинули відповідно, що на 59,85 % ( $p < 0,001$ ) й 52,08 % ( $p < 0,01$ ) менше порівняно зі способом аналогом.

45

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

- отримати в дослідній культурі високий вихід інвазійних яєць (на 11,61 %) порівняно зі способом аналогом;
- 5 - знизити відсоток яєць, що зупинилися в розвитку та загинули (на 59,85 та 52,08 % відповідно);
- проводити мікроскопію дослідних зразків та здійснювати мікрофотозйомку безпосередньо на годинниковому скельці без вилучення яєць із субстрату.

10

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15

Спосіб культивування яєць нематод *Trichuris vulpis*, який включає отримання культури яєць *Trichuris vulpis* з фекалій від хворих собак, відмивання отриманих яєць від сторонніх решток дистильованою водою або фізіологічним розчином (з використанням склянок, гумових груш) та культивування отриманих яєць у термостаті, за постійної температури, який **відрізняється** тим, що культивування здійснюють в годинникових скельцях, а як субстрат, на якому культивують яйця *Trichuris vulpis*, використовують мікробіологічне середовище Мюллера-Хінтона, яке періодично зволожують розчином стрептоциду для попередження пересихання культури яєць та росту на ньому мікроорганізмів.

20