



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91383** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A01K 45/00
A61D 99/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: а 2013 13698	(72) Винахідник(и): Гончарова Олена Вікторівна (UA), Баранченко Віталій Олексійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 25.11.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2014	(73) Власник(и): ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Ворошилова, 25, м. Дніпропетровськ, 49027 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2014, Бюл.№ 13	

(54) СПОСІБ ПІДРАХУНКУ ФОРМЕНИХ ЕЛЕМЕНТІВ (ЛЕЙКОЦИТІВ) В КРОВІ СТРАУСЕНЯТ

(57) Реферат:

Спосіб підрахунку лейкоцитів в крові страусенят включає в себе відбір крові, її стабілізацію гепарином, розбавлення крові в меланжері трансформуючим розчином та проведення підрахунку лейкоцитів в лічильній камері Горяєва під мікроскопом.

UA 91383 U

Галузь техніки: Корисна модель відноситься до розділу сільського господарства в галузі птахівництва, може бути використана при проведенні підрахунків кількості лейкоцитів в крові страусенят.

Суть корисної моделі. Технічною задачею, на вирішення якої направлена корисна модель, є функціональність та скорочення часу проведення досліджень морфо-функціональних показників крові страусенят, а також підвищення точності підрахунку лейкоцитів в їх крові. Поставлене завдання вирішується за рахунок відбору крові, її стабілізації гепарином, розбавленням в меланжері трансформуючим розчином, проведенням підрахунку лейкоцитів під мікроскопом.

Із існуючого рівня техніки найбільш близьким до заявленого способу відомим є уніфікований метод підрахунку формених елементів (еритроцитів, лейкоцитів) в лічильній камері (1972). Принцип такого методу є підрахунок формених елементів під мікроскопом в певній кількості квадратів лічильної сітки і перерахунок на 1 мкл крові, виходячи з обсягу квадратів і розведення крові. При цьому речовину, якою наповнюють меланжер та розбавляють кров птиці є розчин хлориду натрію або розчин Гайема. Недоліки такого методу при підрахунках кількості лейкоцитів в крові страусів є висока працездатність і недостатня точність отриманих результатів. Лейкоцити та еритроцити страусів мають свої морфо-функціональні особливості, в тому числі і різну осмотичну резистентність до різних розчинів. Тому для їх мікроскопічного дослідження в камері Горяєва був запропонований спосіб використання саме трансформуючого розчину із набору реактивів для визначення гемоглобіну по Драбкіну, до складу якого входить сильнодіючий гемолізін. Цим розчином з кров'ю заповнювали меланжер за загальноприйнятою методикою. Для визначення часу для повноцінного гемолізу, з декількох одноразово заповнених меланжерів через однакові проміжки (2-3 години) випускали суміш у камеру Горяєва і спостерігали зміну з боку еритроцитів під дією гемолізуючих речовин. Дані досліджень показали, що при збереженні меланжерів, заповнених кров'ю та трансформуючим розчином у холодильнику впродовж не менш 2-х діб, виникає повний гемоліз еритроцитів, від них та ядер залишаються зовсім малоконтрастні тіні, які не заважають рахувати у камері Горяєва лейкоцити, які виглядають дуже контрастно з чіткими мембранами.

При такому способі на підрахунок клітин у 100 великих квадратах камери Горяєва витрачається не більше 8-10 хвилин. І, що не менш важливо - не втомлюється зір дослідника. Одночасно були проведені контрольні виміри кількості лейкоцитів одних і тих же страусів з меланжерів, заповнених трансформуючим розчином і 3 % розчином оцтової кислоти, яка взагалі не призводить до гемолізу еритроцитів птиці, вказало на те, що відносна похибка показників дорівнює 3-4 %.

Таким чином, 2-х добове витримування меланжерів з кров'ю і трансформуючим розчином в холодильнику, дозволяє за цей час проводити інші дослідження крові, але потім набагато скоротити час і трудомісткість кількісного визначення лейкоцитів в камері Горяєва.

Другий аспект стосувався можливості дещо спростити визначення лейкоцитарної формули при мікроскопії мазка крові, де велика кількість ядерних еритроцитів, затрудняє візуальний пошук та диференціювання лейкоцитів. Наші спроби, які базувались на вищевказаному прийомі, показали, що ні трансформуючий розчин, ні гіпотонічні розчини хлориду натрію (0,1 %; 0,2 %) при розведенні пропорційному її розведенні в меланжері не дозволяє зробити мазок на склі: це була майже вода. Менше розведення (1:1) дозволяло зробити мазок, але гемолізуючого ефекту не було. Були спробовані різні співвідношення крові та розчинів, але результат не змінився. Крім того, низькі концентрації хлориду натрію приводили до розбухання як еритроцитів, так і лейкоцитів, що взагалі робило неможливим диференціювання останніх. Тому спроби виготовлення мазків крові з гемолізованими еритроцитами були припинені.

Маючи на увазі, що формула білої крові це співвідношення різних видів лейкоцитів серед 100 клітин, а їх спостереження лімітується лише площею мазка, був обраний другий шлях. Принцип полягає у наступному: підібрати таке розведення крові ізотонічним розчином, чи близьким до нього, щоб і одержати на склі мазок крові, при цьому істотно знизити представництво клітин на одиницю площі мазка (з метою суттєво зменшити у полі зору мікроскопа кількість еритроцитів), що буде сприяти скороченню часу на пошук та диференціювання лейкоцитів і менше буде втомлювати зір при багаторазовому дослідженні мазків крові.

Оптимальним варіантом розбавленої крові, який давав дуже тонкий, але помітний неозброєним оком мазок на склі після висихання, було її розведення 1:2. Застосування 0,9 % розчину хлориду натрію з цією метою призвело до незвичайного ефекту: при мікроскопії пофарбованих мазків у полях зору всієї площини об'єктів не можна було помітити ні одного лейкоцита, в той час коли еритроцити виглядали звичайно. Були спробовані різні концентрації NaCl і добрий результат був одержаний при застосуванні 0,5 % розчину. То ж, для методики

визначення лейкоцитарної формули у страусів доцільно на годинниковому склі тонкою скляною паличкою ретельно змішати 0,1 мл стабілізованої крові з 0,2 мл 0,5 % розчину NaCl, а потім з цієї суміші зробити мазок, зафіксувати і пофарбувати за Романовським-Гімзою. Пошук лейкоцитів та їх диференціювання треба обов'язково проводити за методом Меадра-Шіллінга.

5 Приклад конкретного виконання

Експеримент проводився в умовах корпорації "Агро-союз" (Україна, Дніпропетровська область) на базі виробничого страусинового комплексу. В експерименті використовували страусенят віком від вилуплення до 2 місяців (100 голів). Страусенята були однієї інкубації, умови годівлі і утримання - однакові.

10 Для дослідження кров у 60-добових страусів для визначення гематологічних показників відбирали з підкрильцевої вени вранці до початку годівлі. Стабілізували кров шляхом внесення до пробірки антикоагулянту - гепарину у розрахунку на 15-20 мл крові - 2-3 краплі 1 % розчину гепарину. У відібраних зразках крові визначали: кількість еритроцитів (Т/л) та лейкоцитів (Г/л). Фарбування мазків крові для визначення лейкоцитарної формули проводили за Романовським-Гімза; вміст гемоглобіну (г/л) - гемоглобінціанідним методом з використанням ацетонціангідрину; індекси еритроцитів (середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH), середню концентрацію гемоглобіну в еритроциті (MCHC), середній об'єм еритроцитів (MCV) - розрахунковим методом; осмотичну резистентність еритроцитів - у суміші з різним вмістом ізотонічних розчинів натрію хлористого.

20 Слід відмітити, що при кількісному визначенні лейкоцитів можна застосовувати гемолізину типу сапоніну чи гінсофіліну. Але ми вже мали досвід застосування гіпсофіліну при визначенні кількості лейкоцитів у корів, свиней та собак при роботі на кондуктометричному гемоцитометрі на електронно-луговій трубці якого навіть через 25-30 хвилин після внесення гемолізату просліджувались «треки» еритроцитів, що свідчило про неповноцінність гемолізу і включало можливість без похибок визначати кількість лейкоцитів навіть у тварин з без'ядерними еритроцитами.

Наявність ядер в еритроцитах птиці ускладнює проведення повноцінних досліджень крові. Якщо визначення гемоглобіну за методом Драбкіна та підрахунок кількості еритроцитів у камері Горяєва труднощів не викликає, то мікроскопічне дослідження лейкоцитів занадто втомлює зір дослідника і робить неможливим з достатньою точністю підрахувати їх кількість більш, ніж у двох камерах Горяєва послідовно, не роблячи перерви. Теж саме стосується і визначення лейкоцитарної формули по зафарбованим мазкам крові. В першому випадку труднощі обумовлені слабкою контрастністю лейкоцитів та їх малими розмірами у порівнянні з ядерними еритроцитами, так як оцтова кислота не руйнує їх ядер і вони зберігають свою велику контрастність. У другому випадку - ступінь зафарбованості еритроцитів та їх ядер фарбою Романовського-Гімза набагато вищий, ніж лейкоцитів, а значно більші розміри клітин червоної крові також значно ускладнюють, як пошук, так і диференціацію лейкоцитів. Зайво доводити, що застосування загально прийнятих методів дослідження лейкоцитів у птиці викликає проблеми з використанням часу коли треба опрацювати 5-10 і більше проб крові, збереженість якої у холодильнику досить обмежена, тим більш, коли проводяться не тільки морфологічні, але і більш складні біохімічні дослідження сироватки крові.

45 Цим і був обумовлений пошук шляхів, завдяки яким при збереженні точності досліджень можна знизити їх трудомісткість і скоротити час на проведення морфологічних досліджень крові страусів. Для підрахунку лейкоцитів в крові страусенят після відбору проб крові та стабілізації гепарином в суху пробірку було внесено 4 мл реактиву - трансформуючого розчину та за допомогою піпетки набрано 0,02 мл крові. При цьому піпетку необхідно витирати фільтрувальним папером. Вміст пробірки був перемішаний та залишений стояти до моменту проведення підрахунків. Перед початком проведення підрахунків та підготовці мікроскопа, лічильну камеру Горяєва та покривне скло протирали до появи райдужної смуги. Заповнювали лічильну камеру розведеною кров'ю (попередньо ретельно струшували вміст пробірки). Камеру Горяєва разом із кров'ю поміщали під мікроскоп під мале збільшення. Підрахунок проводили у 5 великих квадратах, розділених на 16 малих квадратів. Отриманні результати фіксували у робочому журналі та обробляли статистично ($M \pm m$, $n = 50$).

55 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб підрахунку лейкоцитів в крові страусенят, що включає в себе відбір крові, її стабілізацію гепарином, розбавлення крові в меланжері трансформуючим розчином та проведення підрахунку лейкоцитів в лічильній камері Горяєва під мікроскопом.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для підрахунку кількості лейкоцитів в меланжері застосовують трансформуючий розчин із набору реактивів для визначення іншого показника - гемоглобіну по методу Драбкіна.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601