

Н.О. Волошина

**АЛЬТЕРНАТИВНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ
ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЗБУДНИКІВ ГЕЛЬМІНТОЗІВ**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

Найбільш точним показником санітарно-епідеміологічного неблагополуччя об'єктів довкілля є виявлення у них збудників паразитозів. Поряд з бактеріологічними, вірусологічними та хімічними обов'язковими є санітарно-паразитологічні дослідження, що являють значний інтерес для епідеміологів, паразитологів та санітарних лікарів [1, 2, 3].

Стандартизовані способи визначення життєздатності та інвазійності яєць гельмінтів на різних об'єктах навколишнього середовища (грунт, вода, овочі тощо) включають ряд послідовних процедур: оцінку загального вигляду яєць, фарбування їх вітальними барвниками, культивування в оптимальних умовах та постановка біологічної проби шляхом згодовування лабораторним тваринам [1].

Такий підхід на сьогодні вважається найбільш точним. Ним користуються паразитологи-науковці та фахівці паразитологічних лабораторій медичного та ветеринарного профілів. Постановка біологічної проби займає від 38 до 76 діб, залежно від виду збудника нематодозу, особливостей його розвитку (культивування яєць до інвазійної стадії складає від 30 до 60 діб), умов культивування, виду лабораторних тварин,

які використовують у досліді (власне постановка біопроби – від 8 до 16 діб) та багатьох інших чинників. Також, слід брати до уваги матеріальні витрати, пов'язані з постановкою біологічної проби (електроенергія, використання лабораторних тварин, робота спеціалістів тощо).

Певні труднощі та незручності при проведенні санітарно-паразитологічних досліджень об'єктів зовнішнього середовища, можуть складати такі фактори, як присутність у пробі живих зародків паразитів на різних стадіях ембріонального розвитку та нежиттєздатних. Для встановлення напруженості епідемічного процесу необхідно здійснювати підрахунок відсотку життєздатних яєць. Це здійснюють шляхом мікроскопії великої кількості зразків та додатковими маніпуляціями (фарбування, підігрівання препарату тощо).

Крім того, фарбування недоцільно застосувати для діагностики життєздатності незрілих яєць, оскільки їх оболонка інтенсивно забарвлюється, що не дозволяє в подальшому візуально визначити ступінь фарбування зародка всередині яйця.

Для постановки біологічної проби рекомендується використовувати від трьох до п'яти білих мишей або інших лабораторних тварин [1, 4].

Концепція 3R [reduction, refinement and replacement] – скорочення, удосконалення та заміни відносно експериментів на лабораторних тваринах, сьогодні є загальноприйнятим світовим стандартом. Вона дозволяє отримувати достовірні наукові результати та значно скорочує кількість лабораторних тварин, що використовуються [5].

Разом з тим, необхідно приймати до уваги положення Хельсинської Декларації та рекомендації Директив Європейського Співтовариства (№ 86/609 ЕС), відносно розробки альтернативних моделей, додаткових підходів, а також удосконалення досліджень на тваринах [6].

Недоліками методу біологічних проб є те, що він трудомісткий, громіздкий, потребує коштовної апаратури та використання лабораторних тварин. Крім того, його застосування потребує від виконавців вузької фахової підготовки та досвіду роботи.

Перераховані вище недоліки спонукають дослідників до пошуку альтернативних методів встановлення життєздатності та інвазійності яєць гельмінтів, які були б простішими та дешевшими.

Метою роботи було розробити ефективний альтернативний метод визначення життєздатності та інвазійності збудників гельмінтозів тварин та людини на заміну методу біологічних проб на лабораторних тваринах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження слугувала лабораторна культура яєць свиної аскариди *Ascaris suum* (Goeze, 1782).

Експериментальні речовини – гідратовані і карботовані наночастки олова зі вмістом металу 100 мг/дм³ в колоїді та слабо кислою реакцією (рН 6,7-6,9) (ТУ У 24.6-35291116-003:2008) [7].

Дослідження проводили на базі акредитованої лабораторії військової частини А 3466 (центр ветеринарного забезпечення Збройних Сил України).

Чисту культуру яєць *A. suum* отримали шляхом розтину статевозрілих самок аскарид, яких відбирали під час забою свиней на Дарницькому м'ясокомбінаті м. Київ.

Для отримання інвазійних зародків нематод водну суспензію яєць аскариди вміщували у чашки Петрі з додаванням 2 %-ного водного розчину формаліну. Культивували у термостаті при температурі +28 °С протягом 20-и діб до розвитку личинки всередині яйця. Після культивування яйця двічі промивали у дистильованій воді шляхом центрифугування при швидкості 800 об/хв протягом 5 хв.

Щоденно здійснювали штучну аерацію яєць та контролювали рівень вологи у чашках Петрі.

Життєздатність яєць перевіряли візуально, проглядаючи нативні препарати під малим (15x10) та великим (15x25) збільшеннями мікроскопу, підігріті над полум'ям спиртівки до температури 37°C та забарвлені (фарбували метиленовим синім - живі тканини редукують фарбу у безколірну лейкобазу, а мертві – фарбуються у синій колір).

Інвазійність культури яєць *A. suum* контролювали шляхом постановки біологічної проби на лабораторних мишах лінії СВА-57 Black.

Контролем слугував стандартний метод визначення життєздатності інвазійних яєць гельмінтів шляхом їх згодовування лабораторним тваринам.

У досліді було задіяно 5 лабораторних мишей. Кожній з них згодовували яйця аскариди із розвиненою личинкою всередині в кількості 250-300 шт. в 1 см³ ізотонічного розчину хлориду натрію.

Введення суспензії здійснювали за допомогою шприца с напаяною на кінці голки оливою. Через 8 діб після експериментального зараження тварин забивали та проводили патолого-анатомічний розтин. Відбирали легені та печінку, подрібнювали та досліджували за методом Бермана на наявність мігруючих личинок аскариди [1].

Дію наночасток олова досліджували на різних стадіях ембріонального розвитку яєць: двох і чотирьох бластомерів, морули, бластули, гастрული та інвазійної личинки.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Сутність пропонованого альтернативного методу полягає в тому, що в чашку Петрі з життєздатними та нежиттєздатними яйцями аскарид у кількості 100-130 шт. при кімнатній температурі додавали 5 см³ дистильованої води та 2 см³ колоїду наноаквахелату олова. В процесі досліджень нами вперше було зареєстроване явище «налипання» наночасток металу на поверхню оболонки життєздатних яєць. Ефект «налипання» наночасток можна візуально спостерігати вже через 120 хв. при малому збільшенні мікроскопу (рис. 1).

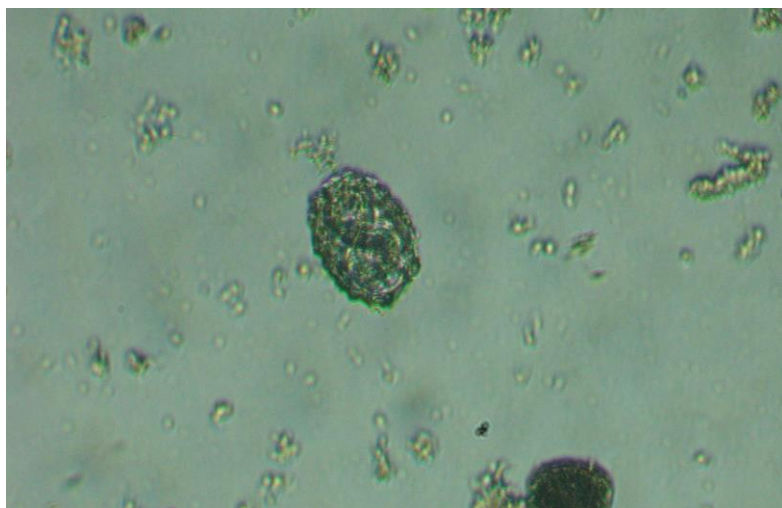


Рис. 1. Інвазійне яйце *Ascaris suum* (з личинкою всередині), оточене наночастками олова (збільшення 15x10)

Слід відмітити, що ефект «налипання» має місце лише навколо живих яєць, незалежно від ступеню ембріонального розвитку. Максимальне «налипання» наночасток припадає на 25-46-у години від початку експерименту.

Через 80-90 годин від початку експерименту яйця аскариди втрачають життєздатність, що супроводжується процесом очищення їх поверхні від наночасток. Нежиттєздатність яєць та втрата ними інвазійності після дії наночасток олова підтверджені методом експериментального зараження лабораторних мишей.

Контролем слугував стандартний метод встановлення життєздатності та ступеню інвазійності яєць нематод із постановкою біологічної проби на лабораторних мишах.

Попередньо яйця *A. suum* культивували протягом 20-и діб до інвазійної стадії. Після цього контролювали життєздатність яєць методами фарбування, підігрівання над полум'ям спиртівки та штучного зараження тварин.

На восьму добу експерименту штучно інвазованих піддослідних тварин забивали, розтинали та обстежували печінку і легені на наявність мігруючих личинок аскариди. Після постановки біологічної проби у 100% випадків були виявлені мігруючі личинки *A. suum* у легенях та печінці мишей контрольної групи (рис.2). Таким методом була підтверджена інвазійність яєць нематоди.



Рис. 2. Личинка *Ascaris suum*, виділена із легень лабораторної миші

Загалом процес встановлення життєздатності та інвазійності яєць аскариди свиней традиційними методами триває 30 діб в той час як застосування альтернативного методу дозволяє його завершити протягом однієї-двох діб.

Отримані результати дають можливість розглядати імпрегнацію поверхні інвазійних яєць аскариди як можливу альтернативу існуючим стандартизованим і рекомендованим методам діагностики життєздатності та ступеню інвазійності збудників паразитарних інвазій.

ВИСНОВКИ

Перевагами пропонованого методу діагностики життєздатності та інвазійності яєць аскариди є:

1. Відсутність нагальної необхідності у культивуванні яєць до інвазійної стадії, оскільки за використання наночасток олова чітко реєструється життєздатність ембріонів, незалежно від ступеню їх розвитку.
2. Повна відмова від використання лабораторних тварин та високовартісного лабораторного обладнання.
3. Заощадження 96,7 % робочого часу (2-46 годин замість 30-и діб) при проведенні діагностичних обстежень в паразитологічних лабораторіях свідчить про суттєво вищу рентабельність пропонованого методу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пішак В.П., Булик Р.Є., Захарчук О.І. *Лабораторна діагностика паразитарних інвазій.* – Чернівці: Медуніверситет, 2007. – 284 с.
2. *Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы:*

- 3.2.1333-03. - Официальное издание. – М.: Госкомсанэпиднадзора России, 2003 г. – 19 с. – (Нормативный документ Министерства здравоохранения РФ).
3. Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации. Санитарные правила и нормы: 3.2.569-96. - Официальное издание. – М.: Госкомсанэпиднадзора России, 1996 г.- № 43. – 79 с. - (Нормативный документ Министерства здравоохранения РФ).
4. Астафьев Б.А. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине / Б.А. Астафьев, Л.С. Яроцкий, М.Н. Лебедева . – М.: Наука, 1989. – 279 с.
5. Резников А.Г. Проблемы этики при проведении экспериментальных медицинских и биологических исследований на животных в Украине / под ред. Ю.И. Кундиева // Антология биоэтики. - Львов: БаК, 2003 - С. 395-399.
6. Проведение исследований на биомоделях и на лабораторных животных / Под общей редакцией проф. Ю.Б. Белоусова. – 2005. – Часть IX. - Том 07. - № 1. - Режим доступа: http://www.conmed.ru/media/book/05_01/24.
7. Патент України на корисну модель №29854. Висококоординаційний аніоноподібний аквананокомплекс. / Каплуненко В.Г., Косинов М.В. - опубл. 25.01.08, Бюл. №2.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕЛЬМИНТОЗОВ

Н.А. Волошина

В статье изложены результаты исследования жизнеспособности яиц нематод на примере *Ascaris suum* с использованием наночастиц олова. Проведено сравнение стандартного метода и нового. Указаны все преимущества предложенного нами метода и недостатки существующих. Обоснована необходимость дальнейшей разработки доступных лабораторных тестов для применения в паразитологических лабораториях.

ALTERNATIVE method of definition of viability of activators GELMINTOZIS

N.A. Voloshyna

In article results of research of viability eggs nematodes on example *Ascaris suum* with use nanopasts are stated. Comparison of a standard technique and new is spent. All advantages of the method offered by us and lacks of the existing are specified. Necessity of the further working out of accessible laboratory tests for application in parasitic laboratories is proved.