

Удк 636.5:57.086.1/.16:612.12

Н.І. БОЙКО, кандидат ветеринарних наук, доцент,

Ю.В. БОЙКО, аспірант*,

Р.А. КОХАНІЙ, студент ОКР "Магістр",

Р.П. МИКОЛАЙЧУК, студент ОКР "Магістр"

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Особливості відбору крові у птиці та фарбування мазків

Встановлено, що одним з найкращих місць для відбору крові у птиці є плечова вена. Для морфологічних досліджень крові у птиці в якості антикоагулянта рекомендуємо використовувати сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA-натрію-трилон Б) з розрахунку 1,6 мг на один мл крові або 10% розчин EDTA – 1-2 краплі на один мл крові. Найбільш ефективним є фарбування клітин в мазках крові птиці за методом Папенгейма. Фарбування мазків крові у птиці методом Diff-Quik (Набір реактивів Лейкодиф 200) значно поступається такому за Папенгеймом і він може бути рекомендований для гематологів з досвідом роботи.

Птиця, відбір крові, фарбування клітин крові



Рис. 1. Місце пункції плечової вени у птиці

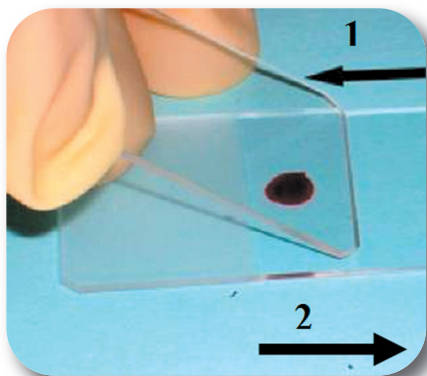


Рис. 2. Техніка виготовлення мазка крові



Рис. 3. Вигляд готових мазків

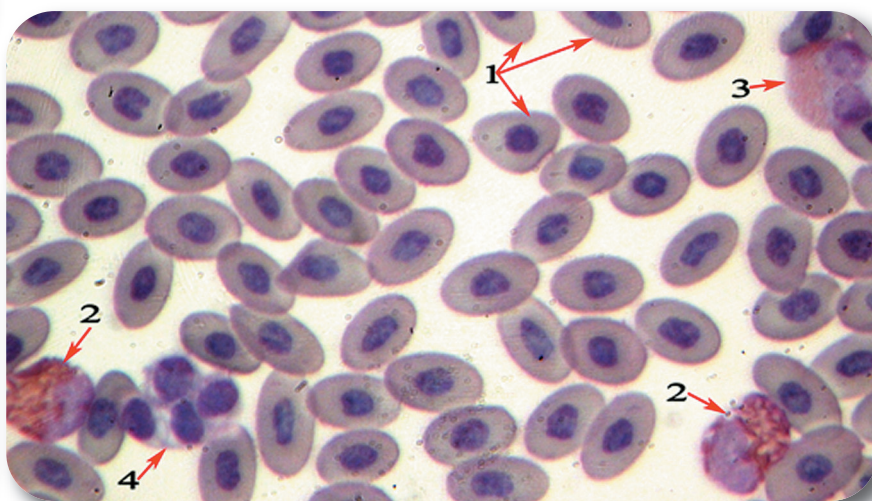


Рис.4. Мазок крові 14-добового курчати (фарбування в модифікації Паппенгейма, окуляр 10 Ч, об'єктив 100). 1 – еритроцити; 2 – гетерофіли, 3 – еозинофіл; 4 – тромбоцити.

* Науковий керівник – д.вет.н., професор В.Б.Духницький.

У здорових тварин має місце постійність фізико-хімічного і морфологічного складу крові. Як відомо, її клітини утворюються в органах кровотворення, які реагують на різні фізіологічні і, особливо, патологічні фактори зміною складу крові. Тому дослідження крові має велике діагностичне значення і разом з клінічними дослідженнями надає можливість виявити приховані зміни у тканинах, органах та їх системах організму, визначити ускладнення, що виникають при тому чи іншому патологічному стані, диференціювати захворювання, контролювати ефективність лікування хворих тварин та прогнозувати перебіг хвороби.

При дослідженні крові першим етапом є правильний її відбір. Надалі важливо якісно виготовити мазок та провести фарбування клітин крові. Слід відмітити, що у птиці, на відміну від ссавців, процес відбору крові, а також методи фарбування мазків мають свої відмінності.

У зв'язку з цим, **метою** нашої роботи було встановити особливості відбору крові та методів фарбування її мазків у птиці.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили в умовах проблемної лабораторії кафедри терапії і клінічної діагностики "Внутрішні незаразні хвороби тварин" НУБіП України.

Матеріалом для досліджень була кров, відібрана від 10-и клінічно здорових курчат-бройлерів 14-добового віку, яких утримували в умовах віварію НУБіП України.

Методи досліджень: клінічні, морфологічні.

Кількість еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів підраховували в лічильній камері з сіткою Горяєва. Мазки крові фарбували методом Романовського-Гімза; методом Папенгейма; експрес-методом Diff Quik (набір реактивів Лейкоцид-200).

Під час підрахунку клітин крові та виведення лейкограми користувались мікроскопом ULAB. Для виведення зображень на екран монітора і фотофіксації використовували дзеркальний фотоапарат CANON EOS 550 D, перехідну камеру NDPL-1(2X) та спеціальну комп'ютерну програму Canon EOS Digital.

Результати досліджень. Перш ніж приступити до відбору крові в птиці слід пам'ятати багато важливих моментів. У птиці відбувається дуже швидке зсідання крові (20-30 с), тому при відборі великих об'ємів (2-4 мл) кров може зсістися вже у шприці, що не дасть можливості провести її дослідження. Тому, краще внутрішню поверхню шприца "зросити" антикоагулянтном перед відбором крові або використовувати заводські системи для забору крові вже з антикоагулянтном. Одразу після відбору крові пробірку (чи шприц) декілька разів перевертають (6-8), щоб ретельно змішати кров з антикоагулянтном (не струшують!) [2, 3].

Для морфологічних досліджень крові у птиці достатньо відібрати 0,1 – 0,5 мл, а для серологічних і біохімічних – від 2 до 4 мл. Кров на ці дослідження відбирають із периферійних судин (діаметр останніх вибирають залежно від об'єму крові). При проведенні наукових досліджень, які передбачають значну кількість досліджуваних показників, кров у птиці відбирають з головної (плечової) вени або із яремної вени чи серця. Невелику кількість вологого препарату чи мазка можна отримати, наприклад, у добових курчат, провівши пункцію вени на каудо-медіальній поверхні голки чи провівши надріз на гребені.

Якщо потрібна кров цільна, то її стабілізують, тобто додають антикоагулянти. В якості антикоагулянтів із розрахунку на 10 мл крові можна взяти 10-20 мг натрію цитрату або оксалату, 2-3 краплі 1% розчину гепарину (1-2 мг або 50 од), 10-15 крапель 10% розчину натрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА-натрію-трилон Б).

Найкращим антикоагулянтном для проведення морфологічних досліджень більшість дослідників вважають EDTA. Хоча є дуже багато повідомлень, що підтверджують ненадійність цього антикоагулянта та появу гемолізу крові [1].

Свіжу пробу крові не можна одразу заморожувати і не можна ставити на лід, оскільки це порушить процес згортання. Кров транспортують у

контейнері за температури 2-4 °С. Морфологічні дослідження бажано провести за 2-3 години після відбору крові. Стабілізована кров, яка зберігалась у холодильнику більше доби, для дослідження не придатна, оскільки завжди будуть сумнівні результати [2, 3, 5].

Якщо для досліджень необхідна плазма, то стабілізовану кров центрифугують упродовж 10 хв. при 2500–3000 обертів за хвилину.

Пункція плечової вени – найпростіший метод взяття крові у курей, індиків і більшості домашньої птиці (особливо, якщо птицю потрібно повернути в стадо), тому ми використовували саме цей метод.

Для полегшення процедури пункції необхідно випрямити крило, міцно тримаючи його біля перетинки. Оголити плечову вену, видаливши кілька пір'їн з вентральної поверхні плечової частини крила. При цьому вена проглядається в заглибині між дво- і триголовим м'язами плеча. Покращити її видимість можна змочивши шкіру 70% спиртом чи іншим некольоровим дезінфікуючим засобом. Голку необхідно вводити під кутом 15° по відношенню до горизонтальної площини в напрямку протилежному кровотоку (рис. 1) [2, 5, 6].

Розмір і довжина голки для пункції вени залежать від розміру птиці: для курчат та індиченят потрібна голка 20-го калібру довжиною приблизно 2 см, для дорослих курей – голка 20-го калібру довжиною 2,5 см, для дорослих індиків може знадобитися голка більшого розміру. Щоб швидко і точно досягнути мети, голка має бути гострою.

Під час відбору крові ми використовували голку 20-го калібру та одноразовий шприц на 1,0 см², періодично створювали невеликий вакуум, щоб визначити, коли голка ввійшла у вену. Після проколу стінки вени відбір проби крові здійснюють при невеликому вакуумі (якщо вакуум надто високий, то стінка судини може впинатися в голку, в результаті чого відбудеться закупорювання її скошеного отвору). Іноді слід робити кругові рухи голкою, щоб переконатися, що скошений її отвір знаходиться в просвіті судини.



Рис. 5. Набір реактивів Лейкоциф 200 (Lachema)

Якщо потрібно одержати сироватку крові, то проби крові без антикоагулянта відстоюють упродовж однієї години. В нашому випадку сироватка відділилась дуже швидко (до 1 години) навіть при кімнатній температурі.

Сироватку крові не слід заморожувати, якщо необхідно провести реакцію аглютинації, тому що це часто призводить до отримання сумнівно позитивних результатів. В інших випадках сироватку і плазму крові можна заморожувати при температурі -20°C і зберігати їх протягом 3-х місяців.

Для проведення серологічних досліджень кров відбирають в чисту скляну пробірку без антикоагулянта, яку закривають корком і кладуть горизонтально (чи майже горизонтально) та залишають у такому положенні до тих пір, поки кров не зсядеться.

Іноді для зсідання крові необхідний більш тривалий час (особливо у індиків). Зсідання крові можна прискорити, додавши до неї кілька крапель екстракту тканин, виготовленого із 10-12 добових ембріонів, подрібнених у гомогенізаторі Уоринга і заморожених [4]. Після того, як утворився кров'яний згусток, пробірку ставлять у вертикальне положення, щоб сироватка стекла на її дно. Для взяття крові можна використовувати і пластикові пробірки, у них кров, що зсілась не при-

липає до стінок і тому пробірки можна не ставити у горизонтальне положення. Для деяких серологічних досліджень можна адсорбувати кров на смужках фільтрувального паперу, висушити їх і надіслати в лабораторію. У лабораторії смужки паперу з пробами крові обробляють сольовими розчинами та отримують антитіла до деяких антигенів. Часто сироватка курей має молочно-білий колір із-за наявності в ній ліпідів. Розміщення пробірок в інкубатор прискорить синерезис – самовільне зменшення об'єму гелів і студнів, що супроводжується відділенням рідини. При підозрі на паразитарні захворювання, першу краплину крові наносять на попередньо підігріте (щоб швидше висох мазок), чисте і сухе предметне скло і виготовляють мазок.

Техніка виготовлення мазка. На сухе знежирене предметне скло наносять краплину крові шириною в 2-3 мм (за 1,0-1,5 см від краю). Мазок готується шліфованим склом із ідеально рівним краєм, ширина якого повинна бути на 2-3 мм вужча за предметне.

Шліфоване скло ставлять під кутом 45° перед краплиною крові, потім зміщують його назад (рис. 2, стрілочка 1), щоб воно зіткнулось з краплиною і кров розтеклась рівномірно по краю скла (можна легенько рухати шліфоване скло уверх-униз, не відриваючи його

від предметного). Швидким рухом зміщують шліфоване скло в протилежну сторону (рис. 2, стрілочка 2). Вся краплина крові має бути вичерпана до кінця мазка. Правильно виготовлений мазок закінчується "віничком" (рис. 3).

Фарбування мазків за Романовським-Гімза. Висушений мазок крові фіксували: за допомогою шприца з голкою наносили 2-4 cm^3 метилового спирту, витримували 3 хв., залишки спирту зливали, а мазок висушували. Готували робочий розчин Романовського-Гімза. Для цього на одну частину нерозведеної фарби Романовського додавали три (чотири чи п'ять – залежно від якості фарби) частин дистильованої води. Потім на мазки рівномірно наносили 2-4 cm^3 робочого розчину Романовського-Гімза, фарбували їх протягом 20 хв. Фарбу з мазків змивали водопровідною водою. Цим методом чітко зафарбувались ядра клітин крові, однак недостатньо добре фарбуються гранули у цитоплазмі клітин-гранулоцитів. У зв'язку з недостатньою інформативністю результати досліджень таких мазків ми не описували.

Фарбування мазків крові птиці в модифікації Паппенгейма (Май-Грюнвальда-Гімза). При цьому методі фарбування попередня фіксація мазків не потрібна, так як перша фарба – Май-Грюнвальд має у своєму складі метиловий спирт.

Спочатку на мазок наносили 2 cm^3 нерозведеної фарби Май-Грюнвальд, що являє собою розчин еозину і метиленової синьки в метиловому спирті.

Через 1 хв. фарбу з препарату обережно змивали водопровідною водою і, не висушуючи, 15 хв. фарбували його робочим розчином фарби Гімза (2-4 cm^2), а потім промивали водопровідною водою. Завдяки цьому методу чітко виявляється зернистість у гранулоцитах (фарба Май-Грюнвальда) і добре фарбуються ядра клітин (фарба Романовського-Гімза) (рис. 4).

Експрес-метод фарбування мазків крові птиці за допомогою набору реактивів Лейкоциф 200 (Lachema). Лейкоциф 200 (рис.5) має у своєму складі три реактиви: перший – фік-

суючий (метанол + нафталіновий зелений); другий – фарбуючий розчин 1 (еозин + фосфатний буфер), третій – фарбуючий розчин 2 (азур II + фосфатний буфер).

Висушений мазок крові занурюють (по 1 секундні): у перший розчин – 5 разів, у другий – 3 рази, у третій – 6 разів. Фарбу відразу ж змивають водопровідною водою, висушують і розглядають під мікроскопом. Фарбування мазків крові за цим методом не вимагає особливих технічних навичок, тривалого очікування та лабораторного посуду. Однак, необхідно відмітити, що при цьому методі фарбування гранули гетерофілів, базофілів і еозинофілів диференціюються гірше, ніж при фарбуванні за Папенгеймом (рис. 6).

Після якісного виготовлення і фарбування мазків можна проводити дослідження клітин крові.

Висновки

1. Одним з найкращих місць для відбору крові у птиці є плечова вена.
2. Для морфологічних досліджень крові у птиці в якості антикоагулянта рекомендуємо використовувати сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA-натрію-трилон Б) з розрахунку 1,6 мг на один мл крові або 10% розчин EDTA – 1-2 краплі на 1 мл крові.
3. Найбільш ефективним є фарбування клітин у мазках крові птиці за методом Папенгейма.
4. Фарбування мазків крові у птиці методом Diff-Quik (набір реактивів Лейкодиф 200) значно поступається такому за Папенгеймом і він може бути рекомендований для гематологів з досвідом роботи.

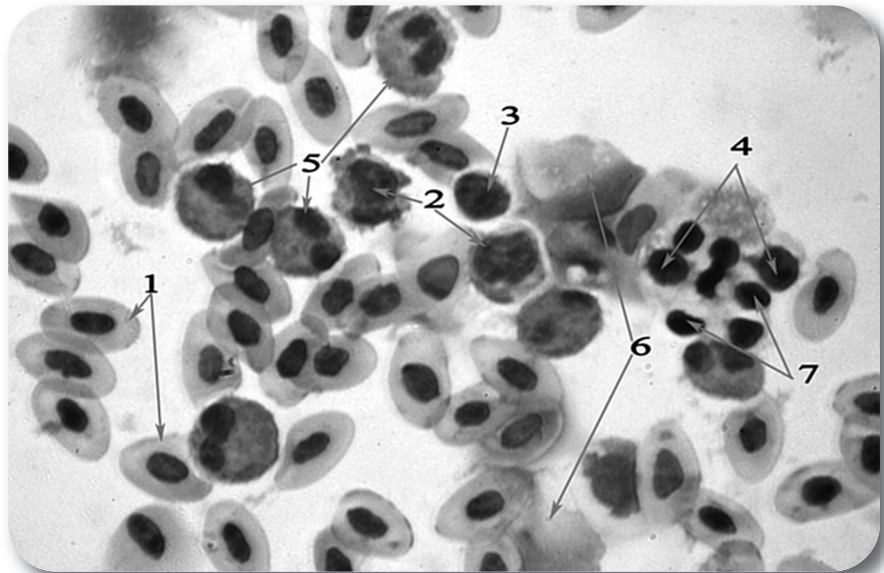


Рис. 6. Мазок крові 14-добового курчати (зафарбування Diff-Quik (набір реактивів Лейкодиф 200) окуляр 10 Ч об'єктив 100): 1 – еритроцити; 2 – великі лімфоцити; 3 – середній лімфоцит; 4 – малі лімфоцити; 5 – гетерофіли (нейтрофіли, псевдоеозинофіли); 6 – фігури розпаду ядер, “тіні” ядер; 7 – тромбоцити.

Установлено, что лучшим местом отбора крови у птицы является плечевая вена. При морфологических исследованиях крови у птицы в качестве антикоагулянтов рекомендуем применять EDTA-натрия-трилон Б в виде соли, из расчета 1,6 мг на 1 мл крови, или – 10% раствора – 1-2 капли на 1 мл крови. Наиболее эффективным является окрашивание клеток крови у птицы методом Паппенгейма. Окрашивание мазков крови птицы при помощи набора реактивов “Лейкодиф 200” значительно уступает по качеству такому по методу Паппенгейма и он должен использоваться гематологами с опытом работы.

Птица, отбор крови, окрашивание клеток крови

One of the best places to collect blood in poultry is brachial vein. For morphological studies of blood in birds as anticoagulant recommend use salt EDTA at the rate of 1,6 mg per ml of blood or 10 % solution of EDTA – 1-2 drops per ml of blood. The most effective staining cells in blood films poultry by modified Pappenheim. Blood films in poultry by Diff-Quik stain is considerably inferior for this modified Pappenheim and it can be recommended for hematologists with expertise

Poultry, collect blood, cells in blood films

Література

1. Clark P. Atlas of Clinical Avian Hematology/ Phillip Clark, Wayne S.J.Boardman, Shane R.Raidal. – WILEY-BLACKWELL, 2009. – 138 с.
2. Антонова В.Я. Лабораторные исследования в ветеринарии / В.Я.Антонова, П.Н.Блинов. – М.: Колос, 1971. – 648 с.
3. Никитин В.Н. Атлас клеток крови / В.Н.Никитин М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1949. – 118 с.
4. Болезни домашних и сельскохозяйственных

птиц / Пер. с англ. И.Григорьева, С.Дорош, Н.Хрущева и др. – М.: Аквариум Бук, 2003.– 1232 с.

5. Левченко В.І. Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин / В.І.Левченко, В.В.Влізло, І.П.Кондрахін та ін.: за ред. В.І.Левченка. – Біла Церква, 2004.– 608 с.
6. Цвіліховський М.І. Фізико-хімічні, морфологічні та біохімічні дослідження крові сільськогосподарських тварин: методичні вказівки /М.І.Цвіліховський, І.Г.Погурський, В.О.Бондар та ін. – К.: НАУ, 2002. – 49 с.