

УДК 619:616.995.

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДУ КІЛЬКІСНОГО ПІДРАХУНКУ ЛИЧИНОК НЕМАТОД

ЄВСТАФ'ЄВА В. О., д. вет. н.¹
ШЕНДРИК Л. І., к. біол. н.²
ШЕНДРИК Х. М., к. вет. н.²
ШЕНДРИК І. М., к. вет. н.²
ГУТОСЬЯН Ю. А., аспірант¹

¹Полтавська державна аграрна академія, м. Полтава,
²Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро
y.gutosyan@gmail.com

Представлено удосконалений метод кількісного підрахунку личинок нематод з використанням лічильної сітки, нанесеної на дно чашки Петрі. Визначено ефективність запропонованого способу порівняно із загальноприйнятою методикою за В. І. Орловим. Встановлено високу діагностичну ефективність удосконаленого кількісного методу за стронгілоїдозу та стронгілоїдозі коней.

Ключові слова: гельмінтоларвоскопія, діагностика, інтенсивність інвазії, стронгілоїдоз, стронгілоїдоз.

Вступ. Гельмінти, локалізуючись в різних тканинах та органах, виділяють велику кількість яєць та личинок, які переважно з фекаліями виходять у навколишнє середовище [3]. З метою виділення і знаходження збудників гельмінтозів запропоновано значну кількість гельмінтоларвоскопічних методів досліджень, заснованих переважно на виявленні личинок, без кількісного їх підрахунку [1, 3]. Найбільш відомим і універсальним є метод Бермана (1917) та його модифікації, що базуються на термотропізмі та гідротропізмі личинок нематод [3]. Ряд авторів: Мачульский С. Н., Шабазев В. А., Фоміна І. М. (1977), Корчан Л. М., Корчан М. І. (2011), з метою виділення личинок пропонують використовувати спеціальні тиглі або поліпропіленові стаканчики [2, 3]. Відомі способи виділення личинок стронгілоїдесів за допомогою копрогельмінтоларвоскопічних кілець (за С. І. Пономарем, Н. М. Сорокою, 2007) [1, 7].

Кількісні методи діагностики дають можливість визначити ступінь ураження тварин і провести оцінку ефективності лікування. З метою проведення кількісного підрахунку личинок нематод, використовують ряд методів, які передбачають застосування спеціальних лічильних камер (камера Довгія, 2004; камери БДАУ, 1997 та ін.) або складних підрахунків з визначенням об'єму дослідного матеріалу, кількості полів зору мікроскопа у чашці Петрі

або годинниковому склі (метод І. В. Орлова, 1937) [1, 4, 6]. Недоліками цих методів є складність підрахунку кількості личинок у разі високої та середньої інтенсивності інвазії та необхідність наявності авторської лічильної камери.

Мета досліджень полягала в удосконаленні методів кількісного підрахунку личинок нематод та порівнянні запропонованого методу із загальновідомим.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили в умовах лабораторій кафедр паразитології та ветеринарно-санітарної експертизи Полтавської державної аграрної академії та Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. Матеріалом для досліджень слугували проби фекалій коней спонтанно уражених збудниками гельмінтозів. Культивування личинок стронгілат та рабдітат коней здійснювали за методом Величкіна П. А. [3].

На першому етапі досліджень проводили виділення личинок за загальноприйнятим гельмінтоларвоскопічним методом Бермана [1]. Для кількісного підрахунку личинок застосовували метод Орлова І. В. [4] та удосконалений спосіб [5]. При порівнянні методів діагностики враховували кількість виділених личинок в 1 г фекалій, зручність проведення досліджень та затрати часу на їх проведення.

Результати та їх обговорення. Запропоно-

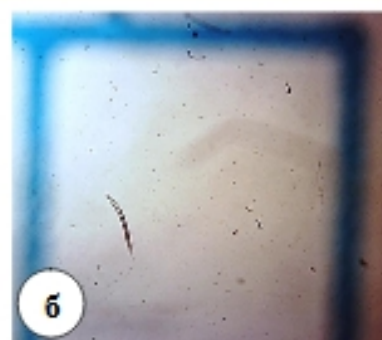
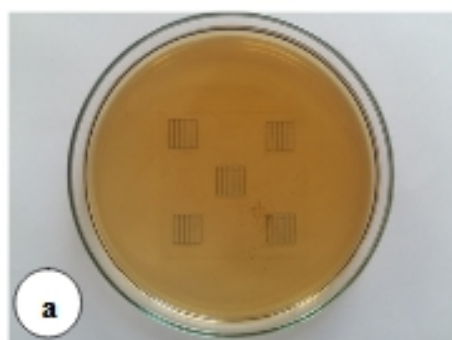


Рисунок. Чашка Петрі з нанесеною лічильною сіткою:
а – загальний вигляд; б – проведення підрахунку кількості личинок ($\times 40$)

ваний метод кількісного підрахунку личинок нематод передбачає використання спеціальної лічильної сітки нанесеної на дно чашки Петрі, що складається з 5 квадратів розміром 1×1 см. Всередині квадрати поділені на 5 рівних паралельних доріжок довжиною 10 мм, шириною 0,2 мм. Розмір доріжок спеціально підібраний для того, щоб за збільшення мікроскопа $\times 40$ або $\times 100$, проглядалися їх краї, що дає змогу легше підраховувати кількість личинок (рисунок).

З метою підрахунку личинок, отриману в результаті дослідження за методом Бермана рідину вливають до чашки Петрі, висота стовпа рідини не повинна перевищувати 0,5–0,7 см: у такому шарі легко проглядаються личинки гельмінтів. Оскільки личинки активно рухаються, що ускладнює їх підрахунок, то перед дослідженням їх знерухоплюють. Для цього до рідини додають 1–2 краплі 0,1 % розчину йоду або 1–2 краплі 3 % водного розчину формаліну. Далі, поступово переглядаючи доріжки квадратів, ведуть підрахунок загальної кількості виявлених личинок (рис.). Площа п'яти квадратів складає 5 см^2 . Далі загальну площу чашки Петрі ділять на площу квадратів, пере-

множуючи отримане число на кількість виявлених личинок. Це число відповідно буде загальною кількістю личинок, що знаходиться у рідині. Отриману кількість личинок ділять на кількість г фекалій, які були закладені у апарат Бермана.

Викладене вище можна представити у вигляді формули:

$$M = \frac{\left(\frac{D}{d}\right) \times n}{g}$$

де: M – кількість личинок в 1 г фекалій, D – площа чашки Петрі, d – площа квадратів, n – кількість знайдених личинок, g – кількість г фекалій закладених у апарат Бермана.

Ефективність запропонованого способу підтверджували у лабораторних умовах, провівши його порівняння з прототипом – методом І. В. Орлова. З цією метою проведено дослідження 30 проб фекалій коней. Результати наведені у таблиці.

Як видно з даних таблиці, середні значення кількості личинок різняться: запропонованим методом виявлено більшу кількість личинок

Таблиця. Порівняння ефективності кількісних ларвоскопічних методів діагностики стронгілідозів та стронгілоїдозу коней, ($n=30$)

Метод дослідження	П, лич /г фекалій $M \pm m$	Час витрачений на проведення підрахунку личинок, хв
Орлова І. В.	$190,92 \pm 46,23$	5–15
Удосконалений метод	$221,44 \pm 51,40$	5–20

(на 13,78 %). Водночас, простішим є і перерахунок кількості личинок в 1 г фекалій. Для більшої зручності постійно використовують чашки Петрі однакового діаметру, що дає можливість зменшити кількість повторних обчислень.

Висновок.

Запропонований метод підрахунку кількості личинок стронгілід та рабдітат у 1 г фекалій з використанням лічильної сітки, нанесеної на дно чашки Петрі, перевищує відомі методи за

ефективністю визначення рівня інтенсивності інвазії, зручністю виконання, що дозволяє рекомендувати удосконалений метод для застосування у практичній лабораторній діагностиці за масових паразитологічних гельмінтоларвоскопічних досліджень.

Перспективи подальших розробок. В подальшому планується проведення удосконалення методів гельмінтоларвоскопії зі створенням методу одночасного культивування та виділення личинок нематод.

ЛІТЕРАТУРА

1. Довідник з лабораторних методів діагностики інвазійних хвороб тварин / [С.І. Пономар, Л.П. Артеменко, О.П. Литвиненко, В.П. Гончаренко]; за ред. С.І. Пономаря. – Біла Церква, 2011. – 152 с.
2. Корчан Л.М. Порівняльна ефективність окремих гельмінтоларвоскопічних способів діагностики легеневих нематодозів у дрібної рогатої худоби / Л.М. Корчан, М.І. Корчан // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2011. – № 3. – С. 117–119.
3. Котельников Г.А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды: [справочник] / Котельников Г.А. – М.: Колос, 1983. – 208 с.
4. Маркевич А.П. Методы изучения паразитологической ситуации и борьбы с паразитами сельскохозяйственных животных / Маркевич А.П. – К.: АН УССР, 1961. – 352 с.
5. Патент на корисну модель № 112387, Україна МПК (2016.01) у 2016 07249 А61 В10/00 Спосіб кількісного підрахунку личинок нематод / Ю.А. Гутосьян, В.О. Євстаф'єва, Л.І. Шендрік, Х.М. Шендрік, І.М. Шендрік; заявник і патентовласник Ю.А. Гутосьян, В.О. Євстаф'єва, Л.І. Шендрік, Х.М. Шендрік, І.М. Шендрік – заявл. 04.07.2016; опубл. 12.12.2016, Бюл. № 23.
6. Патент на корисну модель № 58688 Україна, МПК А61В10/00, G01N33/487. Пристрій для реєстрації яєць і мертвих личинок гельмінтів (камера Довгія) / Ю.Ю. Довгий, І.Л. Ваховський, О.Ф. Дідківський, О.В. Журавльова, В.Д. Журавльов; заявник і патентовласник Наук. центр з вивчення особливо небезпечних хвороб тварин Держ. агрокол. ун-ту. – № 2002075510 ; заявл. 04.07.2002; дата публікації 15.11.2004, Бюл. № 11.
7. Пономар С.І. Ефективність комплексного підходу за постановки діагнозу на стронгілоїдоз / С.І. Пономар, В.П. Гончаренко, О.В. Кручиненко, Х.М. Шендрік //

Науковий вісник ветеринарної медицини Білоцерківського національного аграрного університету. – 2014. – Вип. 13 (108). – С 190 – 193.

REFERENCES

- Ponomar, S. I., Artemenko, L. P., Lytvynenko, O. P. & Honcharenko, V. P. (2011) *Dovidnyk z laboratornykh metodiv diahnozyky invazyiynykh khvorob tvaryn*. S.I. Ponomaryia (Ed.). Bila Tserkva, 152 [in Ukraine].
- Korchan, L.M. & Korchan, M.I. (2011). Porivnyal'na efektyvnist' okremykh hel'mintolavroskopych-nykh sposobiv diahnozyky lehenevykh nematodoziv u dribnoyi rohatoyi khudoby. *Visnyk Poltav's'koyi derzhavnoyi ahroaranoi akademiji*, 3, 117–119 [in Ukraine].
- Kotel'nykov, H. A. (1983) *Hel'myntologicheskye issledovaniya zhyvotnykh y okruzhayushchey sredy*. *Spravochnik*. Moskva: Kolos, 208 [in Russian].
- Markevych, A. P. (1961). *Metody yzuchenyya parazytologicheskoy situatsyy y bor'by s parazytozamy sel'skokhozyaystvennykh zhyvotnykh*. Kiev: AN USSR, 352 [in Russian].
- Huhos'yan, Yu. A., Yevstaf'yeva, V. O., Shendryk, L. I., Shendryk, Kh. M. & Shendryk, I. M. (2016) Patent na korysnu model' № 112387, Ukrayina MPK (2016.01) u 2016 07249 A61 B10/00 Sposib kil'kysnoho pidrahunku lychynek nematode. *Byul.* № 23 [in Ukraine].
- Dovhiy, Yu. Yu., Vakhov's'ky, I. L., Didkiv's'ky, O. F., Zhurav'lova, O. V. & Zhurav'lov, V. D. (2002, 2004) Patent na korysnu model' № 58688 Ukrayina, MPK A61V10/00, G01N33/487. *Prystriy dlya reyestratsiyi yavets' i mertvykh lychynek hel'mintiv (kamera Dovhiya)*. *Nauk tsentr z vyvchennya osoblyvo nebezpechnykh khvorob tvaryn Derzh. ahroekol. un-tu*, № 2002075510. *Byul.* № 11 [in Ukraine].
- Ponomar, S.I., Honcharenko, V.P., Kruchynenko, O.V. & Shendryk, Kh. M. (2014) *Efektivnist' kompleksnoho pidkhotu za postanovky diahnozu na stronhilozydoz*. *Naukovyy visnyk veterinarnoyi medytsyny Bilotserkivs'koho natsional'noho ahroaranoi universytetu*, 13 (108). 190–193 [in Ukraine].

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПОДСЧЕТА ЛИЧИНОК НЕМАТОД

Євстаф'єва В. А.¹, Шендрік Л. І.², Шендрік К. Н.², Шендрік І. Н.², Гутосьян Ю. А.¹

¹Полтавська державна аграрна академія, г. Полтава,

²Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, г. Дніпр.

Представлен усовершенствованный метод количественного подсчета личинок нематод, с использованием счетной сетки, нанесенной на дно чашки Петри. Определена эффективность предложенного способа по сравнению с общепринятой методикой по В. И. Орлову. Установлено высокую диагностическую эффективность усовершенствованного количественного метода при стронгилоидозе и стронгилодозах лошадей.

Ключевые слова: диагностика, интенсивность инвазии, гельминтолараоскопия, стронгилоидозы, стронгилодоз.

IMPROVING METHOD OF QUANTITATIVE COUNTING LARVAE OF NEMATODES

V. Yevstafieva¹, L. Shendryk², Ch. Shendryk², I. Shendryk², Yu. Gugosyan¹

¹Poltava State Agrarian Academy, Poltava

²Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University, Dnipro

Background. Helminthes localizing in various tissues and organs, secrete large amounts of eggs and larvae, which mainly come with feces in the environment. With a view to the selection of pathogens and helminthes helmintholaryscopy offered a significant amount of diagnostics methods, mostly based on the detection of larvae without quantitative calculation.

Objective. The aim of research was to improve the methods of quantitative calculation nematode larvae and compared the proposed method with well-known.

Methods. The study was conducted in laboratory conditions, Department of Parasitology and Veterinary Expertise Poltava State Agrarian Academy and Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University. The material for the research served was fecal horses spontaneously affected by pathogens helminthes. Cultivation of larvae *Strogylus* spp. and *Strongyloides westeri* carried by method of Velychkin. In the first phase of research conducted for the selection of larvae generally helmintholaryscopy by Berman. For a quantitative calculation larvae used method by Orlov and improved method. When comparing the diagnostic methods take into account the number of larvae isolated in 1 g of feces, ease of research and time spent on their conduct.

Results. The proposed quantitative method of counting the larvae of nematodes is to use a special counting grid marked on the bottom of a petri dish, consisting of 5 squares 1×1 cm. Inside squares divided into 5 equal parallel track length of 10 mm, a width of 0.2 mm. The size of the tracks specially selected to increase by microscope × 40 or × 100, looked through their land, which makes it easier to count the number of larvae.

The effectiveness of the proposed method was confirmed in laboratory conditions, conducting its comparison with the prototype method by I. Orlov. For this purpose a study of 30 samples of feces of horses. The proposed method found more larvae (at 13.78%). However, there are simple count of the number of larvae in 1 g of feces. For added convenience, constantly using petri dishes of the same diameter, which makes it possible to reduce the number of repetitive calculations.

Conclusion. The proposed method of counting the number of larvae *Strogylus* spp. and *Strongyloides westeri* in 1 g of feces using a counting grid deposited on the bottom of a petri dish exceeds the known methods for the efficient determination of the intensity of infestation, ease of implementation, that allows us to recommend an improved method for to using in practical laboratory diagnostic by mass parasitological helmintholaryscopy re-searches.

Key words: diagnostics, intensity of infestation, helmintholaryscopy, strongyloidosis, strongylosis.