



УКРАЇНА

(19) UA (11) 46598 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 39/118

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ХЛАМІДІЙ НА ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИНАХ

1

2

(21) u200907827

(22) 24.07.2009

(24) 25.12.2009

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) БОРИСЕВИЧ БОРИС ВОЛОДИМИРОВИЧ,
СКРИПКА МАРИНА ВІКТОРІВНА, ЛІСОВА
ВІКТОРІЯ ВІКТОРІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
УКРАЇНИ

(57) Спосіб виділення хламідій на лабораторних тваринах, що включає зараження білих мишей або морських свинок, їх розтин і відбір шматочків внутрішніх органів, який **відрізняється** тим, що після відбору шматочків, на першому пасажі патматеріалу, проводять їх гістологічні дослідження та виділяють хламідії протягом 8-10 діб.

Корисна модель належить до ветеринарної медицини, а саме, до лабораторної діагностики хламідіозу тварин.

Загальноприйняті способи виділення хламідій передбачають використання курячих ембріонів 6-8-добового віку або лабораторних тварин [Бортничук В.А. Хламидиоз свиней (этиология, диагностика, эпизоотология и меры борьбы) //Монография. - Киев, 1992. - 44с; Кротов С.А. Кротова С.А., Юрьев С.Ю. Хламидиозы: эпидемиология, характеристика возбудителя, методы лабораторной диагностики, лечение //Методическое пособие. Кольцове, 1997. - 63с.].

Для виділення хламідій готують 10% суспензію патматеріалу на фізіологічному розчині з рН7,2-7,4. Для виключення бактеріального забруднення цю суспензію попередньо висіюють на живильні середовища (МПБ, МПА) і через добу при відсутності росту мікрофлори застосовують для зараження курячих ембріонів або лабораторних тварин [Верхиховський О.М. та ін. Настанова із лабораторної діагностики хламідійних інфекцій сільськогосподарських тварин. - Київ, 2006. – 44с.].

При зараженні курячих ембріонів результати вважаються позитивними у випадку виявлення та ідентифікації хламідій в мазках-відбитках з жовточних міхурів курячих ембріонах, загиблих на 4-12 день після зараження (мазки-відбитки фарбують за Стемпом або Романовським-Гімза). При відсутності загибелі ембріонів на 12 день їх розтинають і проводять наступний пасаж. При цьому для виділення хламідій необхідно провести мінімум 3 послідовних пасажі [Аранчій С.В., Донців

О.Г., Педора В.Г., Сагло О.С., Настечко В.Д. Методичні рекомендації з діагностики, заходів профілактики та ліквідації хламідіозу свиней. // - Полтава, 1995. - 7с.].

Для виділення хламідій на лабораторних тваринах, заражають білих мишей або 2-3 морських свинки. Тварини знаходяться під наглядом до 10 діб. При наявності у матеріалі патогенних хламідій тварини захворюють і через 7-10 днів після зараження гинуть. Результати дослідження вважають позитивними у випадку виявлення і ідентифікації хламідій в мазках-відбитках із паренхіматозних органів загиблих тварин (мазки-відбитки фарбують за Стемпом або Романовським-Гімза). При відсутності загибелі на 10 день після зараження тварин забивають і проводять наступний пасаж. При цьому для виділення хламідій, як і в випадку курячих ембріонів, необхідно провести мінімум 3 послідовних пасажі [Методичні рекомендації "Урогенітальні заразні патології: трихоманози, вібріози, хламідіози. Системи діагностичних та лікувально-профілактичних заходів". Кужільний Г.Я., Абрамов А.В. //Київ, 2006. - 49с.]. Цей спосіб обрано за прототип.

Недоліком виділення хламідій на лабораторних тваринах є те, що вони не завжди виділяються в перших трьох пасажах внаслідок недостатньої цитопатичної активності. При цьому виникає необхідність в проведенні сліпих пасажів [Ануфриев П.А., Толкачев И.С. Факторные болезни свиней. Этиология, эпизоотические особенности и диагностика наиболее

UA (19) 46598 (11) (13)

распространенных факторных инфекционных болезней органов размножения и молочной железы у свиней //Ветеринарный консультант - 2006. №17. - С.17-19; Бортничук В.А., Любецкий В.И., Павленко М.С. Роль хламидий в патологии відтворення тварин //Науковий вісник Національного аграрного університету, 2000. №22. – С.31-34].

Загибель білих мишей сягає максимального показника (до 80%) лише в сьомому пасажі хламидій [Обуховська О.В. Адаптація польових ізолятів хламидій до жовткових міхурів курячих ембріонів та внутрішніх органів білих мишей //Міжвідомчий тематичний науковий збірник - 82. - Харків, 2003. - С.433-437]. Таким чином, виділення хламидій на лабораторних тваринах може тривати 70 днів і потребує не менше 14 лабораторних тварин.

Корисною моделлю ставиться завдання розробити більш швидкий спосіб виділення хламидій на лабораторних тваринах.

Поставлене завдання досягається тим, що на першому пасажі патматеріалу на білих мишах чи морських свинках для ідентифікації хламидій використовують метод гістологічних досліджень. При цьому тривалість виділення хламидій скорочується з 70 до 8-10 днів, а кількість необхідних лабораторних тварин зменшується з 14 до 2 (мінімально необхідна кількість). Виключається необхідність попереднього бактеріологічного контролю 10% суспензії матеріалу для зараження шляхом її висівання на живильні середовища (МПБ, МПА), оскільки гістологічні дослідження (фарбування зрізів гематоксиліном та еозином) дають можливість віддиференціювати хламидії за характерними мікроскопічними змінами. Також виключається необхідність приготування мазків-відбитків з органів лабораторних тварин та їх наступне фарбування за Стемпом чи Романовським-Гімза для ідентифікації хламидій.

Суть запропонованого способу полягає в тому, що як патматеріал для виділення хламидій використовують ділянки уражених плодових оболонок, внутрішні органи абортіваних плодів і мертвнонароджених поросят, шматочки паренхіматозних органів плодів та хворих тварин, слиз піхви, проби еякулята (не менше 1мл) або замороженої сперми (не менше 4-х гранул). З патматеріалу готують 10% суспензію на фізіологічному розчині з рН 7,2-7,4 та центрифугують її при 2000об/хв 15 хвилин. Надосадову рідину обробляють антибіотиками, додаючи 100од/мл пеніциліну та 500од/мл стрептоміцину або 150мкг/мл гентаміцину.

Проби сперми, еякуляту, слизу піхви використовують нерозведеними або розводять 1:27 фізіологічним розчином з рН7,2-7,4. Розведені чи не розведені проби обробляють антибіотиками так само, як і інші види патматеріалу.

Після додавання антибіотиків матеріал для зараження витримують у холодильнику при +4°C протягом 2-4 годин. Через 2-4 години матеріал для

зараження вводять у черевну порожнину або інтраторакально (в грудну порожнину через міжреберні тканини з правої сторони) білим мишам в дозі 0,3мл, морським свинкам - 0,5мл. Для постановки однієї біопроби використовують 5 білих мишей масою у 16-20гр. або 2-3 морських свинки масою 300-350гр. Тварини знаходяться під наглядом 5-7 днів, після чого їх забивають і відбирають шматочки печінки, нирок, селезінки та легень. З кожного органу з різних ділянок відбирають по 4 шматочки кубічної форми з довжиною ребра 0,4-0,6см. При загибелі тварин до 5-7 доби після зараження проводять їх розтин і так само відбирають шматочки органів для подальших досліджень. Відібрані шматочки органів фіксують у 96° етанолі 2 доби. Після фіксації шматочки переносять на 12-15год. у 100° етанол для зневоднення. 100° етанол готують шляхом відстоювання 96° етанолу з сірчаною кислотою міддю. Для цього в колбу з притертою кришкою засипають 170г зневодненої сірчаною кислотою міді та 500мл 96° етанолу. Колбу збовтують та відстоюють 2 доби. Після чого в іншу колбу знов засипають 170г зневодненої сірчаною кислотою міді та наливали етанол з першої колби. Колбу збовтують і залишають на 1 добу. Отриманий спирт фільтрують через фільтрувальний папір та використовували для зневоднення.

Після зневоднення шматочки патматеріалу заливають у парафін за наступною схемою:

- 1) 100° етанол : ксилол у співвідношенні 3:1-2 години;
- 2) 100° етанол : ксилол у співвідношенні 1:1-2 години;
- 3) ксилол - 1 година;
- 4) ксилол : парафін у співвідношенні 1:1 (t=37°C) - 30хв.;
- 5) парафін I при t=50-55°C - 30хв.;
- 6) парафін II при t=50-55°C - 30хв.

З кожного шматочка на мікротомі одержують зрізи товщиною 8-10мкм, які зафарбовують гематоксиліном та еозином.

Хід фарбування: депарафінують зрізи в ксилолі і через 960 та 70° етанол доводять до дистильованої води, витримуючи в кожному реактиві по 5-7хв. Переносять у гематоксилін Караці на 5хв. Споліскують у дистильованій воді. Переносять у водопровідну воду на 20хв., споліскують у дистильованій воді. Дофарбовують у 0,01% водному розчині еозину 2хв. Швидко споліскують у дистильованій воді. Зневоднюють у 70° і 96° етанолах та переносять у ксилол, витримуючи в кожному реактиві по 2-5хв. Заключають у бальзам.

Хламидії в клітинах ідентифікують за наявністю в їх цитоплазмі базофільних (забарвлених у синій колір) тілець-включень.

Таким чином, спосіб виділення хламидій на лабораторних тваринах дозволяє ідентифікувати збудник хламідіозу, може бути використаний для діагностики цієї хвороби в тварин у роботі науковців та державних лабораторій ветеринарної медицини.

