



УКРАЇНА

(19) UA (11) 31575 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 1/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ФАРБУВАННЯ МАЗКІВ МОЛОКА ДЛЯ ЦИТОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

1

2

(21) u200714678

(22) 25.12.2007

(24) 10.04.2008

(46) 10.04.2008, Бюл.№ 7, 2008 рік

(72) ЯКУБЧАК ОЛЬГА МИКОЛАЇВНА, UA, БІЛИК
РУСЛАН ІВАНОВИЧ, UA, ТАРАН ТЕТЯНА
ВОЛОДИМИРІВНА, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
UA(57) Спосіб фарбування мазків молока для
цитологічного дослідження, що включає сушіння
мазків при кімнатній температурі, поетапне
фарбування фарбою Май-Грюнвальда - спочатку
стандартним розчином, а потім 50% розчином,
нанесення стандартного розчину фарби

Романовського-Гімза з експозицією 15 хв, промивання дистильованою водою та висушування, який **відрізняється** тим, що пробу свіжовидоєного молока (останні порції наприкінці доїння) наносять на предметне скельце в кількості $0,01\text{ см}^3$ і розподіляють на площі 1 см^3 (підкладають під скло папір в клітинку і окреслюють межі 1 см^3), висушують без доступу світла, фіксують з послідовним нанесенням розчинів ксилолу з експозицією до 30 с, етилового спирту 95° з експозицією 30 с з тривалістю експозиції фарбування фарбою Май-Грюнвальда стандартним розчином - 5 хв та 50% розчином - 10 хв.

Корисна модель відноситься до області ветеринарної медицини, зокрема до ветеринарної мікробіології, ветеринарної цитології і може бути використана для ідентифікації клітинного складу секрету молочної залози та діагностики патологій молочної залози при захворюваннях різної етіології.

Відомий спосіб електронної цитометрії який базується на принципі автоматичного прямого підрахунку попередньо пофарбованих люмінесцентними барвниками клітин, що знаходяться в пробах молока. Принцип роботи ґрунтується на фарбуванні клітин специфічним барвником, який реагує з ДНК соматичних клітин. Нині світовий ринок достатньо оснащений приладами для визначення кількості соматичних клітин молока виробництва різних фірм. Процедури дослідження молока методом електронної цитометрії описані у технічних вимогах та настановах із застосування приладів у відповідності з [ISO 13366-2:1997. Електронний метод підрахунку клітин]. Метод не дозволяє диференціювати клітини молока [ISO 13366-1:1997. Part 2: Electronic particle counter method. Метод мікроскопії (референтний) за ISO 13366-1:1997. Визначення кількості соматичних клітин] при якому молоко для дослідження повинно бути доставлено не пізніше 6 год від часу взяття проби. Пробу

молока підігрівають на водяній бані при температурі 36°C . Потім охолоджують до кімнатної температури і обов'язково добре перемішують молоко. Беруть $0,01\text{ см}^3$ і розподіляють на предметному склі, площею 1 см^3 (підкладають під скло папір в клітинку $20\text{мм}\times 5\text{мм}$ і окреслюють межі 1 см^3). З кожної проби молока роблять 4 мазки. Приготовлений препарат сушать при кімнатній температурі 24 год. Та фарбують з експозицією 10 хв фарбою в складі: спирт етиловий 95%-54 см^3 ; тетрахлоретан - 40 см^3 ; метиленовий блакитний - 0,6г; кислота ацетатна льодяна - 6,0 см^3 (до 100 см^3). Потім препарати-відбитки занурюють у ємність з дистильованою водою, висушують та проглядають під імєрсією (x1000). Метод не дозволяє диференціювати клітини молока.

Відомий спосіб фарбування мазків молока за методом Прескотта-Бріdda [Якубчак О.М., Хоменко В.І., Мельничук С.Д., та ін. Ветеринарно-санітарна експертиза з основами технології і стандартизації продуктів тваринництва. - К.: Біопром. - 2005. - С.496.], при якому беруть $0,005\text{ см}^3$ молока, якщо воно з 1 частки вимені або $0,01\text{ см}^3$ - (для збірного) і розподіляють на предметному склі, площею 1 см^3 (підкладають під скло папір в клітинку і окреслюють межі 1 см^3). Висушують на повітрі та фіксують метанолом. Фарбують за Романовським-Гімзою (1 см^3

(19) UA (11) 31575 (13) U

дистильованої води +1-2 краплі концентрованої фарби, тобто на 20см³ води - 1см³ фарби). Фарбують у чашках Петрі 15-20хв (на дно чашок Петрі розміщують сірники без голівок, на них мазками донизу ставлять скельця з зафіксованими мазками і підшаровують фарбу). Промивають та висушують. Мікроскопія. В кожному мазку оглядають 100 полів зору. Підраховану кількість клітин перемножують на коефіцієнт для підрахунку з урахуванням об'єктиву та окуляру (для мікроскопу МБ-1 з об'єктивом 90 та окуляром 7 коефіцієнт дорівнює 6260; для окуляру 10 - 10200).

Відомий спосіб фарбування мазків молока за Ньюменсом [Ивашура А.И. Гигиена производства молока. - М.: Росагропромиздат, 1989. - С.209.] в якому для фарбування мазків використовують розчин наступного складу: спирт абсолютний - 50см³, льодяна оцтова кислота - 20см³, хлороформ - 50см³, фуксин основний - 0,1г, метиленова синька - 1,0. Фарбу розчиняють в суміші спирту і хлороформу, нагрітої до 50°C. Після охолодження до кімнатної температури в розчин додають льодяну оцтову кислоту і витримують протягом 18год, а потім використовують для фарбування. Після фарбування препарат висушують і промивають трикратно теплою водою (37-40°C). Мазок висушують і продивляються під мікроскопом. В кожному мазку продивляються 100 полів зору. Підраховану кількість клітин перемножують на коефіцієнт для підрахунку з урахуванням об'єктиву та окуляру (для мікроскопу МБ-1 з об'єктивом 90 та окуляром 7 коефіцієнт дорівнює 6260; для окуляру 10 - 10200). Спосіб фарбування мазків крові (двоментний) за Паппінгеймом (Май-Грюнвальд - Гімза), при якому мазки крові висушують при кімнатній температурі [Карпуть І.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. - Мн.: Ураджай, 1986. - С.20-21, прототип]. Після висушування мазок покривають 2см³ нерозведеної фарби Май-Грюнвальда. Через 3 хвилини до фарби Май-Грюнвальда, яка нанесена на мазок додають 2см³ дистильованої води і ретельно перемішують їх продуванням або послідовним набиранням і випусканням через тонку піпетку. Коли через 3 хвилини мазок набуває рожевого відтінку, фарбу з препарату зливають і після цього, не висушуючи, 10...15 хвилин фарбують мазок робочим розчином фарби Гімза, а потім промивають чистою дистильованою водою. Цей спосіб вдало виявляє зернистість клітин фарбою Май-Грюнвальд та забезпечує чітку окраску структури ядра розчином Гімза. Клітини крові в препаратах, пофарбованих за Романовським-Гімзою в модифікації

Паппінгейма, більш насичені кольорами та краще дозволяють диференціювати структуру клітин.

Недоліком відомого способу фарбування мазків є те що він не дозволяє диференціювати клітини молока.

Корисною моделлю ставиться завдання розробити спосіб фарбування мазків молока, з подальшим використанням цих мазків для ідентифікації клітинного складу секрету молочної залози для діагностики її патологій при захворюваннях різної етіології.

Поставлене корисною моделлю завдання досягається тим, що у способі фарбування мазків молока для цитологічного дослідження, що включає сушіння при кімнатній температурі, поетапне фарбування фарбою Май-Грюнвальда - спочатку стандартним розчином, а потім 50% розчином, нанесення стандартного розчину фарби Романовського-Гімза з експозицією 15хв, промиванням дистильованою водою та висушування, згідно корисної моделі пробу свіжовидоєного молока (останні порції наприкінці доїння) наносять на предметне скельце в кількості 0,01см³ і розподіляють на площі 1см (підкладають під скло папір в клітинку і окреслюють межі 1см³), висушують без доступу світла, фіксують з послідовним нанесенням розчинів ксилолу з експозицією до 30с, етилового спирту 95° з експозицією 30с з тривалістю експозиції фарбування фарбою Май-Грюнвальда стандартним розчином - 5хв та 50% розчином - 10хв. Приклад. Пробу свіжовидоєного молока, останні порції наприкінці доїння, наносять на предметне скельце в кількості 0,01см³ і розподіляють на площі 1см³, шляхом підкладання під скло паперу в клітинку і окресленням межі 1см³, висушують без доступу світла, фіксують розчином ксилолу з експозицією до 30с, етиловим спиртом 95° з експозицією 30с. Зливають залишки реактивів та підсушують. Наносять фарби:

1. Май-Грюнвальда (стандартний розчин) - експозиція 5 хвилин;
2. Май-Грюнвальда (50% розчин) - експозиція 10 хвилин;
3. Романовського-Гімза (стандартний розчин) - експозиція 15 хвилин. Потім препарати-мазки занурюють у ємність з дистильованою водою, висушують та оглядають під іммерсією зі збільшенням x1000.

Спосіб фарбування дозволяє диференціювати структуру клітин молока, може бути використаний для діагностики патологій молочної залози при захворюваннях різної етіології, у роботі наукових та науково-виробничих лабораторій ветеринарної медицини.