



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **131806** (13) **U**
(51) МПК (2018.01)
G01N 1/00
G01N 33/48 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2018 09340	(72) Винахідник(и): Назаренко Олександр Сергійович (UA), Євстаф'єва Валентина Олександрівна (UA), Мельничук Віталій Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 13.09.2018	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.01.2019	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.01.2019, Бюл.№ 2	(73) Власник(и): ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНА АГРАРНА АКАДЕМІЯ, вул. Сковороди, 1/3, м. Полтава, 36003 (UA)

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ПОСТІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ ГАМАЗОВИХ КЛІЩІВ ВИДУ VARROA DESTRUCTOR IN TOTO

(57) Реферат:

Спосіб приготування постійних препаратів гамазових кліщів виду Varroa destructor in toto шляхом їх збирання, фіксації, зневоднення, просвітлення олією та видалення її залишків розчином ксилолу, фіксації в канадському бальзамі на предметному склі. При цьому збір кліщів з тіла медоносних бджіл проводять за допомогою пінцета з наступним їх зберіганням у розчині етилового спирту щонайменше 24 години, зневодненням з попереднім проколюванням тонкою голкою хітинового покриву з боків латеральних щитів, просвітленням олією соняшниковою рафінованою на предметному скельці з лункою протягом 140-150 хвилин.

UA 131806 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме до ветеринарної паразитології, і може бути використана для приготування анатомо-морфологічних препаратів гамазових кліщів роду *Varroa* з метою подальшої ідентифікації видів, а також для вивчення фауни та особливостей морфологічної й морфометричної будови збудників вароозу медоносних бджіл.

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'єкту необхідного положення, наносять кілька крапель канадського бальзаму й обережно накривають покривним склом (див. Патент України на корисну модель № 85028 Україна МПК(2013) и 2013 05144, G01N1/00. Спосіб приготування збудників ряду *Mallophaga in toto* / Євстаф'єва В.О., Клименко О.О., Хижня Л.Ю.).

Як найближчий аналог використано методику приготування препаратів збудників ряду *Mallophaga in toto*, що включає відбір виявлених малофаг з подальшою їх фіксацією в 70°-ному розчині етилового спирту в пробірках для мікропроб. На предметному склі черевце малофаг проколюють гострою голкою, не зачіпаючи щетинок і внутрішніх органів. Об'єкти підфарбовують спиртовим або водним кислим фуксином чи еозином, промивають дистильованою водою або в суміші гліцерину з водою (1:1). Потім просочують в суміші гліцерину з водою або в чистому гліцерині та переносять на предметне скло. Невеликий шматочок гліцерин-желатину розплавляють на покривному склі, притримуючи його високо над полум'ям спиртового пальника і не допускаючи появи в суміші бульбашок повітря. Покривне скло швидко перевертають, фіксуючи краплю суміші на об'єкт, який також злегка підігрівають на предметному склі (див. Благовещенский Д.И. Пухоеды (*Mallophaga*). Ч. 1: Введение // Фауна СССР. Новая сер., № 72. - Т. 1. - Вып. 1: Насекомые пухоеды / Зоол. ин-т АН СССР. - Л.: АН СССР. - 1959. - С. 164-165).

Недоліками перерахованих способів є фарбування препарату перед його фіксацією. Відомо, що основні диференційні ознаки різних видів кліщів роду *Varroa* відбувається за хітиновими щитками, які після просвітлення добре видно під мікроскопом, фарбування ж хітинового покриву заважає процесу диференціації. Що стосується препаратів, виготовлених на основі гліцерин-желатину, то вони мають обмежений термін зберігання та швидко псуються внаслідок пересихання.

Задачею корисної моделі є підвищення діагностичної ефективності та забезпечення довготривалого зберігання виготовлених зразків для наукових та навчальних цілей.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що збір кліщів з тіла медоносних бджіл проводять за допомогою пінцета з наступним їх зберіганням у розчині етилового спирту щонайменше 24 години; зневодненням з попереднім проколюванням тонкою голкою хітинового покриву з боків латеральних щитів; просвітленням олією соняшниковою рафінованою на предметному скельці з лункою протягом 140-150 хвилин.

Для визначення оптимальних режимів виконання методики проведено експериментальне дослідження.

Використання з метою збору кліщів виду *Varroa destructor* з тіла медоносних бджіл малого зігнутого або анатомічного очного пінцета зменшує затрати часу на вказану маніпуляцію у порівнянні зі збором кліщів без використання додаткового інструменту або з використанням звичайного анатомічного пінцета. Це пов'язано з місцем локалізації кліща на тілі бджіл (самки кліща можуть глибоко проникати між першими черевними сегментами, а також на межі між головним і грудним та грудним та черевним відділами тіла) та його розмірами (менше 2 мм), тому незначні розміри країв пінцета відіграють важливу роль при зборі матеріалу. Зберігання кліщів у 70° розчині етилового спирту є попередньою підготовкою матеріалу для подальших маніпуляцій. В проміжок часу 24 години і більше з тіла кліщів видаляється зайва волога і вони стають менш крихкими, всі анатомічні утвори міцно фіксовані до тіла, що сприяє зниженню втрати їх цілісності при подальшій роботі з кліщем. Проколювання тонкою голкою хітинового покриву тіла кліщів перед основним зневодненням в спиртах зростаючої концентрації сприяє подальшому зневодненню та просвітленню досліджуваних об'єктів. Проколювання з боків латеральних щитів зменшує можливість руйнування внутрішніх органів кліщів. Використання канадського бальзаму для виготовлення препарату з кліщів дозволяє зберігати їх понад 10 років, при цьому якість препаратів залишається незмінною. Натомість, препарати виготовлені

на основі гліцерин-желатину мають короткий термін придатності (від одного до двох років) як наслідок висихання та розтріскування фіксуєної основи.

- Для визначення оптимального часу, за який відбувається максимальне просвітлення, досліджено 50 екземплярів кліщів виду *Varroa destructor*, одразу зібраних з тіла медоносних бджіл. Після перенесення та витримки їх в пробірках Епіндорфа з 70° розчином етилового спирту та проведенням для зневоднення в спиртах зростаючої концентрації здійснювали просвітлення об'єктів на предметному скельці з лункою, заповненою олією соняшниковою рафінованою. Ступінь просвітлення хітинових покривів, а саме найбільших вентральних щитів тіла кліща визначали шляхом перегляду препаратів під мікроскопом за збільшення $\times 40$; $\times 50$. Мікроскопію препаратів проводили в проміжках часу: 20-30, 50-60, 80-90, 110-120 та 140-150 хвилин. Показник просвітлення умовно поділили на високий, задовільний та незадовільний. Отримані результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Ступінь просвітлення найбільших вентральних щитів тіла кліщів виду *Varroa destructor* під дією олії соняшникової рафінованої

Щити кліща	Експозиція, хв.				
	20-30	50-60	80-90	110-120	140-150
Стернальний	*	*	*	**	***
Геніто-вентральний	*	*	**	***	***
Анальний	*	*	**	**	***
Плейральні	*	*	**	**	***
Латеральні	*	**	**	**	***

Примітка: *** - високий рівень просвітлення;

** - задовільний рівень просвітлення;

* - незадовільний рівень просвітлення.

- Встановлено, що високий рівень просвітлення всіх найбільших вентральних щитів кліща виду *Varroa destructor* забезпечує витримка об'єктів у олії соняшниковій рафінованій в проміжок часу від 140 до 150 хвилин. У решті випадків рівень просвітлення був менш вираженим.

Дослідженнями встановлено, що найбільш ефективно проводити просвітлення кліщів для виготовлення постійних препаратів в проміжок часу від 140 до 150 хвилин.

- Спосіб здійснюють наступним чином.

Проводиться відбір кліщів виду *Varroa destructor* з тіла бджіл за допомогою малого зігнутого або анатомічного очного пінцета та перенесення їх з метою зберігання та попереднього зневоднення в 70,0° розчин етилового спирту щонайменше на 24 години. Перед проведенням виготовлення постійних препаратів кліщів для повного зневоднення проводять через спирти зростаючої концентрації (80,0°, 90,0° та 95,0°), попередньо проколовши за допомогою тонкої голки хітиновий покрив особин з боків латеральних щитів. В кожному зі спиртів об'єкти витримують протягом 60 хвилин. Для просвітлення кліщів переносять за допомогою пінцета на предметне скельце з лункою, в яку попередньо вносять олію соняшкову рафіновану, та залишають в спокої на 140-150 хвилин. Після цього об'єкти переносять на звичайне предметне скельце та видаляють залишки олії за допомогою нанесення кількох крапель ксилолу. Далі за допомогою скляної палички на об'єкт наносять невелику кількість канадського бальзаму, тонкою голкою кліщам надають бажаного положення й накривають чистим покривним склом, не допускаючи появи бульбашок повітря.

Приклад. Було проведено дослідження 20-ти кліщів медоносних бджіл виду *Varroa destructor*. Матеріал досліджували через 24 години після фіксації в 70,0° розчині етилового спирту за найближчим аналогом та пропонуванім способом з однаковим часом просвітлення. Оцінювали: інтенсивність просвітлення найбільших вентральних щитів шляхом мікроскопії за 5-бальною шкалою, наявність/відсутність пухирців повітря і їх кількість після завершення виготовлення тотальних макропрепаратів. Результати досліджень відображені в таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняльна ефективність способів виготовлення тотальних препаратів з кліщів виду *Varroa destructor*, $M \pm m$

Спосіб дослідження		
Показники	найближчий аналог, n=10	пропонований, n=10
Просвітлення вентральних щитів		
Стернальний	2,30±0,26	4,70±0,15
Геніто-вентральний	4,00±0,21	5,00
Анальний	3,22±0,20	4,80±0,13
Плейральні	4,30±0,15	4,90±0,10
Латеральні	3,50±0,22	5,00
Загальна оцінка	3,46±0,13	4,88±0,05
Пухирці повітря в препараті		
кількість пухирців	3,80±0,84	0,60±0,27
повітря, екз./препарат		

За використання способу, який вибрано як найближчий аналог, в середньому загальна оцінка просвітлення була в межах 3,46±0,13 балів. Встановлено, що краще за використання цього способу просвітлюються плейральні, геніто-вентральний та латеральні щити (4,30±0,15, 4,00±0,21 та 3,50±0,22 бала відповідно). Менш ефективно просвітлюються стернальний та анальний щити (2,30±0,26 та 3,22±0,20 бала). Використання запропонованого способу призводило до підвищення просвітлення кліщів. Так, в середньому загальна оцінка просвітлення була в межах 4,88±0,05 бала, що на 29,10 % вище порівняно зі способом, який вибрано як найближчий аналог. За використання вказаного способу найкраще просвітлювалися геніто-вентральний та латеральні щити (5,00 балів), що на 20,00 % та 30,00 % вище порівняно з аналогом. Дещо менше просвітлювалися плейральні, анальний та стернальний щити (4,90±0,10, 4,80±0,13 та 4,70±0,15 бала відповідно), проте в порівнянні зі способом-аналогом вище на 12,22 %, 32,92 % та 51,06 % відповідно.

Встановлено, що за використання способу, який вибрано як найближчий аналог, в одному препараті після завершення його виготовлення в середньому нараховується 3,80±0,84 екземплярів пухирців повітря, за використання запропонованого способу їх нараховується значно менше - в середньому 0,60±0,27 екземпляра на 1 макропрепарат, що в 6,33 разу менше порівняно зі способом - найближчим аналогом.

Таким чином ефективність запропонованого способу приготування постійних препаратів гамазових кліщів виду *Varroa destructor* збудників вароозу бджіл *in toto* в порівнянні зі способом, що вибрано як найближчий аналог, виявився кращим за показниками: просвітлення виготовлених препаратів вище на 29,10 %, відсутності пухирців повітря у 6,33 рази (84,21 %).

Заявлений спосіб дозволяє більш детально дослідити будову не лише хітинових частин тіла кліщів виду *Varroa destructor*, але й їх внутрішні органи, що, в свою чергу, полегшує морфологічні та морфометричні дослідження а також диференціацію різних видів збудників. Спосіб не вимагає вартісних реактивів, спеціальної підготовки, зручний і легкий у проведенні. Виготовлені за вказаною технологією макропрепарати здатні до довготривалого зберігання (понад 10 років), з часом не втрачати своєї якості.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5 Спосіб приготування постійних препаратів гамазових кліщів виду *Varroa destructor* in toto шляхом їх збирання, фіксації, зневоднення, просвітлення олією та видалення її залишків розчином ксилолу, фіксації в канадському бальзамі на предметному склі, який **відрізняється** тим, що збір кліщів з тіла медоносних бджіл проводять за допомогою пінцета з наступним їх зберіганням у розчині етилового спирту щонайменше 24 години, зневодненням з попереднім проколюванням тонкою голкою хітинового покриву з боків латеральних щитів, просвітленням олією соняшниковою рафінованою на предметному скельці з лункою протягом 140-150 хвилин.

10

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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