



УКРАЇНА

(19) UA (11) 66144 (13) U
(51) МПК
G01N 33/487 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВАЦІЇ ІНВАЗІЙНИХ ЯЄЦЬ РОДУ ТОХОСАГА ТА ЗАРАЖЕННЯ НИМИ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

1

2

(21) u201106850

(22) 31.05.2011

(24) 26.12.2011

(46) 26.12.2011, Бюл.№ 24, 2011 р.

(72) ДОВГІЙ ЮРІЙ ЮРІЙОВИЧ, ФЕЩЕНКО ДІАНА ВАЛЕРІЇВНА, КОРЯЧКОВ ВІКТОР АНАТОЛІЙОВИЧ, ЗГОЗІНСЬКА ОКСАНА АНАТОЛІЇВНА, БАХУР ТЕТЯНА ІВАНІВНА, ДРАГАЛЬЧУК АНАТОЛІЙ ІВАНОВИЧ

(73) ЖИТОМИРСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРОЕКОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) 1. Спосіб культивування інвазійних яєць роду Тохосага та зараження ними лабораторних тварин, що включає виділення незрілих яєць токсокар безпосередньо із статевозрілих самок, одержаних в результаті дегельмінтизації хворих тварин, шляхом подрібнення і гомогенізації тканин трупів токсокар, промивку шляхом центрифугування тричі з 0,5 N розчином їдкого натру та ще тричі з фізрозчином, долив в отриману суспензію рідини Барбагалло та розлив до чашок Петрі, вистелених фільтрувальним папером, постановку на інкубацію до термостата, витримання в останньому до досягнення яйцями стадії інвазійності, змивання інкубованих яєць фізрозчином з фільтрувального паперу, подвійну промивку змиву фізрозчином з центрифугуванням, додавання до останнього осаду 2 % крохмального гелю, визначення концентра-

ції життєздатних інвазійних яєць і зараження піддослідних тварин, який **відрізняється** тим, що дегельмінтизацію хворих на токсокароз тварин проводять солями піперазину, а подрібнюють і гомогенізують цілі трупи самок токсокар, причому процес інкубації проводять при температурі 23-27 °С впродовж 22-30 діб, контролюючи їх розвиток кожні 5-8 діб і додаючи під час контролю до кожної чашки Петрі по 1,5-2,5 мл розчину, що містить рідину Барбагалло та фізрозчин 1,8-2,2:1, при цьому проводять контроль розвитку яєць мікроскопічно до повного формування інвазійних яєць токсокар, в яких личинки видовжені і тісно розміщені в оболонці, рухи активні і різноманітні - як окремими частинами, так і колові всім тілом, а зараження піддослідних тварин проводять пероральним шляхом, змішуючи суспензію інвазійних яєць з невеликою кількістю корму з низькою вологістю та згодуюючи індивідуальним методом лабораторним тваринам.

2. Спосіб культивування інвазійних яєць роду Тохосага та зараження ними лабораторних тварин за п. 1, який **відрізняється** тим, що процес інкубації проводять при температурі 24 °С впродовж 28 діб, контролюючи їх розвиток кожні 7 діб і додаючи під час контролю до кожної чашки Петрі по 2 мл розчину, що містить рідину Барбагалло та фізрозчин 2:1.

Корисна модель належить до галузі сільського господарства, а саме до ветеринарної паразитології, до способів культивування інвазійних яєць методом роду Тохосага, з метою проведення подальших досліджень особливостей даного збудника. Може бути використана для зараження лабораторних тварин інвазійними яйцями токсокар для вивчення патогенезу та способів лікування токсокарозу, а також для вивчення впливу дезінвазійних розчинів на яйця токсокар в навколишньому середовищі.

У паразитології відомі методи виділення яєць токсокар шляхом вимивання їх з ґрунту та об'єктів навколишнього середовища, в якому відбувається

природне дозрівання (див. Котельников Г.А. Диагностика гельмінтозов животных. - М.: Колос, 1974. - С. 70-71).

Однак, цей метод досить простий, але ненадійний. Яйця, що отримуються таким шляхом, знаходяться на різних стадіях розвитку і лише незначна їх кількість є зрілими (інвазійними). Окрім того, таким чином неможливо отримати чисту культуру яєць токсокар, оскільки до неї потрапляють і яйця інших гельмінтів, а також стороння мікрофлора. Ці фактори не дозволяють досліджувати токсокар в чистому вигляді.

У гуманній медицині відомий спосіб, розроблений Вл. Я. Бекишем. Токсокар відбирали після

UA (11) 66144 (13) U

дегельмінтизації хворих на токсокароз собак та поміщали в теплий 0,9 % розчин NaCl. Після ретельної промивки в 0,9 % розчин хлориду натрію токсикар розтирали, брали матки і поміщали в фарфорові ступки з 0,5 N розчином їдкого натру. Потім додавали невелику кількість кварцового піску і ретельно розтирали до отримання гомогенної суспензії. Гомогенний розчин поміщали в поліетиленові пробірки, доводили об'єм до 15 мл 0,5 N розчином їдкого натру і центрифугували 5 хвилин при 1500 об/хв. Супернатант видаляли, отриманий осад промивали два рази 0,5 N розчином їдкого натру, а потім тричі 0,9 % розчином хлориду натрію шляхом центрифугування при 1500 об/хв по 5 хвилин. Після останнього промивання супернатант видаляли. До осаду додавали 5 мл рідини Барбагалло і ретельно збовтували. Завись розливали в чашки Петрі, що вистелені фільтрувальним папером. В кожну чашку додатково додавали по 3 мл рідини Барбагалло. Чашки закривали і поміщали в термостат на 30 днів при температурі 24 °C. Розвиток личинок в яйцях контролювали шляхом аналізу тимчасових препаратів на мікроскопі при збільшенні $\times 200$. Через 24-28 днів культивування яйця ставали інвазійними. Для зараження тварин робили змив 0,9 % розчином хлориду натрію з фільтрувального паперу, на якому знаходились яйця. Суспензію двічі промивали ізотонічним розчином NaCl шляхом центрифугування по 5 хвилин при 1500 об/хв. Після останньої промивки супернатант видаляли, а до осаду додавали 10 мл 2 % крохмального гелю. Після ретельного збовтування в отриманій суспензії визначали концентрацію інвазійних яєць. Враховували лише запліднені яйця з цілими оболонками, що містять живих личинок токсикар. Для отримання кінцевої концентрації завись яєць розводили 2 % крохмальним гелем так, щоб в 1 мл містилась потрібна доза яєць для зараження лабораторних тварин. Завись яєць в крохмальному гелі вводили тваринам в шлунок туберкуліновим шприцом з залізною оливою на кінці голки. Отримували чисту культуру інвазійних яєць токсикар (див. Бекиш Вл.Я., Бекиш Л.Э., Колмогоров В.И. Экспериментальная модель висцерального токсокароза / Теоретич. и практические вопросы медицины и фармации. Матер. конф. студ. и молодых ученых. - Витебск, 2000. - С. 26-29).

Однак цей спосіб є досить клопітким, пов'язаний з великими втратами життєздатних яєць через застосування для отримання статевозрілих самок токсикар антигельмінтиків системної дії (вони потрапляють в тканини тіла гельмінта та призводять до загибелі значної кількості яєць). Процес зараження потребує спеціального обладнання та навичок виконавця, він не виключає загибелі лабораторної тварини під час нього та недостовірності ефективності зараження.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу культивування інвазійних яєць роду *Toxosaga* та зараження ними лабораторних тварин, при якому проводиться спрощення та оптимізація маніпуляцій, що приводить до підвищення кількості отримуваних інвазійних яєць в чистій культурі, з одночасним підвищенням зручності

процесу зараження лабораторних тварин яйцями токсикар та зниженням вірогідності загибелі тварини в процесі зараження, та виключення можливості "холостого" зараження.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що при здійсненні способу культивування інвазійних яєць роду *Toxosaga* та зараження ними лабораторних тварин, що включає виділення незрілих яєць токсикар безпосередньо із статевозрілих самок, одержаних в результаті дегельмінтизації хворих тварин, шляхом подрібнення і гомогенізації тканин трупів токсикар, промивку шляхом центрифугування тричі з 0,5 N розчином їдкого натру та ще тричі з фізрозчином, долив в отриману суспензію рідини Барбагалло та розлив до чашок Петрі, вистелених фільтрувальним папером, постановку на інкубацію до термостата, витримання в останньому до досягнення яйцями стадії інвазійності, змивання інкубованих яєць фізрозчином з фільтрувального паперу, подвійну промивку змиву фізрозчином з центрифугуванням, додавання до останнього осаду 2 % крохмального гелю, визначення концентрації життєздатних інвазійних яєць і зараження піддослідних тварин, відповідно до корисної моделі, дегельмінтизацію хворих на токсокароз тварин проводять солями піперазину, а подрібнюють і гомогенізують цілі трупи самок токсикар, причому процес інкубації проводять при температурі 23-27 °C впродовж 22-30 діб, контролюючи їх розвиток кожні 5-8 діб і додаючи під час контролю до кожної чашки Петрі по 1,5-2,5 мл розчину, що містить рідину Барбагалло та фізрозчин 1,8-2,2:1, при цьому проводять контроль розвитку яєць мікроскопічно до повного формування інвазійних яєць токсикар, в яких личинки видовжені і тісно розміщені в оболонці, рухи активні і різноманітні - як окремими частинами, так і колові всім тілом, а зараження піддослідних тварин проводять пероральним шляхом, змішуючи суспензію інвазійних яєць з невеликою кількістю корму з низькою вологістю та згодовуючи індивідуальним методом лабораторним тваринам.

При цьому процес інкубації може бути проведений при температурі 24 °C впродовж 28 діб, протягом яких контролюють розвиток яєць кожні 7 діб, додаючи під час контролю до кожної чашки Петрі по 2 мл розчину, що містить рідину Барбагалло та фізрозчин 2:1.

Солі піперазину було вибрано з тієї причини, що вони ефективно діють проти нематод, викликаючи у них параліч м'язів. При цьому вони не вбивають паразитів і не призводять до руйнування їх тіл. А отже, і яйця в матках самок залишаються непошкодженими та життєздатними.

Збирання статевозрілих токсикар у фізрозчин (0,9 % розчин хлориду натрію) та промивання ним необхідне з тієї причини, що він перешкоджає висушуванню та деформації тіл гельмінтів.

Представників різних статей токсикар розрізняють між собою за розмірами - самки значно крупніше за самців. Окрім того, останні мають добре виражений закручений хвостовий кінець та пікоподібне розширення на головному (специфічна ознака токсикар).

Подрібнення і гомогенізація цілих трупів самок токсокар дозволяє максимально спростити маніпуляції та виключити клопіткий процес розтину, що не зашкоджує вирішенню зазначеної задачі.

Проведення процесу інкубації при температурі 23-27 °C впродовж 22-30 діб, контролюючи їх розвиток кожні 5-8 діб і додаючи під час контролю до кожної чашки Петрі по 1,5-2,5 мл розчину, що містить рідину Барбагалло та фізрозчин 1,8-2,2:1, дозволяє попередити деформацію та пошкодження стінок яєць, а за такої концентрації формаліну пригнічується розвиток мікроорганізмів у суспензії, при цьому не завдаючи шкоди об'єкту інкубації.

Проведення контролю розвитку яєць мікроскопічно до повного формування інвазійних яєць токсокар, в яких личинки видовжені і тісно розміщені в оболонці, рухи активні і різноманітні - як окремими частинами, так і колові всім тілом, дозволяє контролювати перебіг процесу інкубації.

Під час контролю розвитку на 7-ий день процесу інкубації під мікроскопом чітко видно, які яйця розвиваються, а які завмерли. Ті, що були нежиттєздатними і не піддалися інкубації, мають вигляд оболонки з чітко вираженим круглим затемненням всередині. Яйця, що розвиваються, мають затемнення ниркоподібної форми. На строці інкубації 14 діб личинки, що розвиваються, мають кільцеву форму. При спостереженні під мікроскопом чітко видно окремі рухи личинок під оболонками. Через 21 добу після початку процесу інкубації личинки мають видовжену форму і закручені в оболонці у вигляді равлика або спіралі. Має бути помічено досить активні і різноманітні рухи личинок. На 28 добу під мікроскопом бачимо інвазійні, повністю сформовані яйця токсокар. Личинки ще більш видовжені і тісніше розміщені в оболонці. Рухи личинок активні і різноманітні - як окремими частинами, так і колові всім тілом.

Проведення зараження піддослідних тварин пероральним шляхом, змішуючи суспензію інвазійних яєць з невеликою кількістю корму з низькою вологістю та згодовуючи індивідуальним методом лабораторним тваринам, є найбільш простим методом, що не потребує спеціальних навичок та обладнання, тобто є зручним та знижує вірогідність загибелі тварини в процесі зараження, виключаючи можливість "холостого" зараження.

Якщо для зараження лабораторних тварин в ідеалі застосовувати гранульований корм з мінімальним вмістом вологи, це дозволить крохмальному гелю потрапити у всі шари корму.

Застосування пропонованого способу культивування інвазійних яєць роду *Toxosara* та зараження ними лабораторних тварин дозволяє забезпечити наступний технічний результат:

- спрощуються та оптимізуються лабораторні маніпуляції, що проводяться при здійсненні способу;

- підвищується вихід отримуваних життєздатних інвазійних яєць в чистій культурі в процесі інкубації;

- отримують чисту від сторонніх збудників інфекційних та інвазійних хвороб культуру, придатну для застосування з метою проведення досліджень в чистому вигляді;

- знижується вірогідність відходу лабораторних тварин при їх зараженні яйцями токсокар або проведення "холостого" зараження.

Крім того:

- здійснення способу є простим, для нього не потрібні дефіцитні та дорогі прилади і витратні матеріали;

- зменшуються затрати робочого часу лаборанта.

На фото представлені етапи проведення здійснення способу. На фото 1 - відібрані екземпляри статевозрілих токсокар (самка - зверху, самець - знизу). На фото 2 - центрифугальні пробірки з робочою суспензією в процесі промивань. На фото 3 представлено неінвазійне яйце токсокари до проведення інкубації. На фото 4-6 зображені яйця токсокар після 7-, 14-, та 21-денної інкубації, відповідно. На фото 7 - повністю сформовані, інвазійні та готові до зараження яйця токсокар.

Спосіб здійснювали з використанням яєць, отриманих безпосередньо від статевозрілих самок токсокар. Процес інкубації проводили з використанням різних температурних режимів.

Конкретні приклади застосування способу.

Приклад 1

Для отримання статевозрілих токсокар відбираються хворі тварини віком 1,5-6 місяців, що ніколи не отримували антигельмінтних засобів. Шляхом дослідження фекалій одним з копроскопічних методів встановлюється наявність токсокар в організмі. Проводиться дегельмінтизація тварин сіллю піперазину в дозі 0,2 г/кг маси тіла одноразово. Солі піперазину вибрано з тієї причини, що вони ефективно діють проти нематод, викликаючи у них параліч м'язів. При цьому вони не вбивають паразитів і не призводять до руйнування їх тіл. А отже, і яйця в матках самок залишаються непошкодженими та життєздатними.

Токсокари, які виходять з калом, збирають впродовж 10-ти годин у посудину з фізрозчином (0,9 % розчин хлориду натрію, що перешкоджає висушуванню та деформації тіл гельмінтів) та диференціюють за статтю. Представників різних статей токсокар розрізняють між собою за розмірами - самки значно крупніші за самців. Крім того, останні мають добре виражений закручений хвостовий кінець та пікоподібне розширення на головному кінці (специфічна видова ознака токсокар).

Самок токсокар ретельно промивають 0,9 % розчином хлориду натрію (по 8-10 особин на кожну серію маніпуляцій), ножицями розрізають на дрібні шматочки та поміщають до фарфорової ступки. Подрібнення і гомогенізація цілих трупів самок токсокар дозволяє максимально спростити маніпуляції та виключити клопіткий процес розтину, що не зашкоджує вирішенню зазначеної задачі. Після додавання 10 мл 0,5 N розчину їдкого натру та очищеного прокаленого піску (3 г) розтирають до отримання гомогенної суспензії. Отриману суспензію переливають у пластикові центрифугальні пробірки та доливають 0,5 N розчин їдкого натру до об'єму 15 мл. Суміш центрифугують впродовж 5 хвилин при швидкості 1,5 тис. об/хв. Після зняття супернатанту в об'ємі 8 мл за допомогою піпетки, знову доводять розчином їдкого натру об'єм до 15

мл і маніпуляцію двічі повторюють. Далі ще тричі повторюють описані дії, замінивши 0,5 N розчин їдкою натру на 0,9 % розчин хлориду натрію. Після останнього зняття супернатанту до осаду додають 8 мл 3 % розчину формаліну, приготованого на фізрозчині (рідина Барбагалло). Попередньо готують стерильні чашки Петрі, які вистилають фільтрувальним папером. До них, після ретельного збовтування пробірок, виливають отриману суспензію. Процес інкубації проводять у термостаті при температурі 24 °C впродовж чотирьох тижнів, контролюючи їх розвиток кожні 7 діб. Під час контролю щотижня додають до кожної чашки Петрі по 2 мл розчину, що містить рідину Барбагалло та фізрозчин у співвідношенні 2:1. Це дозволяє попередити деформацію та пошкодження стінок яєць, а за такої концентрації формаліну пригнічується розвиток мікроорганізмів у суспензії, при цьому не завдаючи шкоди об'єкту інкубації.

На 7-му, 14-ту, 21-шу і 28-му добу інкубації проводять контроль їх розвитку: бактеріологічною петлею краплю розчину із чашки Петрі наносять на предметне скло та мікроскопують. Під час контролю розвитку на 7-ий день процесу інкубації під мікроскопом чітко видно, які яйця розвиваються, а які завмерли. Ті, що були нежиттєздатними і не піддалися інкубації, мають вигляд оболонки з чітко вираженим круглим затемненням всередині. Яйця, що розвиваються, мають затемнення ниркоподібної форми. На строці інкубації 14 діб личинки, що розвиваються, мають кільцеву форму. При спостереженні під мікроскопом чітко видно окремі рухи личинок під оболонками. Через 21 добу після початку процесу інкубації личинки мають видовжену форму і закручені в оболонці у вигляді равлика або спіралі. Мають бути помітні досить активні і різноманітні рухи личинок. На 28 добу під мікроскопом видно інвазійні, повністю сформовані яйця токсокар. Личинки ще більш видовжені і тісніше розміщені в оболонці. Рухи личинок активні і різноманітні - як окремими частинами, так і колові всім тілом.

Для зараження тварин на 28-30 добу роблять змив 0,9 % розчином хлориду натрію з фільтрувального паперу, на якому знаходяться яйця. Суспензію двічі промивають ізотонічним розчином NaCl шляхом центрифугування по 5 хвилин при 1500 об/хв. Після останньої промивки супернатант видаляють, а до осаду додають 10 мл 2 % крохмального гелю. Після ретельного збовтування в отриманій суспензії визначають концентрацію інвазійних яєць. Враховують лише життєздатні дозрілі яйця, що містять живих рухливих личинок. Потім відбирають 5 проб по 0,1 мл кожна. Їх тонким шаром наносять на предметні скельця. Під

мікроскопом визначають кількість життєздатних яєць у кожній пробі. Шляхом множення отриманої кількості на 10 визначають вміст інвазійних яєць у 1 мл та виводять середню арифметичну кількість яєць у 5-ти пробах. Отримана цифра є робочою для подальшого розведення суспензії до потрібної концентрації яєць. Потім необхідну для зараження однієї тварини кількість суспензії, отриманої після розведення 2 % крохмальним гелем, додають до незначної кількості корму для тварин. Ретельно перемішують та через 30 хвилин згодовують лабораторним тваринам індивідуальним методом. Проведення зараження піддослідних тварин пероральним шляхом, змішуючи суспензію інвазійних яєць з невеликою кількістю корму з низькою вологістю та згодовуючи індивідуальним методом лабораторним тваринам, є найбільш простим методом, що не потребує спеціальних навичок та обладнання, тобто є зручним та знижує вірогідність загибелі тварини в процесі зараження, виключаючи можливість "холостого" зараження. Для зараження лабораторних тварин в ідеалі слід застосовувати гранульований корм з мінімальним вмістом вологи - це дозволить крохмальному гелю потрапити у всі шари корму.

При дотриманні умов даного прикладу досягається максимальний вихід інвазійних яєць при тривалості інкубації 26-28 діб.

Приклад 2

Маніпуляції проводили за тією ж схемою. При цьому температурний режим становив 23 °C. В результаті строк інкубації зростає до 28-32 діб та зменшується вихід життєздатних інвазійних яєць в порівнянні з прикладом 1.

Приклад 3

Маніпуляції проводили за схемою в прикладі 1. При цьому температурний режим становив 25 °C. В результаті строк інкубації скорочується до 23-26 діб, але знижується вихід життєздатних інвазійних яєць в порівнянні з прикладом 1.

Приклад 4

Маніпуляції проводили за схемою в прикладі 1. При цьому температурний режим становив 26 °C. В результаті строк інкубації скорочується до 24-27 діб, але значно знижується вихід життєздатних інвазійних яєць в порівнянні з прикладом 1.

Приклад 5

Маніпуляції проводили за схемою в прикладі 1. При цьому температурний режим становив 27 °C. Строк інкубації, як і в прикладі 4, становить 23-26 діб, але при цьому вихід життєздатних інвазійних яєць ще менший.

Отримані результати тривалості та ефективності процесу інкубації яєць токсокар за різних температурних режимів представлені в таблиці.

Таблиця

Приклад	Температурний режим процесу інкубації, °C	Тривалість процесу інкубації, діб	Вихід життєздатних інвазійних яєць, шт./мл
1	24	26-28	987-1089
2	23	28-32	837-1010
3	25	24-27	817-985
4	26	23-26	728-893
5	27	23-26	702-774

Отже, проведення дослідження за прикладом 1 є оптимальним, адже дозволяє мінімізувати три-

валість інкубації, отримавши максимальний вихід життєздатних інвазійних яєць.

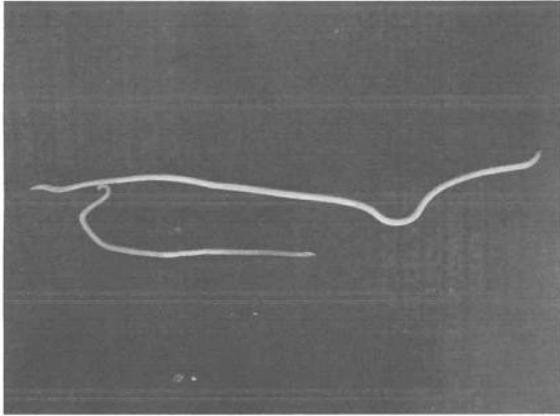


Фото 1

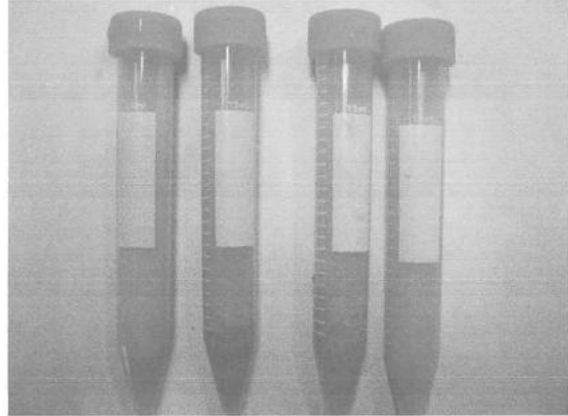


Фото 2

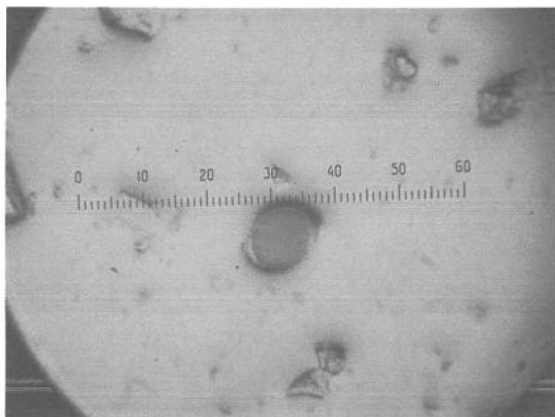


Фото 3

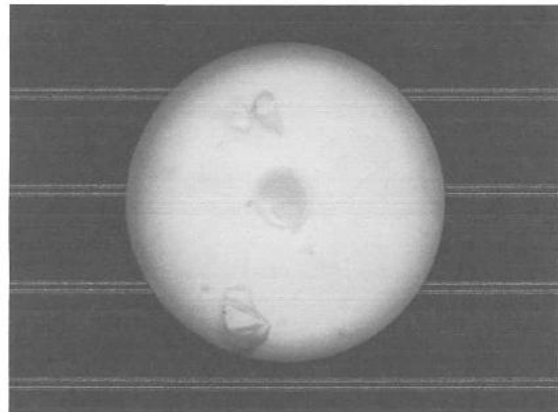


Фото 4

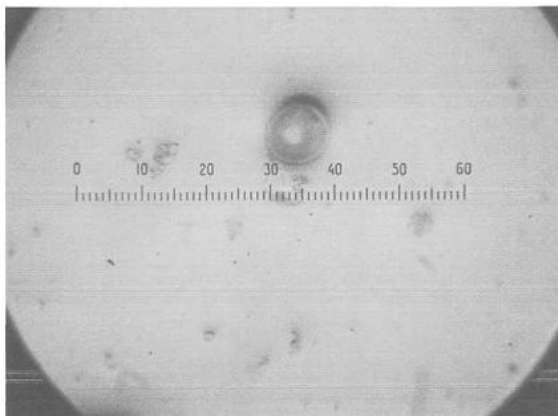


Фото 5

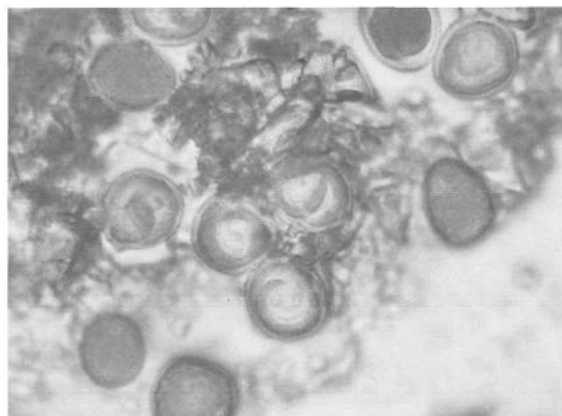


Фото 6

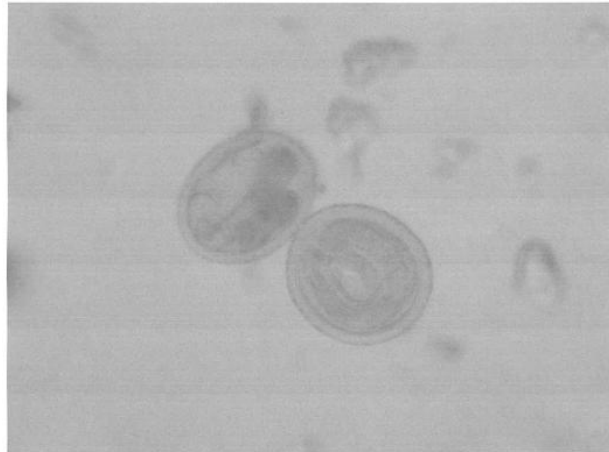


Фото 7