



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 9427

(13) U

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРИЖИТТЄВОЇ ДІАГНОСТИКИ СИНДРОМУ ДИСЕМІНОВАНОГО ВНУТРІШНЬОСУДИННОГО ЗГОРТАННЯ КРОВІ У СОБАК

1

2

(21) u200503510

(22) 14.04.2005

(24) 15.09.2005

(46) 15.09.2005, Бюл. № 9, 2005 р.

(72) Сорока Наталія Михайлівна, Дубова Оксана
Анатоліївна

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб прижиттєвої діагностики синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ) крові у собак, що включає дослідження стабілізованої крові, її плазми та сироватки, який відрізняється тим, що у камері Горяєва в стабілізованій крові собак підраховують кількість тромбоцитів, визначають їх агрегаційну здатність, при кількості тромбоцитів понад 200Г/л і збільшен-

ня їх агрегаційної здатності понад 18% роблять висновок про розвиток тромбоцитопатії, утворення агрегатів клітин та тромбоцитопенії споживання, після цього у плазмі крові визначають протромбінований, тромбіновий і активований частковий тромбoplastиновий час плазми, при відхиленні більше ніж на 10% від контрольних показників пул-плазми встановлюють наявність коагулопатії споживання (складова частина синдрому), далі визначають концентрацію розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) та продуктів деградації фібриногена/фібрину (ПДФ) у плазмі та сироватці крові, і при збільшенні їх рівня понад 1,0бал для РФМК та 0,09г/л для ПДФ встановлюють наявність синдрому ДВЗ.

Корисна модель відноситься до ветеринарної медицини, зокрема, до ветеринарної паразитології.

Для діагностики використовуються методи визначення кількості тромбоцитів у крові [Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др. - Томск. - 1980. - 306с.], їх агрегаційної здатності, дослідження рівню розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК), продуктів деградації фібриногена/фібрину, а також визначення коагуляційних параметрів: протромбінового часу, тромбінового часу, активованого часткового тромбoplastинового часу згортання плазми.

Способи діагностики синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові у ветеринарній медицині не розроблені.

Корисною моделлю ставиться завдання створення способу прижиттєвої діагностики синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові (ДВЗ), який виступає як основне ускладнення при бабезіозі тварин.

Поставлене корисною моделлю завдання досягається тим, що у способі прижиттєвої діагностики синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ) крові у собак, що включає дослідження стабілізованої крові, її плазми та сироватки, згідно корисній моделі у камері Горяєва в стабілізованій крові собак підраховують кількість

тромбоцитів, визначають їх агрегаційну здатність, при кількості тромбоцитів за 200Г/л і збільшення їх агрегаційної здатності понад 18% судять про розвиток тромбоцитопатії, утворення агрегатів клітин та тромбоцитопенії споживання, після цього у плазмі крові визначають протромбінований, тромбіновий і активований частковий тромбoplastиновий час плазми, по відхиленню більш ніж на 10% від контрольних показників пул-плазми встановлюють наявність коагулопатії споживання (складова частина синдрому) далі визначають концентрацію розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) та продуктів деградації фібриногена/фібрину (ПДФ) у плазмі та сироватці крові і по збільшенню їх рівня понад 1,0бал для РФМК та 0,09г/л для ПДФ остаточно встановлюють наявність синдрому ДВЗ.

Приклад.

Визначення кількості тромбоцитів проводиться шляхом їх підрахунку у камері Горяєва. Як розбавник використовується 1% розчин амонія оксалату. У пробірку наливають 3,98мл розбавника та 0,02мл стабілізованої свіжо відібраної крові, ретельно струшують протягом 3 хвилин, заправляють у камеру Горяєва і витримують в ній 20 хвилин до створення повного гемолізу еритроцитів. Підрахунок ведеться в 10 великих квадратах з використанням фазово-контрасної насадки до мікроскопу. Отримана кількість у 10 великих квадратах поділя-

(13) U

(11) 9427

(19) UA

ється на 2 та помножується на 10 тис. Результат виражається у одиницях СІ (Г/л). Норма для собак - 200-350Г/л. При синдромі дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові кількість тромбоцитів знижується.

Агрегаційну здатність тромбоцитів визначають шляхом струшування проби протягом 3 хвилин зі швидкістю 100 струшуваль за хвилину. Від відомого методу Тарасової відрізняється відсутністю додавання до проби формаліну. Підраховуючи кількість тромбоцитів до і після струшування, визначають агрегаційну здатність у відсотках. Норма для собак - 9-18%. При синдромі ДВЗ агрегаційна здатність тромбоцитів зростає.

Рівень розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) визначається шляхом взаємодії плазми з 50% етиловим спиртом (етаноловий тест). До 1мл безтромбоцитної плазми додають 0,03мл 50% етилового спирту. За виглядом утвореного осаду оцінюють реакцію у хрестах: випадіння осаду у вигляді дрібних пластівців - 1 хрест, збільшення розміру пластівців - 2 хреста, збільшення в'язкості плазми та утворення пластівців - 3 хреста, утворення желеподібного згустку - 4 хреста. Норма для собак - до 1 хреста. Збільшення рівня РФМК свідчить про тромбінемію - обов'язковий компонент синдрому ДВЗ.

Концентрація продуктів деградації фібриногена/фібрину (ПДФ) визначається колориметрично за рівнем тирозину, який встановлюють шляхом взаємодії відповідної обробленої плазми з реактивом Фоліна (метод Nappiga Guest). До плазми будь-якого об'єму додають 8 мл насиченого розчину сульфату амонію для осадження білків. Центрифугують при 3 тис. обертах за хвилину протягом 30 хвилин. Надосадову рідину зливають і поміщають у термостат на 30 хвилин при температурі 56°C. Проводять центрифугування при 15 тис. обертах за хвилину протягом 30 хвилин. Надосадову рідину зливають, а осад відмивають тричі фізіологічним розчином: до осаду додають 3мл фізіологічного розчину і центрифугують при 3 тис. обертах за хвилину протягом 15 хвилин. Після останнього промивання до осаду додають 1мл фізіологічного розчину та 3мл реактиву Фоліна. Дослідження проводять на фотоелектроколориметрі, використовуючи кювети товщиною оптичного шару 1см. Для контролю використовують розчин, що включає 1мл фізіологічного розчину та 3мл реактиву Фоліна. Визначення ПДФ проводять при використанні калібрувальної кривої різних концентрацій тирозину, використовуючи D(L)-і30Mer та фізіологічний розчин натрію хлориду. До 1 мл розчину певної концентрації додають 3 мл реактиву Фоліна. Для перерахунку використовують формулу: ПДФ, г/л - $E \cdot 2,5 \cdot 10 / A \cdot \Phi$, де E - екстинція, A - об'єм розчину після осадження, Φ - середня величина коефіцієнту переведу екстинції. Норма - до 0,09г/л.

Зростання показника є беззаперечним ствердженням наявності синдрому ДВЗ.

Визначення коагуляційних параметрів проводиться з метою оцінки всіх ланок процесу згортання крові.

Протромбіновий час визначається за тестом Квіка шляхом взаємодії плазми з тромбопластином. Даний тест характеризує згортання крові за зовнішнім механізмом. До 0,1мл 0,277% розчину кальцію хлориду додають 0,1мл 1-2% суспензії тромбопластину та 0,1мл безтромбоцитної плазми крові. В момент додавання плазми вмикають секундомір. Через кожну секунду пробірку перекиляють до утворення згустку. Час утворення згустку і виражає протромбіновий час плазми. За норму приймається показник, отриманий на пул-плазмі здорових тварин (100%). Скорочення часу згортання більш, ніж на 10%, свідчить про гіперкоагуляцію, подовження - про гіпокоагуляцію.

Тромбіновий час визначається шляхом взаємодії плазми крові з тромбіном і характеризує 3-ю ланку згортання крові - перетворення фібриногену у фібрин під впливом тромбіну. До 0,1мл безтромбоцитної плазми додають 0,1мл розчину тромбіна з активністю 100 ІО на 1мл. Вмикають секундомір. Час утворення згустку вважають тромбіновим часом плазми. За норматив приймається показник, отриманий на пул-плазмі здорових тварин (100%). Скорочення часу згортання більш, ніж на 10%, свідчить про гіперкоагуляцію у 3-й фазі згортання крові, подовження - про гіпокоагуляцію.

Активованій частковий тромбопластиновий час плазми визначається шляхом її взаємодії з кефаліном - аналогом еритроцитарного тромбопластину і характеризує процес згортання крові за внутрішнім механізмом. В пробірку наливають 0,1мл 1% суспензії каоліну та 0,1мл 1% суспензії кефаліну. Перемішують ретельно та додають 0,1мл безтромбоцитної плазми. Вмикають секундомір. Час утворення згустку вважають активованим частковим тромбопластиновим часом плазми. За норматив приймається показник, отриманий на пул-плазмі здорових тварин (100%). Скорочення часу - гіперкоагуляція у внутрішньому механізмі згортання крові, подовження часу - гіпокоагуляція.

Критеріями синдрому ДВЗ виступають: на стадії гіперкоагуляції - скорочення часу згортання в усіх 3-х тестах, на стадії коагулопатії споживання - різноспрямованість зрушень, на стадії гіпокоагуляції - подовження часу згортання плазми в усіх 3-х тестах.

Методи прижиттєвої діагностики синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові будуть використані у ветеринарній паразитології для діагностики процесу як ускладнення при різних паразитарних хворобах тварин. Дослідження необхідно проводити за умов температури в лабораторії не нижче 15°C. Кров відбирають у тварин у будь-який час, стабілізують 3,8% розчином натрію цитрату.