



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 140634

(13) U

(51) МПК

G01N 1/30 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 07705**

(22) Дата подання заявки: **08.07.2019**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.03.2020**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.03.2020, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):

**Зажарська Надія Миколаївна (UA),
Костюченко Катерина Геннадіївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-
ЕКОНОМІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, 49600
(UA)**

(54) ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ МАЙ-ГРЮНВАЛЬДА ДЛЯ ФАРБУВАННЯ МАЗКІВ ОВЕЧОГО МОЛОКА

(57) Реферат:

Застосування методу фарбування мазків крові за Май-Грюнвальдом як способу фарбування мазків овечого молока для підрахунку соматичних клітин.

UA 140634 U

Корисна модель стосується визначення якості овечого молока, зокрема способу фарбування мазків овечого молока для підрахунку соматичних клітин.

Галузь застосування: ветеринарія, біологія та медицина.

5 Визначення кількості соматичних клітин в молоці є важливим показником як для визначення стану здоров'я дрібної рогатої худоби, так і в програмах контролю за маститом овець [1]. Antunac N. і ін. вважають, що молоко отримано від хворих на мастит овець, якщо в ньому міститься більше 1 млн./см³ соматичних клітин. Нині не визначено порогових значень для кількості соматичних клітин в овечому молоці через суперечливі думки [2]. Американські вчені відмітили, що підвищена кількість соматичних клітин молочної залози є головною проблемою у всьому світі для кіз, корів та овець [3].

10 Арбітражний метод визначення кількості соматичних клітин у лактуючих тварин - це підрахунок соматичних клітин молока за методом Прескота-Бріда.

15 Не існує в Україні методів фарбування для дослідження мазків овечого молока. Відповідно до ДСТУ ISO 13366-1:2013 і методичних рекомендацій щодо підрахунку соматичних клітин (2011) мазки козиного молока рекомендують фарбувати піроніном Y і метиловим зеленим [4].

20 Згідно з патентом на корисну модель № 121440 "Застосування методу Май-Грюнвальда для фарбування мазків козиного молока" заявл. 18.05.2017; опубл. 11.12.2017, бюл. № 23 [5] метод Май-Грюнвальд, який зазвичай використовується для фарбування мазків крові, рекомендований для фарбування мазків козиного молока. Метод відповідає арбітражному з піроніном Y, проте у розробленому методі вартість реактивів у 28,4 разу дешевша.

25 Мазки овечого молока фарбували піроніном Y і метиловим зеленим, як запропоновано згідно з методичними рекомендаціями для козиного молока. Але барвники для проведення дослідження мають високу вартість, тому ми порівнювали рекомендований метод з більш доступними.

30 Існує метод фарбування мазків крові за Май-Грюнвальдом, але немає відомостей про застосування цього методу для фарбування мазків овечого молока для підрахунку соматичних клітин.

В основу корисної моделі поставлено задачу пошуку дешевого і якісного способу фарбування мазків овечого молока для підрахунку соматичних клітин.

35 Для дослідження були порівняні різні методи визначення кількості соматичних клітин у овечому молоці.

Досліджували індивідуальні проби молока від 36 овець. Виготовляли мазки молока, застосовували фіксатор Карнуа, фарбували 4-ма методами: піроніном Y і метиловим зеленим, за Май-Грюнвальдом, за Романовським-Гімза, за модифікованим методом Ньюмана. Потім підраховували соматичні клітини за методом Прескота-Бріда під мікроскопом (об'єктив 100) за допомогою імерсійної олії.

Методика фарбування мазків овечого молока за Май-Грюнвальдом:

- фарбування проводили готовим розчином фарби Май-Грюнвальда.

40 - на фіксований мазок наносили 1-2 см³ розчину готової фарби Май-Грюнвальда з водою 1:1 і залишали на 2-3 хвилини. Потім мазок промивали водою і дофарбовували за Романовським-Гімза протягом 10-15 хв. (1-2 краплі фарби Романовського-Гімза на 1 см³ дистильованої води). Далі препарат промивали водою і висушували на повітрі.

45 При дослідженні мазків молока за методом Май-Грюнвальда отримали найкращі результати у порівнянні з іншими методами фарбування. Виявили соматичні клітини з чітко окресленою цитоплазмою та ядрами (фіг. 1).

Методика фарбування мазків овечого молока піроніном Y і метиловим зеленим:

- приготування барвника: піронін Y (250 мг) і метиловий зелений (140 мг) додавали у колбу з демінералізованою водою (49 см³) і ретельно перемішували. Фільтрували через відповідний фільтр.

50 - після фіксування мазків молока їх фарбували за такою схемою: розчин барвника піронін Y з метиловим зеленим - протягом 6 хв.; швидко промивали н-бутиловим спиртом, а потім ксилолом. Готові пофарбовані мазки висушували на повітрі.

55 Під час фарбування мазків піроніном Y і метиловим зеленим ядра соматичних клітин також отримали задовільний результат, але через високу вартість матеріалів цей метод використовувати недоцільно (фіг. 2).

Методика фарбування мазків овечого молока за Романовським-Гімза:

60 - приготування робочого розчину фарби Романовського-Гімза: 1-2 краплі фарби Романовського-Гімза на 1 см³ дистильованої води. Мазки розміщували в чашки Петрі або на піддоні і на них піпеткою наносили робочий розчин фарби. Мазки фарбували 20-25 хв. при 37 °С. Після фарбування мазки промивали у проточній воді, висушували на повітрі.

- Під час дослідження кількості соматичних клітин молока в мазках, які були пофарбовані за Романовським-Гімза, отримали незадовільні результати, оскільки клітини овечого молока слабо забарвлювалися і підрахувати їх кількість було неможливо (фіг. 3).

Методика фарбування мазків овечого молока за модифікованим методом Ньюмана:

5 - приготування барвника: змішували метиленовий синій хлорид (0,6 г), 95 % етиловий спирт (52 мл), тетраетилен (44 мл), крижана оцтова кислота (4 мл) та ретельно перемішували. Фільтрували через відповідний фільтр.

- наносили фарбу на фіксовані мазки овечого молока та витримували 1 хв. Змивали дистильованою водою.

10 Фарбування за модифікованим методом Ньюмана дало незадовільний результат, так як мазки інтенсивно забарвлюються та неможливо чітко розгледіти клітини овечого молока (фіг. 4).

На фіг. 1 зображено соматичні клітини у мазках овечого молока. Фарбування за Май-Грюнвальдом. $\times 1000$, на фіг. 2 - соматичні клітини у мазках овечого молока. Фарбування піроніном Y і метиловим зеленим. $\times 1000$, на фіг. 3 - Соматичні клітини у мазках овечого молока.

15 Фарбування за Романовським-Гімза. $\times 1000$, на фіг. 4 - Соматичні клітини у мазках овечого молока. Фарбування за модифікованим методом Ньюмана. $\times 1000$

Економічна ефективність методів фарбування мазків молока

Для підрахунку соматичних клітин у овечому молоці за методом Прескота-Бріда у мазках, зафарбованих методом Май-Грюнвальда, чітко визначається цитоплазма та ядра соматичних клітин, як і за методом фарбування з піроніном Y. Вирахували вартість цих двох методів, тому що модифікований метод Ньюмана і метод Романовського-Гімза, за нашими результатами, не придатні для фарбування мазків овечого молока.

20 На фарбування 36 мазків молока за методом Май-Грюнвальда витратили 28,44 грн. На фарбування 36 мазків молока піроніном Y і метиловим зеленим витратили 810,72 грн.

25 За результатами розрахунку загальних ветеринарних витрат можна зробити висновки, що вартість реактивів для дослідження мазків молока за методом Май-Грюнвальда менша у 28,5 разу у порівнянні з фарбуванням мазків піроніном Y.

Таким чином, для підрахунку соматичних клітин у овечому молоці за методом Прескота-Бріда пропонується фарбувати мазки методом Май-Грюнвальда, тому що чітко зафарбовується цитоплазма та ядра соматичних клітин, а вартість барвників менша у 28,5 разу, ніж за методу з піроніном Y.

Джерела інформації:

1. Fuertes J.A., Gonzalo C., Carriedo J.A., San Primitivo F. Parameters of Test Day Milk Yield and Milk Components for Dairy Ewes /Journal of Dairy Science. - 1998. - 81. - P. 1300-1307.

35 2. Antunac N., Mioс B., Vesna Pavic. The effect of stage of lactation on milk quantity and number of somatic cells in sheep milk /Faculty of Agriculture, University of Zagreb, Zagreb, Croatia. - 2002.

3. Paape M.J., Wiggans G.R., Bannerman D.D., Thomas D.L., Sanders A.H., Contreras A., Moroni P. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts /Small Ruminant Research. - 2007. - 68. - P. 114-125.

40 4. Методичні рекомендації щодо підрахунку соматичних клітин в секреті вимені окремих корів та в збірному сирому молоці корів мікроскопічним методом визначення середньої геометричної величини. Автори: Касянчук В.В., Скляр О.І., Гаркавенко Т.О., Меженська Н.А., Остапюк М.П., Марченко А.М., Бергілевич О.О. - Київ, 2011.

45 5. Зажарська Н.М. заявник і патентовласник Зажарська Н.М. (2017). Патент на корисну модель № 121440 Україна МПК (2006.01) u201704803 Застосування методу Май-Грюнвальда для фарбування мазків козиного молока, заявл. 18.05.2017; опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

50 Застосування методу фарбування мазків крові за Май-Грюнвальдом як способу фарбування мазків овечого молока для підрахунку соматичних клітин.

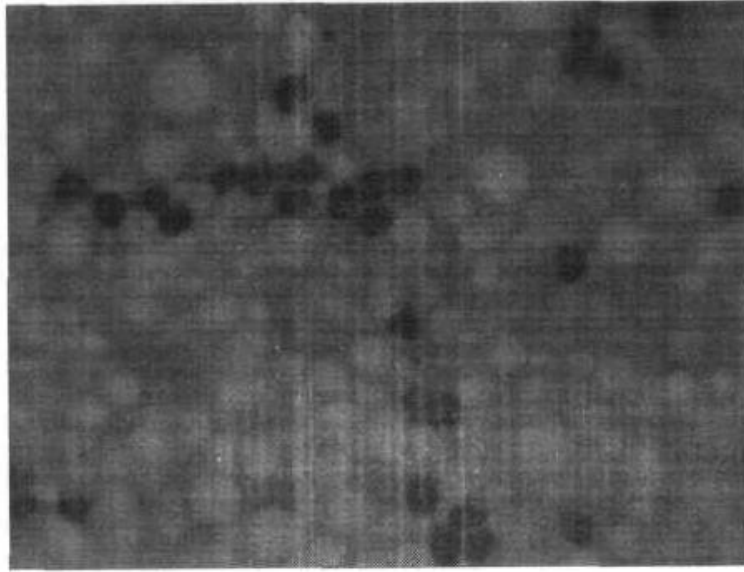


Fig. 1

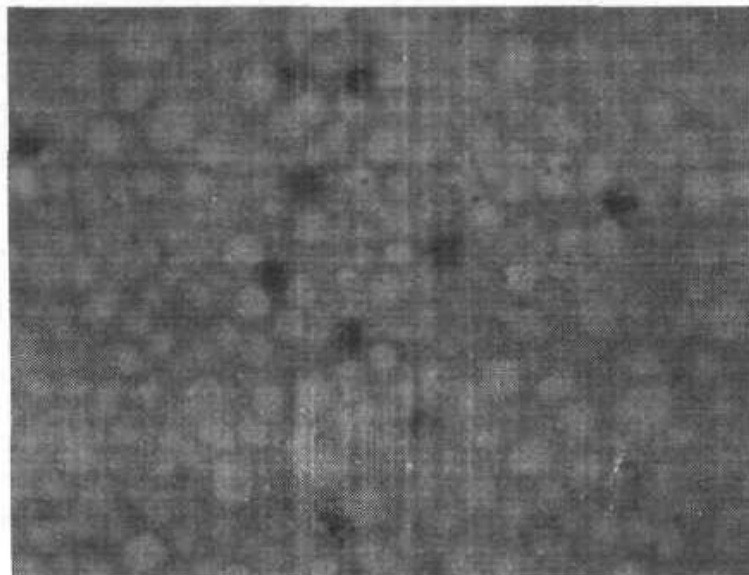
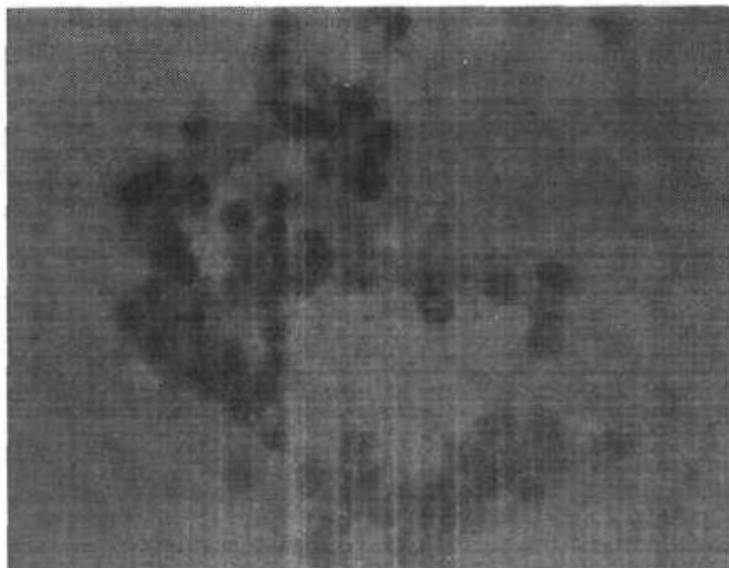
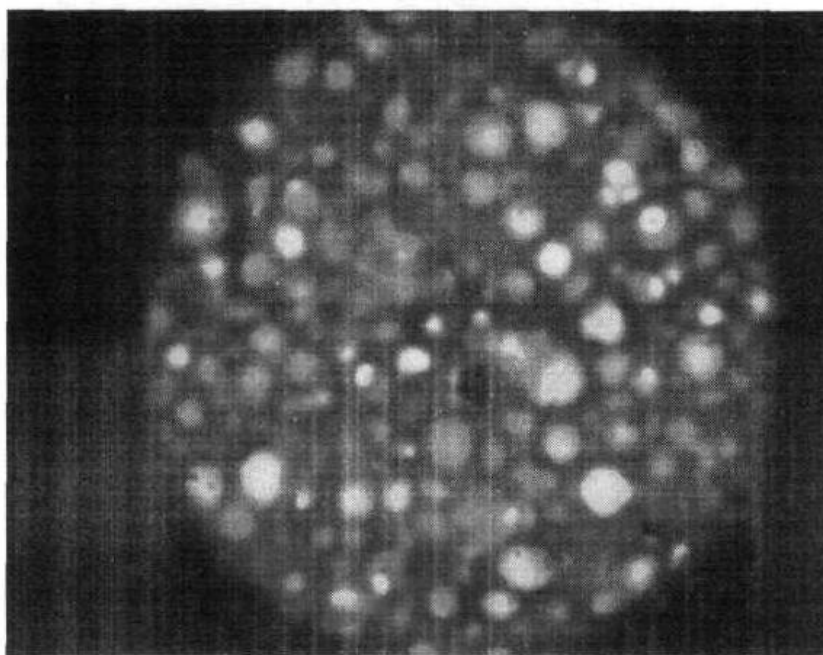


Fig. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601