

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 246826 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **444124**

(22) Data zgłoszenia: **2023.03.17**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.09.23 BUP 39/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.03.17 WUP 11/2025**

(51) MKP:

**C12N 5/02** (2006.01)

**A01K 67/033** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**PAŃSTWOWY INSTYTUT WETERYNARYJNY –  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY,  
Puławy, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**JOLANTA MAŁGORZATA ZDYBEL, Puławy, PL  
TOMASZ CENCEK, Puławy, PL  
ANETA BEŁCIK, Zbędowice, PL  
EWA BILSKA-ZAJĄC, Puławy, PL  
JACEK KARAMON, Puławy, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzec. pat. Anna Grzelak, Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

**Sposób wytwarzania podłoża transportowego do długotrwałego przechowywania żywych jaj pasożytów jelitowych *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp.**

**PL 246826 B1**

## Opis wynalazku

### DZIEDZINA TECHNIKI

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania podłoża transportowego umożliwiającego długotrwałe przechowywanie w nim żywych jaj pasożytów jelitowych z rodzajów *Ascaris*, *Trichuris* i *Toxocara* (ATT). Podłoże może być wykorzystane dla przechowywania w nim żywych jaj pasożytów jelitowych w celu zastosowania ich jako materiały odniesienia RM (ang. Reference Material) i certyfikowane materiały odniesienia CRM (ang. Certified Reference Material) w parazytologicznych badaniach nawozów organicznych i osadów ściekowych niezbędnych do przeprowadzenia badań biegłości PT (ang. Proficiency Testing) i porównań międzylaboratoryjnych ILC (ang. Interlaboratory Comparison).

### STAN TECHNIKI

Wykorzystanie substancji organicznych w celach nawozowych jest jednym z priorytetowych działań w dziedzinie ochrony środowiska. Ze względu na to, że są one źródłem cennych substancji organicznych i składników mineralnych dla roślin, wykorzystanie ich do celów rolniczych jest uzasadnione. Jednak, z drugiej strony, materiał ten może być źródłem skażenia parazytologicznego i mikrobiologicznego gleby, wód gruntowych, powierzchniowych, jak też uprawianych roślin, co stwarza zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Aby nie dopuścić do stosowania w rolnictwie nawozów organicznych zawierających groźne patogeny, nawozy organiczne powinny być dokładnie badane. Konieczne badania nawozów organicznych regulowane są szeregiem aktów prawnych unijnych i krajowych. W myśl tych przepisów nawozy organiczne i osady ściekowe nie mogą zawierać żywych jaj pasożytów jelitowych z rodzajów *Ascaris*, *Trichuris* i *Toxocara* (zwanymi też łącznie: ATT), a osady ściekowe stosowane do rekultywacji terenów nie powinny zawierać więcej niż łącznie 300 żywych jaj w/w pasożytów w 1 kg suchej masy osadu. Wymóg UE obliguje laboratoria do prowadzenia biologicznego monitoringu jakości nawozów organicznych i osadów ściekowych za pomocą metod akredytowanych. Oczekuje się, że laboratoria badawcze zarówno naukowe, jak i usługowe będą uzyskiwały wyniki, które w łatwy sposób będą mogły być ze sobą porównywane. Stosowane metody badawcze powinny być standaryzowane tak, aby we wszystkich laboratoriach dana metoda charakteryzowała się podobnymi wartościami cech (czułość, specyficzność, powtarzalność, granica wykrywalności czy granica oznaczalności). Najważniejszym narzędziem pozwalającym na utrzymywanie takiej równoważności metod są badania międzylaboratoryjne i badania biegłości (PT/ILC), w których wykorzystywane są próbki kontaminowane znaną ilością poszukiwanego analitu. W przypadku badań parazytologicznych nawozów organicznych i osadów ściekowych analitem takim są jaja pasożytów z rodzajów *Ascaris*, *Trichuris* i *Toxocara*, stanowiące tzw. wskaźnikowe rodzaje pasożytów, wymieniane w odnośnych przepisach. W przypadku badań parazytologicznych przeprowadzenie badań PT/ILC jest bardzo skomplikowane w związku ze specyficznym przygotowaniem matrycy, szczególnie odwodnionych osadów ściekowych. Nieliczne, oferowane w Polsce i na świecie przez różne laboratoria, badania PT/ILC zwykle nie są prowadzone prawidłowo. Błędy dotyczą przede wszystkim sposobu przygotowania matrycy, sposobu kontaminacji próbek jajami pasożytów ATT, co skutkuje brakiem możliwości wykorzystania tych wyników badań do potwierdzania ważności wyników metod ilościowych. Istotnym elementem prawidłowego przeprowadzenia badań PT/ILC jest zapewnienie dostępności odpowiedniej jakości Certyfikowanych Materiałów Odniesienia (CRM). Zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02, PN-EN ISO/IEC 17043, aby CRM mogły spełnić swoją funkcję konieczne jest zapewnienie m.in. ich niezmienności w czasie przechowywania, transportu i samego badania oraz zapewnienie ich jednorodności. W przypadku jaj pasożytów jelitowych ATT kluczowym jest zachowanie ich żywotności/zdolności do rozwoju i cecha ta równoważna jest z niezmiennością. W przypadku żywych jaj pasożytów jelitowych okres przechowywania limitowany jest przede wszystkim dostępnością tlenu w medium, w którym konserwowane są jaja, na co ujemny wpływ ma rozwijająca się w trakcie przechowywania podłoża flora bakteryjna. Do konserwacji jaj w praktyce laboratoryjnej stosuje się najczęściej 0,5–2% roztwory formaliny. Formalina ogranicza jednak przydatność tak konserwowanego CRM do zastosowania w technikach molekularnych. Ze względu na specyficzną budowę wierzchniej warstwy otoczki jaj, szczególnie *Ascaris* spp. i *Toxocara* spp., jaja wykazują silną tendencję do agregacji. Tworzące się skupiska jaj są dość trwałe i cecha ta uniemożliwia osiągnięcie zadawalającej jednorodności CRM. Sposoby izolacji jaj *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp. Z ciał samic tych pasożytów są znane w stanie techniki.

W stanie techniki znane są metody otrzymywania różnych rodzajów żelatyny. Dwie podstawowe z nich dotyczą wytwarzania żelatyny typu A, która odbywa się metodą kwaśną, i żelatyny typu B – metodą alkaliczną (Kowalski Z. et al. Chemik 10/2011, tom 65, 1085–1092).

Z publikacji patentu PL236775B1, którego twórcami są również twórcy niniejszego wynalazku, znany jest sposób wykonania podłoża transportowego dla żywych larw pasożytów, zwłaszcza *Trichinella* spp. Publikacja PL236775B1 ujawnia sposób przygotowania podłoża transportowego dla żywych larw pasożytów, zwłaszcza *Trichinella* spp na bazie żelatyny ze skór wieprzowych otrzymanej w procesie kwaśnym typu A o pH od 3,8 do 5,0 i twardości (sile wiążącej) 300 Bloom. Ujawnione w PL236775B1 podłoże zapewnia larwom włośni (*Trichinella* spp.) środowisko ograniczające dostęp tlenu, gdyż są one typowymi beztlenowcami i niewielki dostęp tlenu powoduje ich zamieranie, inaczej niż w przypadku jaj ATT, gdzie dostęp tlenu jest niezbędny do zachowania żywotności jaj i dalszego ich rozwoju. Pasożytnicze nicienie jelitowe w swoim cyklu życiowym muszą przejść fazę rozwoju w środowisku zewnętrznym. W przypadku nicieni z rodzaju ATT wydalone jaja do środowiska zewnętrznego muszą uzyskać stadium inwazyjne. Zatem środowisko zewnętrzne, w tym dostępność tlenu, jest niezbędnym etapem rozwoju dla tych gatunków nicieni.

Ponadto, temperatura potrzebna do uwolnienia larw *Trichinella* spp (włośni) poprzez rozpuszczenie żelatyny wieprzowej w próbce tkanki mięśniowej wynosi co najmniej 45°C. Metodologia przygotowania próbek do badań w kierunku obecności *Trichinella* spp. polega na wyizolowaniu włośni z tkanki mięśniowej, gdzie w procesie wytrawiania tkanki mięśniowej stosowana jest temperatura 45°C. Natomiast temperatura ta nie sprawdza się w przypadku stosowania jej w badaniu próbek nawozów organicznych i osadów ściekowych kontaminowanych jajami ATT. W tym przypadku potrzebne jest zastosowanie niższej temperatury.

Stąd konieczne było opracowanie sposobu wytwarzania udoskonalonego podłoża transportowego do długotrwałego przechowywania żywych jaj różnych pasożytów w szczególności nicieni jelitowych *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp.

#### **UJAWNIEŃ WYNALAZKU**

W świetle opisanego stanu techniki celem niniejszego wynalazku jest przewyższenie wskazanych niedogodności i dostarczenie sposobu wytwarzania podłoża transportowego dla długotrwałego przechowywania żywych jaj pasożytów jelitowych z rodzajów *Ascaris*, *Trichuris* i *Toxocara* (ATT), szczególnie dla zastosowania ich jako materiały odniesienia (CRM) w parazytologicznych badaniach nawozów organicznych i osadów ściekowych w tym niezbędnych do przeprowadzenia badań biegłości (PT/ILC). Celem jest dostarczenie opracowanego sposobu wytwarzania podłoża transportowego z zawieszonymi w nim żywymi jajami pasożytów ATT.

Nieoczekiwanie okazało się, że gdy do przygotowania podłoża transportowego do długotrwałego przechowywania jaj *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp. zastosuje się dwa rodzaje żelatyny o różnej twardości Bloom, wytworzone innymi metodami, tj.: żelatyny na bazie skór wieprzowych otrzymanej w procesie kwaśnym typu A o pH od 3,8 do 5,0 i twardości 290–310 Bloom do wytworzenia warstwy podstawowej podłoża i żelatyny na bazie skór wołowych otrzymywanej metodą alkaliczną typu B o pH od 4,0 do 7,0 i twardości od 90 do 120 Bloom do sporządzenia kapsułek podłoża do przechowywania jaj ATT, to zabezpieczone w ten sposób jaja pasożytów ATT można przechowywać w temp. ok. 4–8°C, korzystnie w temp. ok. 6°C przez okres co najmniej 2 miesiące, korzystnie 1 miesiąca, ponadto podłoże to nadaje się do przechowywania jaj o różnych wymaganiach tlenowych, zachowując ich żywotność.

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp. (ATT), obejmującego etapy, w których:

- a) wytwarza się warstwę podstawową z żelatyny wieprzowej uzyskanej na bazie skór wieprzowych i otrzymanej w procesie kwaśnym typu A o pH od 3,8 do 5,0 i twardości 290–310 Bloom, przy czym żelatynę wieprzową rozpuszcza się na gorąco w wodzie destylowanej podgrzanej do temperatury od 55 do 65°C, tworząc roztwór o zawartości od 8 do 10% wag., płynną żelatynę schładza się do temperatury od 45 do 50°C i podłożem z żelatyny wieprzowej zalewa się płytkę, korzystnie płytkę Petriego, korzystnie na wysokość warstwy podłoża z żelatyny wieprzowej od 6 do 8 mm, zalaną żelatyną wieprzową płytkę pozostawia się w temperaturze od 4 do 8°C do zakrzepnięcia podłoża z żelatyny wieprzowej, korzystnie przez okres do 24 godzin; w zastygniętym podłożu z żelatyny wieprzowej wycina się studzienki o średnicy od 5 do 10 mm uzyskując warstwę podstawową podłoża transportowego;
- b) wytwarza się kapsułki podłoża dla przechowywania jaj pasożytów jelitowych ATT z żelatyny wołowej uzyskanej na bazie skór wołowych i otrzymywanej metodą alkaliczną typu B o pH od 4,0 do 7,0 i twardości od 90 do 120 Bloom, przy czym

żelatynę wołową rozpuszcza się w wodzie destylowanej ogrzanej do temperatury od 45 do 55°C, tworząc roztwór o zawartości od 8 do 10% wag. żelatyny, płynną żelatynę schładza się do temperatury od 35 do 40°C, i tak przygotowanym podłożem z żelatyny wołowej,

zalewa się studzienkę wytworzoną w warstwie podstawowej dla wytworzenia warstwy dolnej kapsułki, po czym płytkę pozostawia się w temperaturze od 4 do 8°C do zakrzepnięcia warstwy dolnej kapsułki, korzystnie przez od 2 do 4 godzin;

do studzienek na warstwę dolną kapsułki nanosi się jaja pasożytów ATT i studzienki uzupełniana się podłożem z żelatyny wołowej dla wytworzenia środkowej warstwy kapsułki z umieszczonymi w niej jajami ATT, po czym pozostawia się płytkę

w temperaturze od 4 do 8°C do zakrzepnięcia środkowej warstwy kapsułki, korzystnie przez od 2 do 4 godzin;

po zastygnięciu środkowej warstwy kapsułki do studzienki dodaje się podłoże z żelatyny wołowej dla wytworzenia górnej warstwy kapsułki, po czym pozostawia się płytkę

w temperaturze od 4 do 8°C do zestalenia się górnej warstwy kapsułki, korzystnie przez od 2 do 4 godzin.

W korzystnym sposobie wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT podłoże z żelatyny wołowej w etapie b) uzupełnia się antybiotykiem, korzystnie wybranym z streptomycyny, penicyliny.

W korzystnym sposobie wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT w etapie b) wytwarza się kapsułki podłoża na bazie żelatyny ze skór wołowych otrzymywanych metodą alkaliczną typu B o pH od 4,0–7,0 o twardości 100 Bloom.

W korzystnym sposobie wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT w etapie a) wytwarza się warstwę podstawową z żelatyny wieprzowej uzyskanej na bazie skór wieprzowych i otrzymanej w procesie kwaśnym typu A o pH od 3,8 do 5,0 i twardości 300 Bloom.

W korzystnym sposobie wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT jaja pasożytów jelitowych nanoszone do studzienek w etapie b) uzyskuje się przez wyizolowanie z macic dojrzałych samic *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp., poprzez ich oczyszczenie i rozdzielenie ze skupisk, w których się znajdują, przy użyciu płuczki ultradźwiękowej i płynu fizjologicznego i przechowuje w temperaturze 6°C.

W korzystnym sposobie wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT w etapie b) dla wytworzenia warstwy dolnej kapsułki zalewa się studzienkę podłożem z żelatyny wołowej w ilości  $1/4 \pm 10\%$  wyjściowej objętości studzienki, korzystnie w ilości  $1/4$  wyjściowej objętości studzienki; dla wytworzenia środkowej warstwy kapsułki do studzienki dodaje się podłoże z żelatyny wołowej w ilości  $2/4 \pm 10\%$  wyjściowej objętości studzienki, korzystnie  $2/4$  wyjściowej objętości studzienki; dla wytworzenia górnej warstwy kapsułki zalewa się studzienkę podłożem z żelatyny wołowej w ilości  $1/4 \pm 10\%$  objętości studzienki, korzystnie w ilości  $1/4$  wyjściowej objętości studzienki.

W korzystnym sposobie wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT w etapie b) do studzienek nanosi się jaja pasożytów ATT za pomocą mikropipety pod obserwacją mikroskopową.

W korzystnym sposobie podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT w etapie b) nanoszona liczba jaj pasożytów ATT jest określana pod mikroskopem.

W korzystnym sposobie podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych w etapie a) wycina się studzienki korkoborem.

W korzystnym sposobie podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT, wytworzone w etapie b) podłoże transportowe z żywymi jajami pasożytów jelitowych ATT następnie przechowuje się w temperaturze od 4 do 8°C, korzystnie przez okres co najmniej dwóch miesięcy, korzystnie co najmniej jednego miesiąca.

Wynalazek dotyczy zatem sposobu wytwarzania podłoża na bazie żelatyny ze skór wołowych otrzymywanej metodą alkaliczną typu B o pH od 4,0 do 7,0 i twardości od 90 do 120 (najlepiej ok. 100) Bloom, korzystnie z dodatkiem antybiotyków, korzystnie z dodatkiem streptomycyny, penicyliny. W podłożu tym zatapia się określoną liczbę odpowiednio przygotowanych żywych jaj pasożytów ATT, a podłoża na bazie żelatyny ze skór wołowych jest kształtowane w postaci „kapsułek” umieszczanych na podłożu wykonanym z żelatyny ze skór wieprzowych jak ujawnionym w patencie PL236775B1.

Podłoże transportowe do długotrwałego przechowywania jaj, w którym umieszczane są jaja ATT, przygotowuje się w studzienkach wykonanych w warstwie podstawowej podłoża z żelatyny ze skór wieprzowych otrzymanej w procesie kwaśnym typu A o pH od 3,8 do 5,0 i twardości 290–310 Bloom,

korzystniej około 300 Bloom. W tym celu żelatynę wieprzową rozpuszcza się w wodzie destylowanej ogrzanej do temperatury od 55 do 60°C, tworząc roztwór o zawartości 7–9% wagowych żelatyny, korzystnie ok. 8% wagowych żelatyny. Płynne podłoże doprowadza się do temperatury ok. 45°C i zalewa płytki Petriego na wysokość od 6 do 8 mm, po czym pozostawia w temp. ok. 6°C przez kilka godzin (do 24 godzin) do zakrzepnięcia. Następnie w zestalonym podłożu tworząca warstwę podstawową, korborem wycina się dołki w formie studzienki o średnicy od 5 do 10 mm. Ilość dołków jest zależna od liczby dodawanych jaj ATT, które mają być przechowane w podłożu.

Dla wytworzenia warstwy podłoża do umieszczenia w nich jaj ATT żelatynę wołową rozpuszcza się w wodzie destylowanej ogrzanej do temperatury ok. 50°C, tworząc roztwór o zawartości 7–9% wagowych żelatyny, korzystnie 8% wagowych żelatyny. Do płynnego podłoża ostudzonego do temperatury ok. 40°C, ewentualnie dodaje się antybiotyki, korzystnie (streptomycynę, penicylinę, i tak przygotowanym podłożem zalewa dno studzienki do ok. 1/4 jej objętości, po czym pozostawia w temp. 4–8°C, korzystnie w około 6°C przez około od 2 do 4 godzin do zakrzepnięcia. Następnie do studzienki dodaje się określoną liczbę wcześniej przygotowanych jaj pasożytów. W tym celu jaja *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp. pozyskane z macic dojrzałych samic tych nicieni oczyszczone przykładowo m.in. przy użyciu płuczki ultradźwiękowej i zawieszono w jałowym płynie fizjologicznym każdy z rodzajów osobno, dodawane są na warstwę żelatyny wołowej wylanej na dno studzienki. Jaja izoluje się z płynu fizjologicznego za pomocą mikropipety przy użyciu mikroskopu. Umieszczone w studzience jaja ATT zalewa się ostrożnie dodając ok. 2/4 wyjściowej objętości studzienki ostudzonym roztworem opisanej żelatyny wołowej. W czasie tężenia żelatyny sprawdza się pod mikroskopem liczbę umieszczonych jaj. Po zastygnięciu żelatyny, jaja ATT zabezpiecza się kolejną warstwą ostudzonej ok. 1/4 objętości opisanej żelatyny wołowej. Płytkę umieszcza się w temperaturze ok. 6°C przez okres od 2 do 4 godzin do całkowitego zestalenia żelatyny wołowej. Zabezpieczone w ten sposób jaja pasożytów ATT można przechowywać w temp. ok. 6°C przez okres około 2 miesięcy.

Istotnym elementem różniącym podłoża transportowego wytworzone według niniejszego wynalazku od sposobu wytwarzania podłoża opisanego w PL236775B1 jest stosowanie dwóch różnych żelatyn o różnych właściwościach fizyko-biologicznych. Temperatura potrzebna do rozpuszczenia stosowanej do wytworzenia bazowego podłoża żelatyny wieprzowej to około 45°C a dla stosowanej do wytworzenia wypełnienia studzienki (wytworzenia kapsułki) podłoża żelatyny wołowej temperatura potrzebna do przejścia w stan ciekły jest znacznie niższa tj. ok. od 27°C do 37°C.

Przeprowadzone przez twórców badania wykazały, że zamknięcie jaj pasożytów ATT w kapsułce z żelatyny ze skór wołowych typu B o twardości ok. 100 Bloom nie wpływa negatywnie na dalszy ich rozwój. Dodatek antybiotyków do roztworu żelatyny wołowej pozwala na zahamowanie rozwoju bakterii.

Żelatyna wieprzowa w temperaturze pokojowej zachowuje konsystencję stałą, a w temperaturze ok. 6°C jest silnie zestalona i wykazuje znacznie mniejszą od pozostałych typów żelatyny skłonność do rozwoju w niej bakterii i grzybów ze względu na znacznie ograniczony dostęp tlenu. Z tego też względu żelatyna ta nie jest odpowiednia jako podłoże do przechowywania różnych jaj ATT. Żelatyna wieprzowa ze względu na swe właściwości natomiast dobrze sprawdza się jako część bazowa podłoża, w którym umieszczone są „kapsułki” z żelatyny wołowej.

Żelatyna wołowa natomiast posiada konsystencję luźniejszą, bardziej miękką. Do pełnego stężenia potrzebuje dłuższego czasu schłodzenia (od 2 do 4 godzin w temp. ok. 6°C) niż żelatyna wieprzowa.

Istotnym elementem sposobu wytwarzania podłoża transportowego według wynalazku jest zastosowanie żelatyny ze skór wołowych typu B o twardości ok. 100 Bloom do wykonania tzw. kapsułki z umieszczanymi w niej jajami ATT, przygotowanej w studzienkach wytworzonych w warstwie podstawowej podłożu przygotowanej ze skór wieprzowych typu A o twardości ok 300 Bloom, ze względu na bardzo zwartą konsystencję. Zastosowane jako warstwa podstawowa podłoża żelatyna wieprzowa, ze względu na swoją odrębność, pozwala na precyzyjne przetransportowanie „kapsułki” z jajami ATT i umieszczenie jej w próbkach nawozu organicznego. Jedną z zalet zastosowania żelatyny wołowej jest jej barwa jasnożółta, co łatwo pozwala odróżnić wytworzoną z niej „kapsułkę”. Choć barwa ta jest nieco ciemniejsza od roztworu żelatyny wieprzowej, to przez odpowiednią jej przejrzystość zapewnia łatwą możliwość policzenia pod mikroskopem zawieszonych w niej jaj ATT.

Żelatyna na bazie skór wołowych potrzebuje znacznie niższej temperatury do przejścia w stan ciekły tj. ok. od 27°C do 37°C a zatem kolejną zaletą jest to, że do rozpuszczenia kapsułki z żelatyny wołowej z jajami ATT podczas badania próbek nawozów organicznych potrzebne jest zastosowanie jedynie temperatury 37°C przez ok. 2 godzin. Temperatura ta jest bezpieczna dla dalszego rozwoju jaj ATT. W pro-

wadzonych przez twórców badaniach wykazano, że największą liczbę jaj ATT izolowano z próbek kontaminowanych jajami ATT zatopionymi w żelatynie wołowej. W przypadku żelatyny wieprzowej temperatura konieczna do jej przejścia w stan ciekły jest zbyt wysoka, przez co negatywnie wpływa na rozwój jaj pasożytów ATT.

W przeprowadzonych przez twórców badaniach podjęto próbę przygotowania kapsułek na bazie żelatyny rybiej, która ma konsystencję półpłynną i w temperaturze ok. 21°C rozpuszcza się po ok. 15 minutach, ale izolacja jaj z próbki kontaminowanej taką kapsułką jest utrudniona. Wiąże się to z tym, że pomimo konsystencji półpłynnej i niższej temperatury jej rozpuszczania, jest ona bardzo kleista i powoduje oblepianie jaj pasożytów z częściami organicznymi zawartymi w próbce nawozu, co utrudnia ich izolację z próbki.

Zaletą sposobu wytwarzania podłoża transportowego dla jaj pasożytów ATT według wynalazku jest dostarczenie skutecznej metody i podłoża do długotrwałego przechowywania żywych jaj ATT pozwalającej na przygotowanie odpowiedniej jakości certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM), niezbędnych do przygotowywania próbek kontaminowanych jajami ATT w celu potwierdzania ważności prowadzonych badań PT/ILC. Opracowany sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj ATT jest odpowiednim i bezpiecznym sposobem transportu CRM. Pozwala także na określenie ich trwałości w trakcie przechowywania. Obecnie komercyjne CRM żywych jaj pasożytów z rodzajów ATT nie są dostępne ani w Polsce, ani na świecie. Natomiast opracowane rozwiązanie wypełnia tę lukę. Odpowiednio przechowywane jaja ATT są ponadto narzędziem treningowym dla uczestników badań usprawniającym diagnostykę różnicowania form rozwojowych jaj ATT w próbkach. Istotną zaletą stosowania stałych mediów (żelatyny) jest możliwość dokładnego określania pod mikroskopem liczby jaj, co zapewnia jednorodność próbek i porównywalność wyników.

Przeprowadzone przez twórców badania wykazały, że zamknięcie jaj pasożytów ATT w opracowanej „kapsułce” z żelatyny ze skór wołowych nie wpływa negatywnie na ich dalszy rozwój. Dodatek antybiotyków do roztworu żelatyny pozwala na zahamowanie rozwoju bakterii, które zabierają w podłożu tlen potrzebny do rozwoju jaj ATT.

Podłoże wytworzone sposobem wytwarzania według wynalazku pozwala na długotrwałe przechowywanie żywych jaj nicieni z rodzajów *Ascaris*, *Trichuris* i *Toxocara* (ATT). Sposób wytwarzania podłoża transportowego do przechowywania jaj ATT pozwala na wykorzystanie w/w jaj pasożytów jako materiały odniesienia (RM/CRM), korzystnie w parazytologicznych badaniach osadów ściekowych i nawozów organicznych niezbędnych do przeprowadzenia międzylaboratoryjnych badań porównawczych i badań biegłości (PT/ILC) w tym kierunku.

#### **SZCZEGÓLWE PRZEDSTAWIENIE WYNALAZKU KRÓTKI OPIS FIGUR RYSUNKU**

Przykładowe realizacje wynalazku zaprezentowano na figurach rysunku, na których:

**Fig. 1** Przedstawia zdjęcia **a)** płytki Petriego w widoku z góry z boku z warstwą podstawową z żelatyny wieprzowej z wyciętymi studzienkami; **b)** płytki Petriego w widoku z góry z warstwą podstawową z żelatyny wieprzowej ze studzienkami wypełnionymi kapsułkami z umieszczonymi w nich jajami ATT; **c)** przedstawia w powiększeniu fragment wytworzonego podłoża transportowego do długotrwałego przechowywania jaj ATT z widocznymi kapsułkami w warstwie podstawowej.

Cytowane w opisie publikacje oraz podane w nich odniesienia są w całości niniejszym włączone, jako referencje. Poniższe przykłady ilustrują wynalazek, nie ograniczając go w żaden sposób.

#### **SPOSOBY WYKONANIA WYNALAZKU**

Poniższe przykłady umieszczono jedynie w celu zilustrowania wynalazku oraz wyjaśnienia poszczególnych jego aspektów, a nie w celu jego ograniczenia i nie powinny być utożsamiane z całym jego zakresem, który zdefiniowano w załączonych zastrzeżeniach.

#### **PRZYKŁADY**

##### **Przykład 1 Wyizolowanie jaj z nicieni ATT**

Jaja *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp. (ATT) wyizolowano z macic dojrzałych samic i oczyszczono m.in. przy użyciu płuczki ultradźwiękowej, następnie zawieszono w jałowym płynie fizjologicznym, każdy z rodzajów osobno i przechowywano w temperaturze ok. 6°C do wykorzystania do zatopienia ich w podłożu transportowym (patrz **Przykład 2**). Jaja ATT można również wyizolować innymi znanymi metodami.

## **Przykład 2** Wytworzenie podłoża transportowego do długotrwałego przechowywania jaj ATT

### **A).** Wytworzenie warstwy podstawowej podłoża na bazie żelatyny wieprzowej

Warstwę podstawową podłoża transportowego wytworzono z żelatyny uzyskanej na bazie skór wieprzowych otrzymanej w procesie kwaśnym typu A o pH od 3,8 do 5,0 i twardości 300 Bloom.

W tym celu żelatynę wieprzową rozpuszczono na gorąco w wodzie destylowanej podgrzanej do temperatury ok. 60°C, tworząc roztwór o zawartości ok. 8% wagowych żelatyny. Płynne podłoże doprowadzono do temperatury ok. 45°C i zalano nim płytki Petriego na wysokość od 6 do 8 mm, po czym pozostawiono w temperaturze ok. 6°C przez kilka godzin do zakrzepnięcia żelatyny. Następnie w zastygniętym podłożu wycięto korkoborem dołki w formie studzienek o średnicy od 5 do 10 mm. Ilość studzienek zależała od ilości umieszczanych w kolejnym etapie wytwarzania podłoża transportowego jaj ATT).

### **B).** Wytworzenie żelatynowych kapsułek podłoża na bazie żelatyny wołowej

Żelatynowe kapsułki w podłożu transportowym przygotowano na bazie żelatyny ze skór wołowych otrzymywanej metodą alkaliczną typu B o pH od 4,0–7,0 i twardości 100 Bloom. Żelatynę wołową rozpuszczono w destylowanej H<sub>2</sub>O ogrzanej do temperatury ok. 50°C, tworząc roztwór o zawartości 8% wagowych żelatyny. Do płynnego podłoża ostudzonego do temperatury ok. 40°C, dodawano antybiotyki (streptomycyna: 1 mg / 10 ml H<sub>2</sub>O – 0,15 ml / 15 ml podłoża; penicylina: 1 200 000 j.p. / 10 ml H<sub>2</sub>O – 0,15 ml / 15 ml podłoża) i tak przygotowanym podłożem zalewano dno studzienki wytworzonej w warstwie podstawowej podłoża transportowego do ok. 1/4 jej objętości wytwarzając dolną warstwę kapsułki, po czym pozostawiano w temp. ok. 6°C przez ok. 2 godziny do zakrzepnięcia.

Następnie do poszczególnych studzienek dodawano określoną liczbę przygotowanych wcześniej i przechowywanych w temperaturze 6°C poszczególnych jaj pasożytów – uzyskanych w Przykładzie 1. Jaja ATT z płynu fizjologicznego izolowano za pomocą mikropipety przy użyciu mikroskopu i umieszczano w studzience. Następnie studzienki uzupełniano o 2/4 objętości wyjściowej warstwą żelatyny wołowej, uzyskując 3/4 wypełnienia studzienki. W czasie tężenia żelatyny wołowej w studzience sprawdzano pod mikroskopem liczbę umieszczonych w niej jaj. Następnie płytkę Petriego umieszczano w temperaturze ok. 6°C na 3–6 godzin (maksymalnie 24 godziny), do zastygnięcia środkowej warstwy kapsułki. Po zastygnięciu żelatyny z środkowej warstwy kapsułki dodawano do studzienki kolejną warstwę żelatyny wołowej, tak aby w pełni wypełnić studzienkę. Płytkę umieszczano w temperaturze ok. 6°C do całkowitego zestalenia żelatyny wołowej, korzystnie na ok. 2 godziny. Zabezpieczone w ten sposób jaja pasożytów ATT mogą być przechowywane przez okres około 1 miesiąca w temperaturze pokojowej i co najmniej przez dwa miesiące w temp. ok. 6°C. Zdjęcia wytworzonego podłoża transportowego przedstawione są na **Fig. 1**.

Do wytworzenia dolnej, środkowej i górnej warstwy kapsułki podłoża wykorzystano ten sam roztwór żelatyny wołowej, korzystnie uzupełniony o antybiotyki. Można jednak zastosować dla wytworzenia poszczególnej warstwy kapsułki żelatynę o trochę innych parametrach, pod warunkiem, że poszczególne warstwy wytworzone są z żelatyny uzyskanej na bazie skór wołowych otrzymywanej metodą alkaliczną typu B o pH od 4,0 do 7,0 i twardości od 90 do 120 Bloom. Usytuowanie jaj ATT w warstwie środkowej dodatkowo zabezpiecza je przez uszkodzeniami i wydłuża ich przechowalność.

W środkowej warstwie kapsułki z żelatyny wieprzowej jaja pasożytów są zabezpieczone zewnętrznymi warstwami tj. warstwą dolną i górną. Wyjmując całą kapsułkę z warstwy podstawowej z podłoża z żelatyny wieprzowej, liczba jaj w niej zamkniętych pozostaje stała, co jest szczególnie ważne, gdyż jaja pasożytów ze względu na posiadana otoczkę białkową bardzo łatwo przyczepiają się do podłoża, z którym mają styczność. Jaja ATT mają zdolność przywierania również do gładkich powierzchni i łatwo można je zgubić, np. na szkle podczas wykonywania badań. Warstwa żelatyny wieprzowej chroni kapsułkę wokół, a wytworzona kapsułka jest łatwa do wyodrębnienia z podłoża z warstwy podstawowej z żelatyny wieprzowej.

## **Zastrzeżenia patentowe**

1. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp. (ATT) **znamienny tym**, że obejmuje etapy, w których
  - a) wytwarza się warstwę podstawową z żelatyny wieprzowej uzyskanej na bazie skór wieprzowych i otrzymanej w procesie kwaśnym typu A o pH od 3,8 do 5,0 i twardości 290–310 Bloom, przy czym
    - i) żelatynę wieprzową rozpuszcza się na gorąco w wodzie destylowanej podgrzanej do temperatury od 55 do 65°C, tworząc roztwór o zawartości od 8 do 10% wag.,

- płynną żelatynę schładza się do temperatury od 45 do 50°C i podłożem z żelatyny wieprzowej zalewa się płytkę, korzystnie płytkę Petriego, korzystnie na wysokość warstwy podłoża z żelatyny wieprzowej od 6 do 8 mm, zalaną żelatyną wieprzową płytkę pozostawia się w temperaturze od 4 do 8°C do zakrzepnięcia podłoża z żelatyny wieprzowej, korzystnie przez okres do 24 godzin; w zastygniętym podłożu z żelatyny wieprzowej wycina się studzienki o średnicy od 5 do 10 mm, uzyskując warstwę podstawową podłoża transportowego;
- b) wytwarza się kapsułki podłoża dla przechowywania jaj pasożytów jelitowych ATT z żelatyny wołowej uzyskanej na bazie skór wołowych i otrzymywanej metodą alkaliczną typu B o pH od 4,0 do 7,0 i twardości od 90 do 120 Bloom, przy czym żelatynę wołową rozpuszcza się w wodzie destylowanej ogrzanej do temperatury od 45 do 55°C, tworząc roztwór o zawartości od 8 do 10% wag. żelatyny, płynną żelatynę schładza się do temperatury od 35 do 40°C, i tak przygotowanym podłożem z żelatyny wołowej, zalewa się studzienkę wytworzoną w warstwie podstawowej dla wytworzenia warstwy dolnej kapsułki, po czym płytkę pozostawia się w temperaturze od 4 do 8°C do zakrzepnięcia warstwy dolnej kapsułki, korzystnie przez od 2 do 4 godzin; do studzienek na warstwę dolną kapsułki nanosi się jaja pasożytów ATT i studzienki uzupełniana się podłożem z żelatyny wołowej dla wytworzenia środkowej warstwy kapsułki z umieszczonymi w niej jajami ATT, po czym pozostawia się płytkę w temperaturze od 4 do 8°C do zakrzepnięcia środkowej warstwy kapsułki, korzystnie przez od 2 do 4 godzin; po zastygnięciu środkowej warstwy kapsułki do studzienki dodaje się podłoże z żelatyny wołowej dla wytworzenia górnej warstwy kapsułki, po czym pozostawia się płytkę w temperaturze od 4 do 8°C do zestalenia się górnej warstwy kapsułki, korzystnie przez od 2 do 4 godzin.
2. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT według zastrz. 1, **znamienny tym**, że podłoże z żelatyny wołowej w etapie b) uzupełnia się antybiotykiem, korzystnie wybranym z streptomycyny, penicyliny.
  3. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT według zastrz. 1–2, **znamienny tym**, że w etapie b) wytwarza się kapsułki podłoża na bazie żelatyny ze skór wołowych otrzymywanych metodą alkaliczną typu B o pH od 4,0–7,0 o twardości 100 Bloom.
  4. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT według zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że w etapie a) wytwarza się warstwę podstawową z żelatyny wieprzowej uzyskanej na bazie skór wieprzowych i otrzymanej w procesie kwaśnym typu A o pH od 3,8 do 5,0 i twardości 300 Bloom.
  5. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT według zastrz. 1–4, **znamienny tym**, że jaja pasożytów jelitowych nanoszone do studzienek w etapie b) uzyskuje się przez wyizolowanie z macic dojrzałych samic *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. i *Toxocara* spp., poprzez ich oczyszczenie i rozdzielenie ze skupisk, w których się znajdują, przy użyciu płuczki ultradźwiękowej i płynu fizjologicznego i przechowuje w temperaturze 6°C.
  6. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT według zastrz. 1–5, **znamienny tym**, że w etapie b) dla wytworzenia warstwy dolnej kapsułki zalewa się studzienkę podłożem z żelatyny wołowej w ilości  $1/4 \pm 10\%$  wyjściowej objętości studzienki, korzystnie w ilości  $1/4$  wyjściowej objętości studzienki; dla wytworzenia środkowej warstwy kapsułki do studzienki dodaje się podłoże z żelatyny wołowej w ilości  $2/4 \pm 10\%$  wyjściowej objętości studzienki, korzystnie  $2/4$  wyjściowej objętości studzienki; dla wytworzenia górnej warstwy kapsułki zalewa się studzienkę podłożem z żelatyny wołowej w ilości  $1/4 \pm 10\%$  objętości studzienki, korzystnie w ilości  $1/4$  wyjściowej objętości studzienki.

7. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT według zastrz. 1–6, **znamienny tym**, że w etapie b) do studzienek nanosi się jaja pasożytów ATT za pomocą mikropipety pod obserwacją mikroskopową.
8. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT według zastrz. 1–7, **znamienny tym**, że w etapie b) nanoszona liczba jaj pasożytów ATT jest określana pod mikroskopem.
9. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT według zastrz. 1–8, **znamienny tym**, że w etapie a) wycina się studzienki korkoborem.
10. Sposób wytwarzania podłoża transportowego dla żywych jaj pasożytów jelitowych ATT według zastrz. 1–9, **znamienny tym**, że wytworzone w etapie b) podłoże transportowe z żywymi jajami pasożytów jelitowych ATT następnie przechowuje się w temperaturze od 4 do 8°C, korzystnie przez okres co najmniej dwóch miesięcy, korzystnie jednego miesiąca.

## Rysunek

Fig. 1

