



УКРАЇНА

(19) UA (11) 36031 (13) A

(51) B G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ КОНЕЙ З НАЯВНІСТЮ ПАТОМОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН ПРИ ІНФЕКЦІЙНІЙ АНЕМІЇ

(21) 99105818

(22) 26.10.1999

(24) 16.04.2001

(33) UA

(46) 16.04.2001, Бюл. № 3, 2001 р.

(72) Галатюк Олександр Євстафійович, Горальський Леонід Петрович

(73) Інститут епізоотології УААН

(57) Спосіб діагностики коней з наявністю патоморфологічних змін при інфекційній анемії, який включає виявлення в сироватці крові рівня титрів специфічних антитіл в реакції дифузної преципітації (РДП) і співвідношення альбумінів до гамаглобулінів, **відрізняється** тим, що виявляють високі титри (1:64) і низьке співвідношення альбумінів до гамаглобулінів (0,31 і 0,12 умов. од.).

Винахід відноситься до ветеринарної медицини, а саме, - до способів лабораторної діагностики інфекційних захворювань і може бути використаний для прижиттєвої діагностики з метою виявлення коней з підвищеним ризиком розвитку патологічного процесу на ранніх стадіях (латентна, хронічна форма) інфекційної анемії.

На сьогодні у ветеринарній медицині серед інфекційних захворювань ретровірусного походження інфекційна анемія коней (ІАК) є досить поширеним захворюванням. В Україні ІАК зустрічається переважно у колективних господарствах Поліської і Лісостепової зон. В даний час захворювання протікає приховано і клінічно майже не проявляється. Такі тварини є прихованим джерелом збудника інфекції і сприяють зараженню інших. Однак діагностувати інфекційну анемію коней можливо лише після забою тварин з наступним проведенням гістологічних досліджень.

Відомий спосіб діагностики ІАК методом гістологічних досліджень (фарбування гістопрепаратів гематоксиліном та еозином) заключається у виявленні змін в органах і тканинах, властивих інфекційній анемії, та виявлення специфічного для ІАК залізомісткого пігменту - гемосидерину в клітинах печінки (постановка реакції по Перлсу) (Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. - М.: Мир, 1969. - 645 с., Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Изд. мед. литературы. - Л.: 1961. - 339 с., Ромейс Б. Микроскопическая техника. - М.: Иностран. литерат., 1953. - 436 с.).

Недостатком способу є його неможливість виявити коней з прихованим перебігом хвороби при житті тварин та його трудомісткість.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу діагностики інфекційної анемії, в

якому коней з наявністю патологічних змін в організмі можна швидко виявити серед серопозитивних тварин, не проводячи діагностичного забою всього поголів'я за допомогою специфічного лабораторного методу, постановкою реакції дифузної преципітації, основаної на виявленні титрів антитіл до вірусу інфекційної анемії коней в сироватці крові, враховуючи співвідношення альбумінів до гамаглобулінів.

Поставлена задача вирішується тим, що замість проведення гематологічних (визначення кількості еритроцитів, лейкоцитів, виведення лейкоформули), гістологічних (виявлення лімфоїдної проліферації в органах і тканинах та порушення їх характерної будови) досліджень та постановки реакції по Перлсу (виявлення залізомісткого пігменту - гемосидерину в гепатоцитах печінки, а також в купферовських клітинах), запропонований нами спосіб дає можливість виявляти в сироватці крові хворих тварин високі титри (1:64) специфічних антитіл в реакції дифузної преципітації (РДП) і низьке співвідношення альбумінів до гамаглобулінів (0,31±0,12 умов.од.). І лише для підтвердження діагнозу таких тварин піддають діагностичному забою і проводять гістологічні дослідження.

Перевагою способу діагностики коней з наявністю патоморфологічних змін при інфекційній анемії є можливість його застосування для швидкого, прижиттєвого виявлення коней з підвищеним ризиком розвитку патологічного процесу при латентній і хронічній формах ІАК.

Спосіб здійснюється наступним чином: із крові досліджуваних тварин отримують сироватки в кількості 5-6 мл. Їх консервують мертиолоютом 1:10000 або шляхом додавання антибіотиків - пеніциліну і стрептоміцину по 100 од/мл і зберігають при температурі 4-8 °С. Сироватки без консерван-

(19) UA (11) 36031 (13) A

ту зберігають в замороженому стані. Для приготування агарового гелю використовують агар "Дифко" і боратний буфер (рН-8,6).

В чашку Петрі вносять гарячий 2%-ний агар і дають йому загуснути. Потім вносять 15 мл (охлажденного до 60 °С) 1%-ного агару (1%-ний та 2%-ний агар приготують шляхом кип'ятіння або автоклавування без тиску протягом 5 хвилин). Після затвердіння середовища вирізають лунки діаметром 7 мм (вирізають лунки тільки в шарі 1%-ного агару). Одна лунка повинна міститися в центрі і шість - по периферії на відстані 3 мм від центральної і одна від одної.

В центральну лунку вносять мікропіпеткою 0,05-0,06 мл антигену. В дві протилежні лунки за капують 0,05-0,06 мл позитивної сироватки. Чотири вільні лунки, що залишилися, заповнюють за допомогою тонкої пастерівської піпетки досліджуваними сироватками, в розведенні 1:2 - 1:64. Після заповнення лунок чашки Петрі закривають кришками і поміщають у вологу камеру при температурі 24-25°С. Реакцію читають через 48-72 години. Чашки продивляються на темному фоні в косонаправленому пучку світла.

Результати реакції вираховують по контрольній лінії преципітації. Контрольні лінії преципітації повинні бути чіткими і міститися посередині між лунками з антигеном і контрольними позитивними сироватками. Від'ємною реакція вважається лише тоді, коли контрольні лінії преципітації продовжуються в сторону лунки з досліджуваною сироваткою, не загинаючись, або з невеличкими загинаннями в сторону контрольної позитивної сироватки.

Позитивною реакція вважається тоді, коли:

- між лунками в досліджуваній сироватці утворюється лінія преципітації, яка з'єднується з контрольною лінією;

- лінія преципітації відсутня, але контрольні лінії поблизу з досліджуваною сироваткою утворюють загинання, направлене в сторону антигену - слабопозитивна сироватка;

- контрольні лінії скорочуються із сторони лунки з досліджуваною сироваткою, в окремих випадках контрольні лінії повністю розчиняються, що свідчить про високий титр антитіл.

Визначення співвідношення альбумінів до гама-глобулінів визначається за турбидиметричним (нефелометричним) методом (Определение естественной резистентности и обмена веществ у сельскохозяйственных животных / В.Е.Чумаченко., А.М.Высоцкий, Н.А.Сердюк. В.В.Чумаченко. - К.: Урожай, 1990. - С. 69-70.

Серологічне, гематологічне і при проведенні морфологічних досліджень було досліджено 8 клінічно-здорових коней та 25 при латентному і хронічному перебігу ІА (таблиця). При аналізі морфофункціональних показників і результатів серологічної діагностики встановлено закономірність прихованого перебігу хвороби. Встановлено, що у коней з рівнями титрів специфічних антитіл у РДП (нативна 1:2) у сироватці крові гістологічних змін в органах і тканинах не виявлено. Незначні гістологічні зміни виникають лише при наявності титрів специфічних антитіл у РДП 1:8 - 1:16, а при зростанні рівня антитіл до 1:32 - 1:64 спостерігаються чітко виражені гістологічні та проявляються патологоанатомічні і гематологічні зміни, характерні для ІАК.

Таким чином, для виявлення коней з підвищеним ризиком розвитку патологічного процесу при ІАК необхідно виявляти рівень титрів специфічних антитіл в сироватці крові та визначати співвідношення альбумінів до гамаглобулінів, що має певне діагностичне значення. Для підтвердження діагнозу у забитих з діагностичною ціллю тварин необхідно проводити гістологічні дослідження та постановку реакції по Перлсу на виявлення в клітинах печінки специфічного для ІАК пігменту - гемосидерину.

Отже, даний спосіб може бути використаний для прижиттєвої діагностики патологічного процесу в організмі коней при латентному і хронічному перебігу хвороби.

Таблиця

Результати виявлення коней з патоморфологічними змінами в організмі при інфекційній анемії

Групи тварин	Кількість	Титр в РДП	Співвідношення альбумінів до гамаглобулінів	Наявність пат.змін в організмі	Реакція по Перлсу
здорові	8	0	1,31 ± 0,4	-	-
хворі	15	натив – 1:2	1,16 ± 0,42	-	-
хворі	7	1:8 – 1:16	0,68 ± 0,15	незначні	+ -
хворі	3	1:32 – 1:64	0,31 ± 0,12	виражені	+

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
