



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15429 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 8/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКИ КРОВОПАРАЗИТАРНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ОВЕЦЬ З ВИКОРИСТАННЯМ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОЇ МІКРОСКОПІЇ

1

2

(21) a200507429

(22) 25.07.2005

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Оніщенко Наталія Григорівна, Волколупова Валентина Аркадіївна, Пасунькіна Марія Олександрівна, Пінчук Віктор Андрійович

(73) Кримська дослідна станція Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини

(57) Спосіб експрес-діагностики кровопаразитарних захворювань овець з використанням люмінесцентної мікроскопії, яка полягає в тому, що мазки крові від овець, щодо яких є підозра на наявність у них змішаної форми кровопаразитарної інвазії, фарбують розчином акридинового помаранчевого 1:10000 протягом 5 хвилин, досліджують за допомогою люмінесцентного мікроскопа та диференціюють паразитів за кольором світіння.

Корисна модель відноситься до ветеринарної протозоології та паразитології і може бути використаний для диференційної діагностики кровопаразитарних захворювань викликаних *Babesia ovis* та *Anaplasma ovis*, а також при змішаному перебігу згаданих інвазій.

В гуманітарній медицині для діагностики малярії використовуються, як загальноприйняті, так і альтернативні методи. Одним з таких є флуоресцентна мікроскопія центрифугата крові [QBC - Quantified Buffy Coat]. Методика базується на тому, що щільність еритроцитів вражених малярійними плазмодіями менша, ніж у нормальних. Після відбору, кров переміщують у скляний капіляр, який перед цим обробляють флуоресцентним барвником (акридиновим помаранчевим) та антикоагулянтном. Після центрифугування заражені еритроцити концентруються в верхній частині шару еритроцитів безпосередньо під лейкоцитарною плівкою. Акридиновий помаранчевий фарбує ядра паразитів, які під люмінесцентним мікроскопом світяться яскраво-зеленим світлом на фоні червоної цитоплазми. [1, 2, 3].

Основним методом діагностики кровопаразитарних захворювань в ветеринарній медицині є мікроскопічне дослідження препаратів крові, фарбованих за Романовським-Гимза. Цей метод дає можливість встановити наявність паразитів у зразку крові, визначити рівень паразитемії. Достовірно встановити видову приналежність кровопаразита досить складно. Необхідно враховувати наявність різного роду включень, артефактів, що ускладню-

ють постановку діагнозу (тілець Жолі, базофільної зернистості еритроцитів). Тому існує необхідність розробки альтернативного методу з більшим відсотком об'єктивності.

Особливу складність у встановленні діагнозу на анаплазмоз шляхом мікроскопічного дослідження мазків в період паразитозу вчені De Robertis та Epstein пояснюють наявністю у цей момент в крові тварини субмікроскопічних форм паразита при низькій кількості „краєвих тілець” [4].

Застосування люмінесцентної мікроскопії дозволяє облегшити діагностику кровопаразитарних захворювань.

Вперше для діагностики кровопаразитарних захворювань тварин явище люмінесценції застосував Ristic з співавторами [5]. Вчені використали специфічні антитіла оброблені флуоресцентним барвником для визначення *Anaplasma marginale* у крові хворих тварин. [6, 7, 8]

В нашій розробці люмінесцентна мікроскопія використовується як альтернативна звичайній, світловій. Вторинна люмінесценція передбачає флюорохромування препаратів, внаслідок чого паразити самі стають джерелом світіння та контрастно виділяються на темному фоні препарату. Контрастність та кольоровість зображення дозволяє збільшити достовірність досліджень та полегшити роботу дослідника. В якості барвника нами був використаний акридиновий помаранчевий.

Мазки крові готували за загально прийнятою методикою від хворих ягнят та носіїв анаплазмозно-бабезіозної інвазії.

(19) UA (11) 15429 (13) U

Отримані препарати крові фіксували за допомогою метилового спирту 3-5 хвилин після висушування на повітрі. Для фарбування використовували маточний розчин акридинового помаранчевого 1:100, з якого безпосередньо перед фарбуванням готували розчин в розведенні 1:10000. Для виготовлення розчинів використовували 0,1н НСІ. Фарбування фіксованих мазків проводили впродовж 5-10 хвилин. В якості контролю слугували мазки від здорових тварин. Огляд препаратів проводили на люмінесцентному мікроскопі «Люмам ІЗ» с ртутною лампою ДРШ 250-3 під іммерсійною системою.

В результаті проведених спостережень встановлено, що *Anaplasma ovis* в препаратах крові хворих тварин після фарбування акридиновим помаранчевим світяться яскравим золотисто-зеленим світлом, паразити крупніші, ніж в препаратах фарбованих за Романовським-Гимза (Фіг.1).

У *Babesia ovis* при фарбуванні впродовж 10-30сек. ядро приймало зеленуватий колір, а протоплазма світилась помаранчевим світлом. Найбільша інтенсивність світіння паразитів спостерігалась при експозиції 5-10 хвилин при цьому паразит рівномірно світився яскравим золотисто-помаранчевим кольором. Лейкоцити мали яскраве помаранчеве забарвлення, але відрізнялись значними розмірами. Одержаний ефект пояснюється утворенням комплексів акридинового помаранчевого з нуклеїновими кислотами.

Так, на Фіг.2 наведено зображення мазків крові від вівці хворої на змішану форму анаплазмозно-бабезіозної інвазії через п'ять годин після введення азидину у лікувальній дозі. Відрізнити анаплазм від бабезій на Фіг.2 (фарбування за Романовським-Гимза) неможливо, в той час при фарбуванні акридиновим помаранчевим - Фіг.3 маємо можливість констатувати наявність змішаної інвазії.

Зелена люмінесценція характерна для комплексів акридинового помаранчевого з дволанцюговими ділянками нуклеїнової кислоти, якою у більшості випадків є ДНК, та розташована, як правило в ядрі паразита. [9] Червоне світло мають комплекси акридинового помаранчевого з одноланцюговими ділянками нуклеїнової кислоти, зазвичай РНК, найбільша кількість якої спостерігається у протоплазмі паразитів.

Завдяки відсутності нуклеїнових кислот у зрілих еритроцитах, вони в препаратах залишалися темними та були помітні тільки їх контури. Лейкоцити можуть слугувати контролем якості фарбування, тому що вони мають у своєму складі ДНК та РНК [10].

Паразити продовжували інтенсивно світитися при зберіганні мазків в темному місті впродовж місяця. При подальшому зберіганні люмінесценція паразитів значно слабшала. Яскравість с'ява при фарбуванні фіксованих мазків, що зберігалися тривалий час, не відрізнялась від свіже виготовлених.

Використання методу люмінесцентної мікроскопії для діагностики кровопаразитарних захворювань має наступні переваги:

- Економія часу для виготовлення препаратів.
- Паразити самі стають джерелом світіння на темному фоні препарату, що дозволяє швидко визначати навіть незначну кількість паразитів.
- Диференціація паразитів по кольору дозволяє встановити наявність змішаної форми інвазії.
- Значна достовірність отриманих результатів.

Перелік використаних джерел

1. Микроскопическая диагностика малярии: ВОЗ, Европейское региональное бюро. - Копенгаген, 2000. - 88с.

2. Попов А.Ф., Попова Н.И. Экспресс-методы диагностики тропической малярии //Мед. Паразитол. - 2000. - №2. - С.38-39.

3. Локтева И.М. Лабораторная диагностика малярии. // Лабораторная диагностика. - 2003. - №2. - С.58-67.

4. De Robertis E., Epstein B. Electron microscope. Study of anaplasmosis in bovine red blood cell. Proceed, of the Soc. For Exp. Biol. and Med., vol.77, №2, 1951.

5. Ristic M. Anaplasmosis. // Adv. Vet. Sci, 6 (1961), pp.111-192.

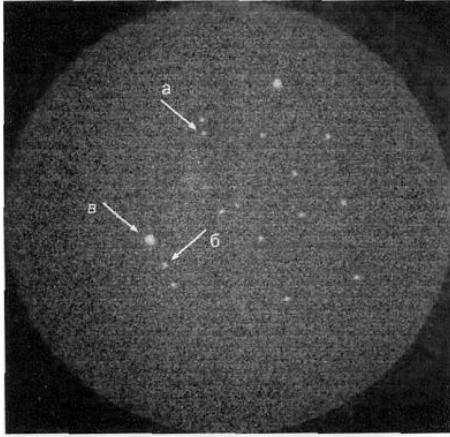
6. Ristic M. and Pritchard W.R. Morphological and serological characteristics of *Anaplasma marginale* as observed by electron microscopy and fluoresce in labeled antibody techniques. // XVIth Intern. Vet. Congr. Madrid, 1959, v.11, pp.555-556.

7. Ristic M., White F.H. and Sander D.A. Detection of *Anaplasma marginale* by means of fluorescent - labeled antibody.// Amer. J. Vet. Res., 1957, 18, 924-928.

8. Kreier J.P. and Ristic M. Morphologic, antigenic and pathogenic characteristics of *Eperythrozoon ovis* and *Eperythrozoon Wenyonii*.// Am. J. vet. res. Vol 24. 1963.

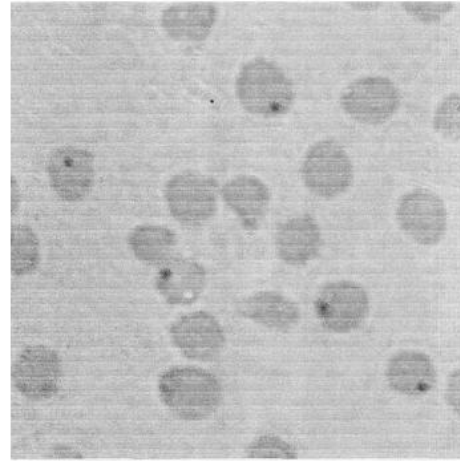
9. Полякова О.А. Применение метода люминесцентного анализа в ветеринарной микробиологии. // Бюллетень Всесоюзного института экспериментальной ветеринарии. Выпуск 7, Москва 1970, с.72-81.

10. Гришаева Т.И. Методы люминесцентного анализа. Учебное пособие для вузов. СПб.: АНО НПО «Профессионал», 2003. - 226с.



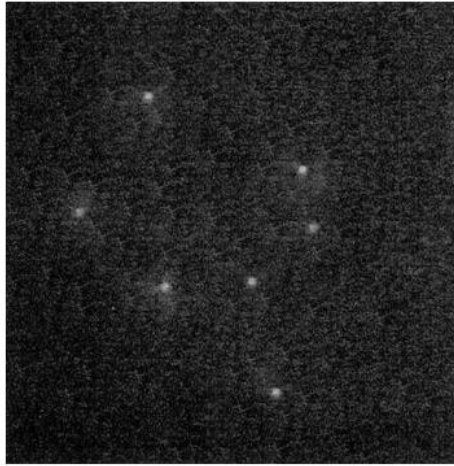
Кровопаразити овець при люмінесцентній мікроскопії
(а - *A. ovis*; б - *B. ovis*, в - лейкоцит).

Фіг. 1



Кровопаразити при змішаному перебігу
анаплазмозно-бабезіозної інвазії фарбування за
Романовським-Гимза

Фіг. 2



Кровопаразити при змішаному перебігу
анаплазмозно-бабезіозної інвазії фарбування
акридиновим помаранчевим

Фіг. 3