



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 45600

(13) A

(51) 6 G01N33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ Т- ТА В-ЛІМФОЦИТІВ У КРОВІ ТВАРИН

1

2

(21) 2001042174

(22) 03 04 2001

(24) 15 04 2002

(46) 15 04 2002, Бюл. № 4, 2002 р.

(72) Шеховцов В'ячеслав Степанович, Біла Інна
Дмитрівна, Хлівна Галина Олександрівна, При-
ходько Юрій Олександрович(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб визначення кількості Т- та В-лімфоцитів у крові тварин, що включає забір крові, гепаринізацію, виділення лейкоцитів, інкубацію в присутності індикаторних часток та підрахунок розеткоутворюючих клітин, який відрізняється тим, що для забору крові достатньо об'єму менше 10 мл, а для виділення лейкоцитів застосовують метод відстоювання

Винахід відноситься до ветеринарії, а саме до імунології та може використовуватися при визначенні імунного статусу тварин

Задачею винаходу є скорочення та спрощення способу визначення кількості Т- та В-лімфоцитів у крові тварин

Існують "Методичні рекомендації по кількісному визначенню та функціональній оцінці Т- та В-лімфоцитів у периферичній крові великої рогатої худоби (О.М. Цимбал, К.Є. Конаржевський та інш., ред. О.М. Цимбал - Х, 1983 - 18с.) Є способи визначення кількості Т- та В-лімфоцитів в крові тварин (Лебедев К.А., Понякина И.Д. и др. Лабораторное дело - 1987, №7, с. 532-536 та Новиков Д.К., Новикова Д.И. Клеточные методы иммунодиагностики Минск Беларусь, 1979, 222с.)

Ці способи можуть бути прототипом. Згідно цих способів визначення кількості Т та В-лімфоцитів у крові тварин включає забір крові, об'ємом не менш 10 см³, гепаринізацію, виділення лейкоцитів, інкубацію в присутності індикаторних часток та підрахунок розеткоутворюючих клітин. Для виділення лейкоцитів застосовують спосіб використання градієнту щільності (фікопл-верографін)

В основу винаходу, що передбачається, поставлено завдання знайти спосіб визначення кількості Т- та В-лімфоцитів в крові тварин при якому з'явиться можливість зменшення об'єму крові для визначення кількості Т- та В-лімфоцитів та зменшиться кількість реактивів, що дуже важливо для скорочення та спрощення способу

Задача вирішується шляхом визначення кількості Т- та В-лімфоцитів у крові тварин, що вклю-

чає забір крові, гепаринізацію, виділення лейкоцитів, інкубацію в присутності індикаторних часток та підрахунок розеткоутворюючих клітин, при цьому для забору крові достатньо об'єму менше 10 мл, а для виділення лейкоцитів застосовують метод відстоювання замість використання градієнту щільності (фікопл-верографін)

Використання гепаринізованої крові, інкубація в присутності індикаторних часток, та підрахунок розеткоутворюючих клітин у прототипі є спільними ознаками зі способом, що заявляється

Для здійснення запропонованого способу відбирають 1,5-2 мл крові, яку стабілізують антикоагулянтном. Кров відстоюють протягом години або центрифугують при 1,5 тис. об/хвилину 10-15 хвилин - для розшарування. Пастеровською піпеткою відсмоктують середній шар (лейкоцити) в пробірку і додають 0,5 мл дистильованої води і 0,2 мл середовища 199. Отриману суміш ресуспензують і центрифугують 5 хвил при 1000 об/хвил. Осад відмивають 2 рази фізіологічним розчином

В окрему пробірку вносять 3 краплі отриманої суспензії лейкоцитів, додають 3 краплі завісу відмитих еритроцитів барана. Суміш інкубують в термостаті 5 хвилин при 37°C, потім центрифугують 5 хвил при 1000 об/хвил, охолоджують в холодильнику, де витримують при +4°C 40 хвилин (при необхідності час можна збільшити до 24 годин)

Після цього в пробірку додають 1 краплю 0,6% розчину глутарового альдегіду, витримують 10 хвилин при кімнатній температурі, а потім відмивають фізіологічним розчином. До осаду додають 0,2 мл середовища 199, ресуспензують і роблять

(13) A

(11) 45600

(19) UA

мазок. Мазок висушують, фіксують і фарбують по Романовському-Гімза 10 хвилин.

Проводять підрахунок кількості розеткоутворюючих лімфоцитів на 100 клітин. З урахуванням лейкоформули і відсоткового вмісту лімфоцитів встановлюють відсоток Е-РУК в 1 мкл крові.

Для визначення кількості В-лімфоцитів аналогічно отримують суспензію лейкоцитів. До 3 крапель суспензії лейкоцитів додають з краплі завісі відмитих еритроцитів білих мишей. Далі техніка методу узгоджується з вищеописаною методикою підрахунку Т-лімфоцитів.

Приклад 1

У свиноматок учгоспу "Коммунар" Сімферопольського району АРК відбирали проби крові в кількості 2 мл від кожної, стабілізували гепарином. Кров центрифугували для розшарування і відсмоктували пастерівською піпеткою середній шар (лейкомасу). Лейкоцити відмивали середовищем 199, додавали завісь еритроцитів барану, консервували

ли розчином глутарового альдегіду, робили мазки, фарбували їх по Романовському-Гімза і підраховували під мікроскопом кількість Е-РУК(Т-лімфоцитів).

Приклад 2

У 20 свиней відбирали проби крові по 2 мл, стабілізували гепарином. Отримували лейкомасу (як в прикладі 1). До відмитих лейкоцитів додавали завісь відмитих еритроцитів білої миші, консервували розчином глутарового альдегіду, робили мазки, фарбували їх по Романовському-Гімза і підраховували під мікроскопом кількість ЕА-РУК(В-лімфоцитів).

Спосіб визначення кількості Т- та В-лімфоцитів в крові тварин дає можливість зменшити затрати на придбання дорогих коштуючих, дефіцитних реактивів, є більш доступним для широкого кола фахівців ветеринарної медицини, знижує трудомісткість проведення досліджень.