



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114094** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)  
**G01N 33/531** (2006.01)  
**A61D 99/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2016 09763</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Желавський Микола Миколайович (UA),</b> <b>Шунін Ігор Микитович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>22.09.2016</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>27.02.2017</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Желавський Микола Миколайович,</b> вул. Драй-Хмари, 44, кв. 67, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., 32300 (UA), <b>Шунін Ігор Микитович,</b> вул. Відрадна, 1, буд. 7/1, м. Хмельницький, 31300 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>27.02.2017, Бюл.№ 4</b>	

**(54) СПОСІБ ЦИТОХІМІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПІОМЕТРИ**

**(57) Реферат:**

Спосіб цитохімічної діагностики піометри включає визначення протимікробної реактивності нейтрофільних гранулоцитів. При виготовленні цитологічних мікропрепаратів і приведенні цитохімічного дослідження реактивних фагоцитів використовують розчин нітросинього теразолію (НСТ) із подальшим фарбуванням індикаторним фарбником нейтральним червоним.

**UA 114094 U**



Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме до ветеринарного акушерства і клінічної імунології, та може використовуватись для імуноцитохімічної діагностики піометри собак і кішок.

У практиці лікарів ветеринарної медицини використовуються відомий спосіб діагностики піометри дрібних домашніх тварин за допомогою використання рентгенографічного, ультразвукового та ендоскопічного дослідження [1]. Цей спосіб дає можливість встановити клінічний діагноз, але при цьому достатній мірі саме підтверджується клінічна інформативність діагнозу в процесі розвитку всього симптомокомплексу захворювання матки, проте не завжди дають змогу лікарю діагностувати цю патологію на ранніх стадіях розвитку.

До недоліків вказаного способу слід віднести складну багатоетапну технологію їх виконання, а також наявність в лікарні дорогого лабораторного обладнання та реактивів. Окрім цього способу є певна односторонність і недостатня інформативність, що недостатньо для діагностики при визначенні повного алгоритму діагнозу, адже при цьому досліджуються тільки гормональні процеси в організмі та гістологічні зміни в матці хворих тварин без деталізованої інформації щодо функціонального стану клітин та медіаторів запальної реакції, а також реактивності імунокомпетентних клітин.

Аналогом до заявленого способу є відомий спосіб, який базується на діагностиці запального процесу в статевих органах з використанням цитологічного методу і достатньо ефективно дозволяє дослідити цитологію клітин [2].

Недоліком способу є те, що дослідник не в змозі визначити функціональний стан імунокомпетентних клітин та об'єктивно оцінити параметри локального імунного захисту органів розмноження.

Задача корисної моделі полягає в удосконаленні цитологічного способу діагностики піометри кішок і сук, за допомогою якого можна визначити інформативність параметрів клітинних факторів локального імунітету органів розмноження тварин, обґрунтувати діагностичні критерії патогенезу захворювання в контексті субклінічної і клінічної патології, прогнозувати перебіг, визначати адекватність та ефективність проведеної терапії.

Дослідженнями встановлено, що нейтрофільні гранулоцити відіграють важливу роль в імунному захисті організму тварин. Тому в основу створення корисної моделі стало розроблення способу, що дозволяє визначити стан клітинних факторів імунного захисту репродуктивної системи сук і кішок при розвитку у них септичного запалення матки (піометри).

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб цитохімічної діагностики піометри, що включає визначення протимікробної реактивності нейтрофільних гранулоцитів, який відрізняється тим, що при виготовленні цитологічних мікропрепаратів і приведенні цитохімічного дослідження реактивних фагоцитів використовують 0,15 % розчин нітросинього тетразолію (НСТ) із подальшим фарбуванням індикаторним фарбником нейтральним червоним.

Згідно з корисною моделлю, оцінювання та клінічна інтерпретація лабораторних результатів здійснюється із визначенням індексу міграційної активності нейтрофілів, індексу активації нейтрофілів, цитологічного індексу, показника розгортання запальної реакції.

Цитологічне дослідження мікропрепарату проводиться із застосуванням цитохімічної реакції з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) та визначення діагностичних функціональних критеріїв оцінювання праймованих нейтрофільних гранулоцитів при оцінюванні їх цитохімічної реактивності.

Індикація метаболічної реактивності фагоцитів (нейтрофілів) дозволяє редукувати (відновлювати) фарбник тетразолієвого ряду нітросинього тетразолію, який після метаболічної реакції мікроскопічно візуалізується в цитоплазмі реактивних мікрофагів у вигляді гранул диформазану.

Цитологічна ідентифікація реактивних (праймованих НСТ+) нейтрофільних гранулоцитів є основним індикатором при оцінюванні клітинних механізмів локального імунітету органів розмноження тварин та удосконаленні способу фарбування мікропрепарату і розробленні інформативних діагностичних критеріїв оцінювання цитохімічної реакції фагоцитів [3].

Спосіб здійснюється за наступною схемою: діагностичний матеріал отримують з слизової піхви, відібраною за допомогою щітки для цитології, попередньо змоченою 15 М фосфатним буфером ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ; рН 7,2). Пробу поміщають на край предметного скла. До клітинної суміші додають 0,05 мл 0,15 % розчину нітросинього тетразолію (виробництво фірми "Renal®", Великобританія; на фосфатному буфері (рН 7,2)).

Надалі мікропрепарати впродовж 30 хв інкубують у вологій камері термостата ( $t$  37 °С). Після інкубації готують мазки, які фіксують метанолом та надалі фарбують 0,1 % забуференим фосфатним індикаторним розчином нейтрального червоного (рН 7,2).

Оцінювання та облік метаболічної реакції фагоцитів (визначення відсотку реактивних нейтрофілів) проводять мікроскопічним методом (збільшення \* 200 разів). Реактивні (НСТ-позитивні) нейтрофільні гранулоцити візуалізуються наявністю у цитоплазмі темно-коричневих включень у вигляді дрібної дифузної зернистості.

5 Інтенсивність цитохімічної реакції враховують за такими показниками, як: індекс міграційної активності нейтрофілів (ІМАН), індекс активації нейтрофілів (ІАН), цитологічний індекс (ЦЛІ), ризик прояву клінічної патології (РПКП).

Індекс міграційної активності нейтрофілів (ІМАН) визначають за формулою (1):

$$10 \quad \text{ІМАН} = \text{Нф}_{\text{СЛ}} / \text{Нф}_{\text{ПК}}, \quad (1)$$

де  $\text{Нф}_{\text{СЛ}}$  - кількість (%) нейтрофільних гранулоцитів у мікропрепараті з слизової оболонки;  
 $\text{Нф}_{\text{ПК}}$  - кількість (%) нейтрофільних гранулоцитів периферичного кров'яного русла.

Індекс активації нейтрофілів (ІАН) визначають шляхом відношення активованих клітин виявлених у мікропрепараті, що проявили цитохімічну реактивність в НСТ-тесті до загальної мікрофагів (2):

$$15 \quad \text{ІАН} = \text{Нф}_{\text{НСТ+}} / \text{Нф}_{\text{ЗАГ}}, \quad (2)$$

де  $\text{Нф}_{\text{НСТ+}}$  - кількість (%) нейтрофільних гранулоцитів, що проявили цитохімічну реактивність в НСТ-тесті;

20  $\text{Нф}_{\text{ЗАГ}}$  - загальна кількість (%) нейтрофільних гранулоцитів. Цитологічний індекс (ЦЛІ) визначають шляхом відношення суми формазанпозитивних нейтрофільних гранулоцитів кожного ступеня цитохімічної реактивності до загальної кількості підрахованих поліморфоядерних лейкоцитів (3):

$$25 \quad \text{ЦЛІ} = ((\text{I Нф}_{\text{НСТ+}} * 1) + (\text{II ст Нф}_{\text{НСТ+}} * 2) + (\text{III ст Нф}_{\text{НСТ+}} * 3) + (\text{IV ст Нф}_{\text{НСТ+}} * 4)) / \text{Нф}_{\text{НСТ+}}, \quad (3)$$

де  $\text{Нф}_{\text{НСТ+}}$  - кількість (%) нейтрофільних гранулоцитів, що проявили цитохімічну реактивність в НСТ-тесті (I, II, III та IV ступінь реактивності);

$\text{Нф}_{\text{ЗАГ}}$  - загальна кількість (%) нейтрофільних гранулоцитів.

30 Для визначення ризику прояву клінічної стадії піометри визначають показник розгортання запальної реакції (ПРЗР) (4), який виражає відношення кількості нейтрофільних клітин в мікропрепараті із слизової оболонки органів розмноження, що проявили реактивність в НСТ-тесті до загальної кількості нейтрофільних гранулоцитів (НСТ+) периферичного кров'яного русла:

$$35 \quad \text{ПРЗР} = \text{Нф}_{\text{СЛНСТ+}} / \text{Нф}_{\text{ПК НСТ+}}, \quad (4)$$

де  $\text{Нф}_{\text{СЛНСТ+}}$  - кількість (%) нейтрофільних гранулоцитів, що проявили цитохімічну реактивність в НСТ-тесті;

$\text{Нф}_{\text{ПК НСТ+}}$  - загальна кількість НСТ+ (%) нейтрофільних гранулоцитів у периферичному кров'яному руслі.

40 Джерела інформації:

1. Руководство по репродукции и неонатологии собак и кошек / Симеон Дж., Иглант Г., Харви М. / под ред. Дж. Симеона; пер. с англ. Е.И. Смелова, Ж.В. Вараксина, М.Д. Гвоздикова, И.Я. Корсакова. - М.: Софион, 2005. - 280 с.

45 2. Turner M. L. Immunity and inflammation in uterus / M. L. Turner, G. D. Haley, I. M. Sheldon // Reprod. Dom Anim. - 2012. - Suppl. 4. - P. 402-409.

3. Яблонський В.Л. Апоптоз та його значення в регуляції імунного гомеостазу організму тварин (огляд літератури та власних досліджень) / В.А. Яблонський, М.М. Желавський // Наук. вісник вет. мед.: зб. наук. праць Білоцерківського національного аграрного університету. - 2014. - Вип. 13 (108). - С. 9-13.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

55 1. Спосіб цитохімічної діагностики піометри, що включає визначення протимікробної реактивності нейтрофільних гранулоцитів, який **відрізняється** тим, що при виготовленні цитологічних мікропрепаратів і приведенні цитохімічного дослідження реактивних фагоцитів

використовують 0,15 % розчин нітросинього теразолію (НСТ) із подальшим фарбуванням індикаторним фарбником нейтральним червоним.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що оцінювання та клінічна інтерпретація лабораторних результатів здійснюється із визначенням індексу міграційної активності нейтрофілів, індексу активації нейтрофілів, цитологічного індексу, показника розгортання запальної реакції.
- 5

---

Комп'ютерна верстка М. Мацело

---

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

---

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