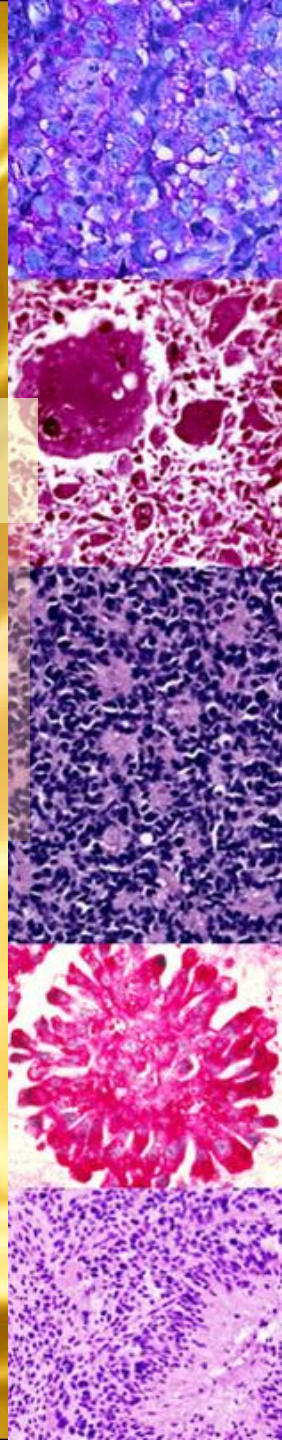
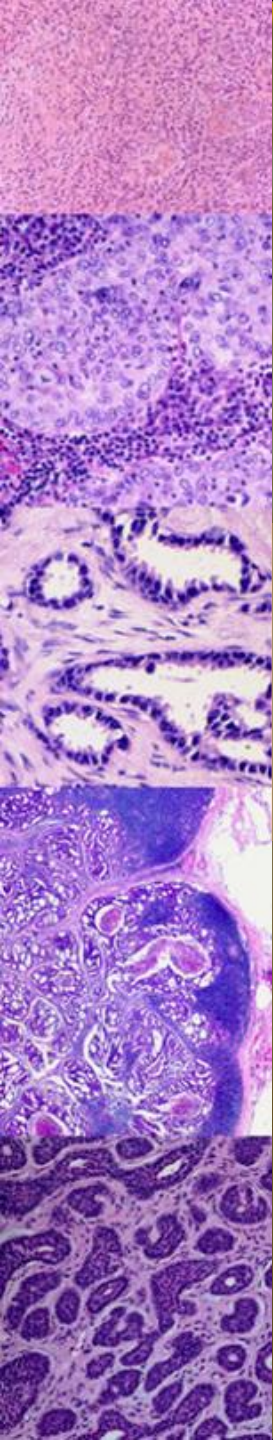


Клінічна морфологія, онкологія і патологія

Лекція №1

Вступ.

Методи досліджень у клінічній патології



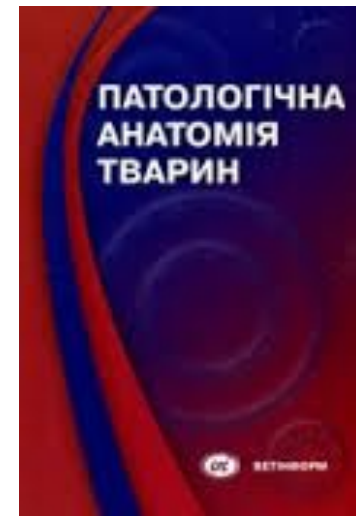
Питання лекції

1. Предмет та зміст дисципліни.
2. Історія розвитку дисципліни.
3. Правила формулювання клінічного та патологоанатомічного діагнозів.
4. Методи досліджень у клінічній патології.
5. Правила відбору біологічного матеріалу для різних видів досліджень.



Література

1. Патологічна анатомія тварин. П.П. Урбанович, М.К. Потоцький, Г.А. Гевкан. – 2008.
2. Ветеринарная клиническая онкология. П.Ф. Терехов. – 1983.
3. Онкологические заболевания мелких домашних животных. Ричард А.С. Уайт. – 2003.



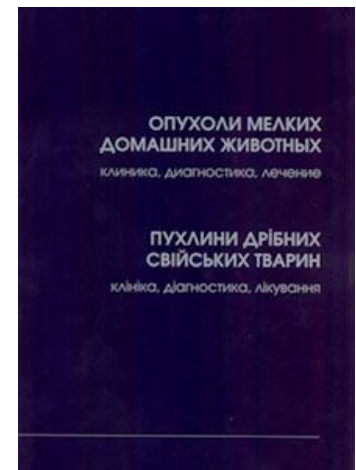
Література

4. Микроскопические исследования в диагностике заболеваний мелких домашних животных. С.В. Середа и др.

5. Опухоли мелких домашних животных: клиника, диагностика, лечение. Под редакцией д.м.н. чл-корр. НАНУ В.Ф. Чехуна

д.в.н. чл-корр. УААН А.И. Мазуркевича.- 2001.

6. Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи



1. Предмет та зміст дисципліни

- **Мета дисципліни** – набуття теоретичних і практичних навичок для проведення клінічних морфологічних досліджень хвороб тварин і оформлення відповідної документації.
 - Методичними підходами до проведення морфологічних досліджень у ветеринарній медицині
 - Набуття основ патогістологічних досліджень
 - Особливості патогістологічних змін органів і тканин при пошкодженнях, порушеннях крово- і лімфообігу, розвитку пристосувальних і компенсаторних процесів, запаленні, вадах розвитку і пухлинах.

2. Історія розвитку дисципліни

1. Анатомічний (до початку ХІХ ст)
Дж. Морган'ї
К. Рокитанський
2. Мікроскопічний (ХІХ ст – середина ХХ ст)
Р. Вірхов
М.М. Руднев
3. Ультрамікроскопічний (з середини ХХ ст)
4. Сучасний – «патологічна анатомія живого організма»



3. Правила формулювання клінічного і патологоанатомічного діагнозів

Діагноз

– це краткий медичний висновок про хворобу, відхилення у стані здоров'я або про причину смерті.





Установление диагноза болезни – самый главный этап в работе врача.

Он составляет заключительную часть процесса диагностики. В диагнозе должна быть проявлена врачебная логика, умение формулировать свои мысли, связывать воедино симптомы и синдромы и делать выводы о сущности болезни, ее состоянии, прогрессе и лечении.

Основні види діагнозів:

- **Клінічний (прижиттєвий) –**
 - **попередній** (при недостатній повноті обстеження, діагноз може бути симптоматичним або синдромологічним),
 - **остаточний**, в ньому вказують всі встановлені у процесі діагностики захворювання у відповідності з прийнятими класифікаціями, виділяючи на перше місце основне, а також клінічні характеристики (етіологія, стадія хвороби, ступінь важкості, функціональні порушення і т.і.);
- **Патологоанатомічний (посмертний);**
- **Судово-медичний (прижиттєвий і посмертний).**

Розділи діагнозу:

- Основне захворювання;
- Ускладнення основного захворювання, які необхідно згрупувати за ступенем важкості;
- Фонові та конкуруючі хвороби;
- Супутні захворювання.

- **Основне захворювання** (комбіноване основне захворювання) – одна або декілько нозологічних одиниць (захворювання, травми, синдроми), які сами по собі або через ускладнення привели до загибелі тварини.
 - а) **Конкуруюче захворювання** – комплекс захворювань, якими одночасно страждала тварина і кожне з них самотійно може стати причиною загибелі.

Приклад: рак IV стадії, інфаркт міокарду.
 - б) **Сочетані захворювання** – комплекс ускладнюючих одне одного захворювань, якими одночасно страждала тварина, кожне з яких самотійно не викликає загибелі.

- **Фонове захворювання** – патологічний стан патогенетично пов'язаний з основним захворюванням, що є однією з причин його розвитку, **ускладнює протікання хвороби**, сприяє виникненню смертельних ускладнень.

Приклади: у людини – артеріальна гіпертензія; цукровий діабет II типа → імунодефіцит; хронічна алкогольна інтоксикація і т.і.

у тварин – гіповітамінози, хронічні мікотоксикози → імунодефіцит.

- **Ускладнення основного захворювання** – патологічний процес, **патогенетично пов'язаний** з основним захворюванням, що ускладнює його протікання і часто є **безпосередньою причиною смерті**
- (порушення цілісності органа або його стінки, кровотеча, гостра або хронічна недостатність функції органа)
- **Лейкоз → розрив селезінки → кровотеча → смерть**

Захворювання, що не мають безпосереднього відношення до смерті тварини

- **Супутні хвороби** – одне або кілька захворювань, що не були безпосередньо пов'язані з основним захворюванням та не приймали участі в танатогенезі (доброякісні пухлини, деякі гельмінтози).





«Если диагноз основан на лабораторных данных, врач должен быть уверен в надежности метода и в качестве выполнения исследования»

Дж. Греф и соавторы, «Manual of Pediatric Therapeutics», 1994г.



Обеспечение высокого качества лабораторных исследований – гарантия уверенности в достоверности результатов при проведении клинических испытаний.



4. Методи досліджень в патології

- Основной метод патологічної анатомії – розтин (аутопсія)
- Біопсія – (bios – життя, orpsis – зорове сприйняття):
 - Діагностична
 - Операційна
- Цитологічні дослідження
- Гістологічні дослідження
- Імуногістохімічний аналіз

Види препаратів фіксованих клітин

Зріз

- тонкі (товщина більше 1 мкм)
- полутонкі (товщина менше 1 мкм)
- Ультратонкі (товщина менше 0,1 мкм)

Мазок

- крові
- червоного кісткового мозку
- спинно-мозкової рідини
- слини
- з піхви
- та ін.

Відбиток

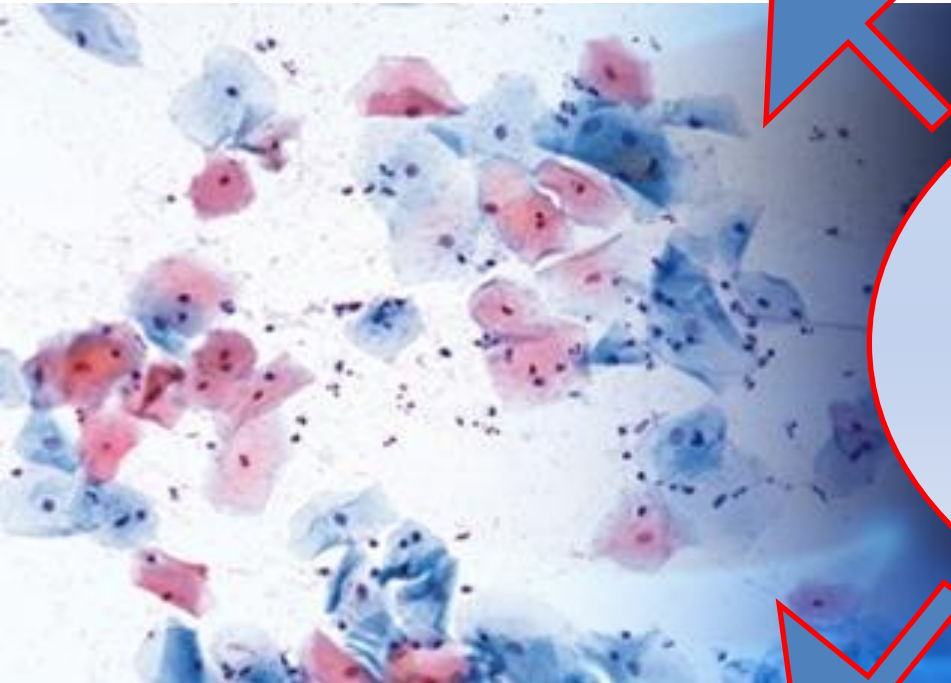
- селезінки
- тимуса
- печінки
- слизової оболонки сечового міхура
- слизової оболонки щоки
- та ін.

Плівка

- очеревини
- плеври
- м'якої мозкової оболонки
- сполучної тканини
- та ін.

**Клітинний
склад**

**Розташуванн
я клітин**

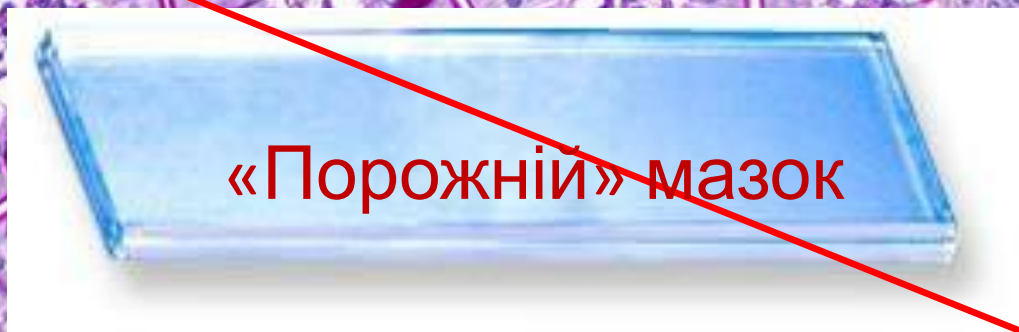


**Оцінка
цитологічного
матеріалу**

**Цитоморфологічні
особливості клітин**

Правильне виконання процедур взяття зразків і підготовки мазків біологічного матеріалу

підвищує точність морфологічної оцінки мікропрепаратів і, відповідно, діагностики пухлин і непухлинних уражень



Переваги цитологічного дослідження

- ❖ Мінімум обладнання (шприци та голки)
- ❖ Не потрібна анестезія і седативні препарати (як правило)
- ❖ Зразки отримують при мінімальному пошкодженні пухлини і навколишніх тканин
- ❖ За одну процедуру можна взяти зразки з декількох місць пухлини
- ❖ Препарати готують та забарвлюють швидко без використання спеціального обладнання



Види біопсій

- **пункційна** - матеріал отримують шляхом пункції спеціальною голкою через шкіру або через невеликий розріз в тканинах,
- **инцизійна (ексцизійна)** - висічення шматочка тканини,
- **аспіраційна** - аспірація вмісту порожнистого органу або порожнини шприцом або спеціальним інструментом,
- **трепанобіопсія** - забор кісткової тканини здійснюють спеціальним інструментом (трепан),
- **кюретаж** - вишкрібання порожнини кюреткою,
- **ендоскопічна** - проводиться прицільно, під контролем зору

Вимоги до відбору біологічного матеріалу для гістологічних досліджень

1. Свіжість матеріалу

2. Відбір матеріалу прицільний

3. Фіксація безпосередньо після відбору

4. Фіксатори (формалін 10%, спирт етиловий 96°)

5. Обсяг фіксуючої рідини 1:10

6. Правила транспортування



ключка





Лист-Заявка

Підприємство-замовник:

Адреса замовника:

П.І.Б. господаря тварини:

Вид тварини: _____; порода:

_____;

кличка: _____; вік: _____; стать: _____

Матеріал біопсійний, операційний (підкреслити).

Дата і вид операції:

Характер матеріалу:

(вказати орган, тканину та число об'єктів)

Клінічні дані: _____

(клінічна картина, тривалість захворювання з моменту появи перших ознак, при пухлинах – точна локалізація, темпи росту, розміри, консистенція, відношення до оточуючих тварин, стан регіонарних лімфатичних вузлів, метастази, спеціальне лікування, аналіз крові, результати УЗД; у сук і кішок – кількість вагітностей, тічок, характер їх протікання, початок і кінець останньої тічки тощо)

Он хрипел и умер, больше
ничего не знаю, давали: гистомогно-
ное перед этим.



Таблет.

Лабораторія патоморфології і паразитології

Лабораторія гістології і імуноцитохімії

Повний патологоанатомічний розтин

Класична гістологія, цитологія

Імуногістохімічна діагностика

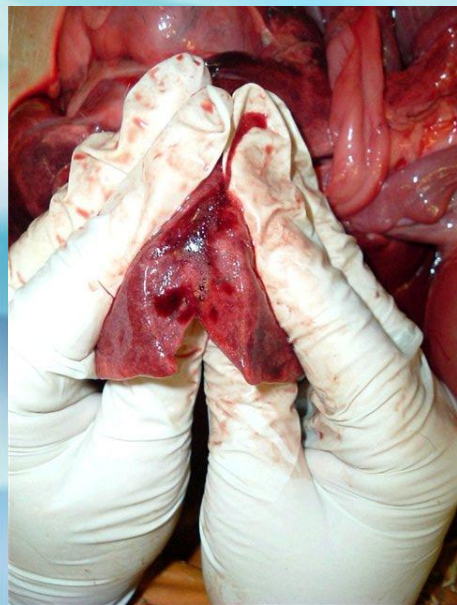
Мікроструктурний аналіз продукції і кормів

Комплексне паразитологічне дослідження

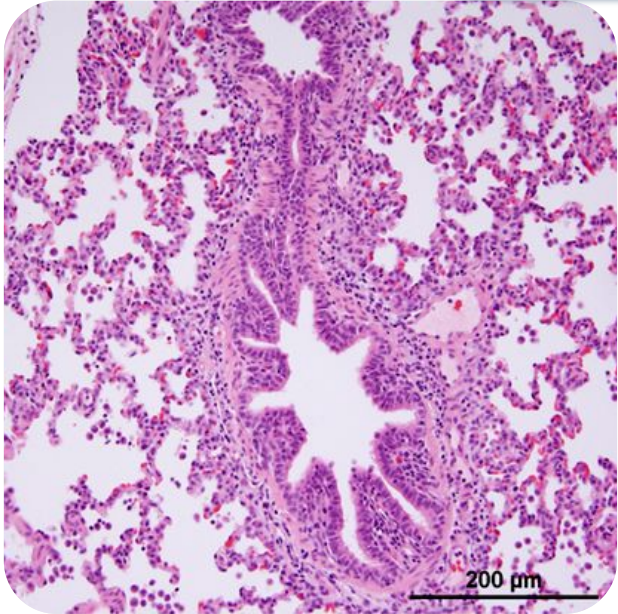


Патологоанатомічний розтин:

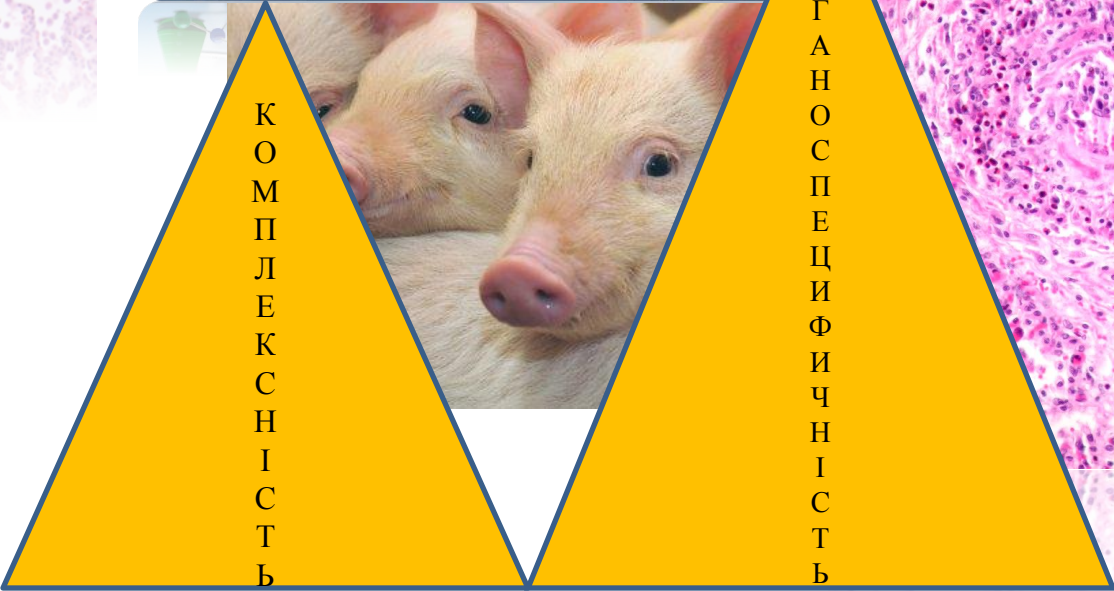
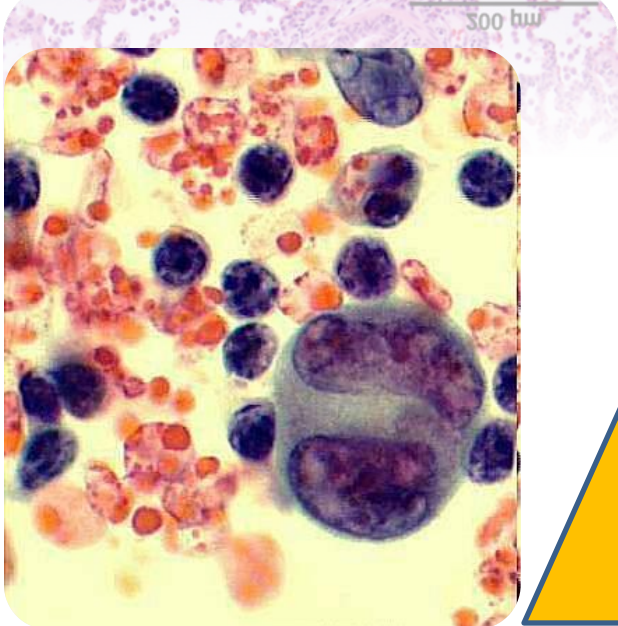
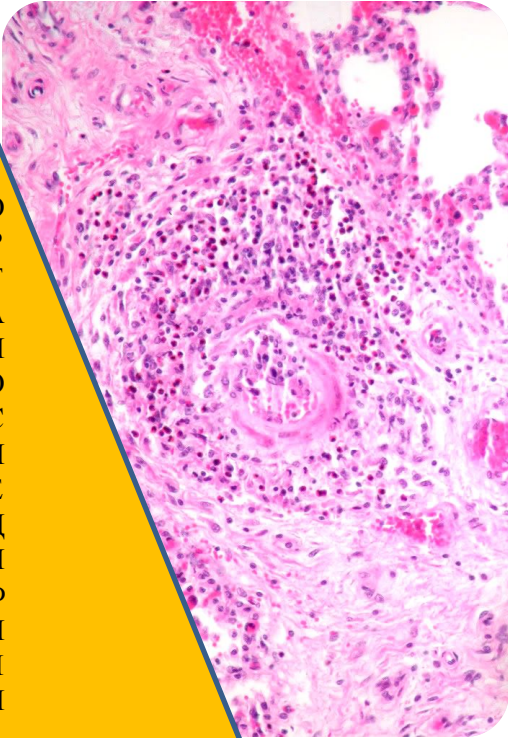
- характер макроскопічних прижиттєвих змін в органах на фінальному етапі розвитку хвороби
- причини смерті
- перевірка правильності і ефективності лікувально-профілактичних заходів
- проведення судово-ветеринарної експертизи



Класична гістологія і цитологія:



- мікроструктурні і біохімічні (цитохімічні) зміни в клітинах і тканинах
- встановлення тропизму збудника та оптимізація відбору зразків для його молекулярно-генетичного аналізу



Види мікротомів

ПОЛОЗКОВИЙ



виготовлення
парафінових
зрізів

ротаційний



виготовлення
серійних
парафінових
зрізів

кріостатний



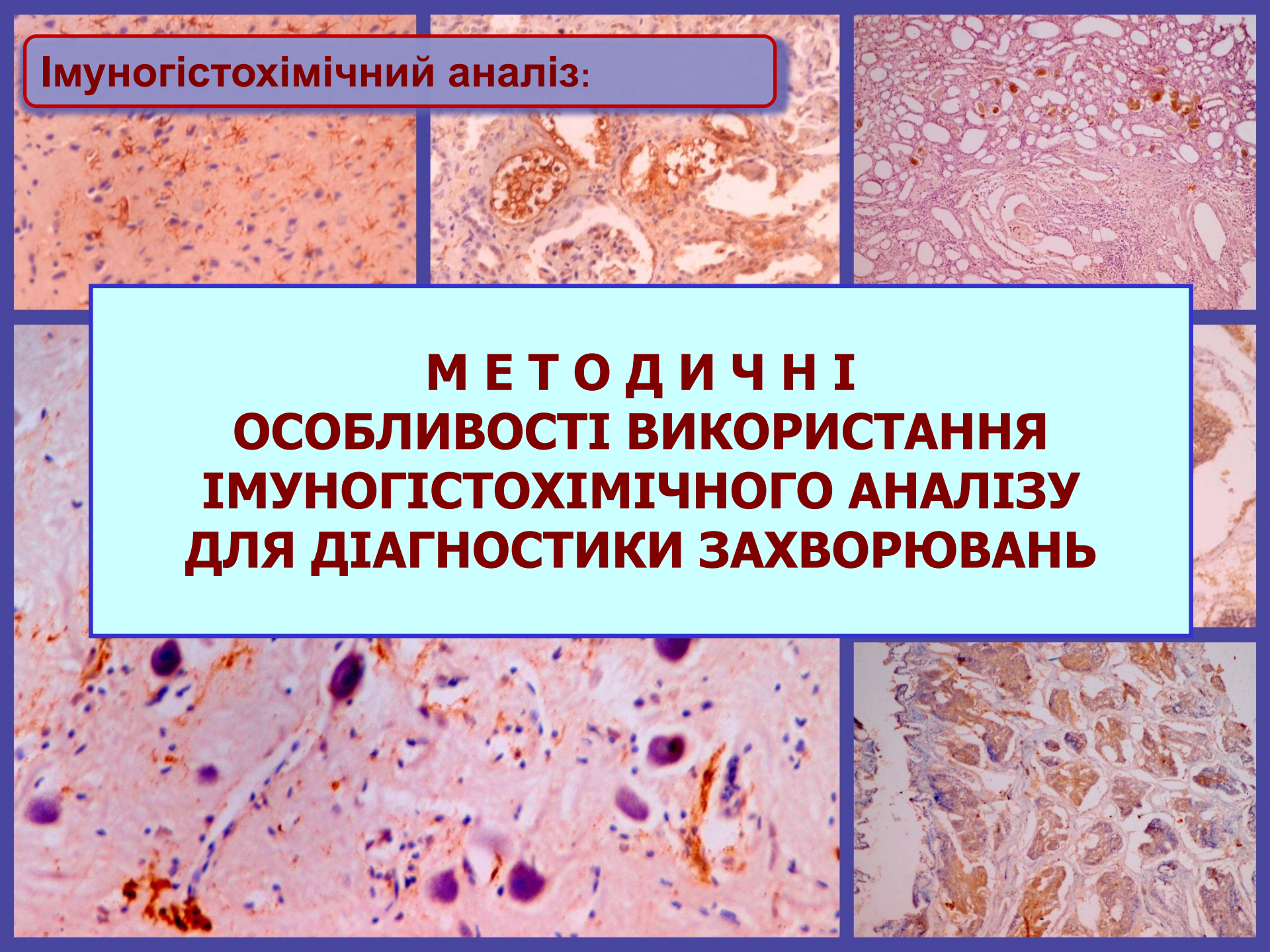
виготовлення
зрізів при
температурі
-20°C та нижче
для гистохімії та
імуноцитохімії

ЗОВНІШНІЙ ВИГЛЯД МИКРОТОМА



Імуногістохімічний аналіз:

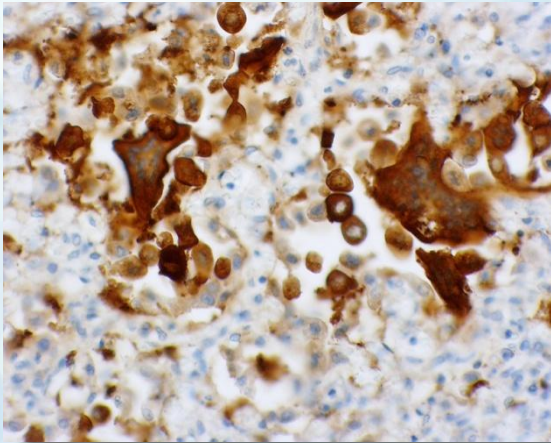
**МЕТОДИЧНІ
ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ
ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО АНАЛІЗУ
ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ**



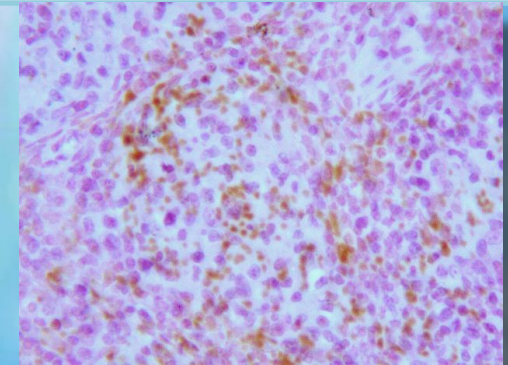
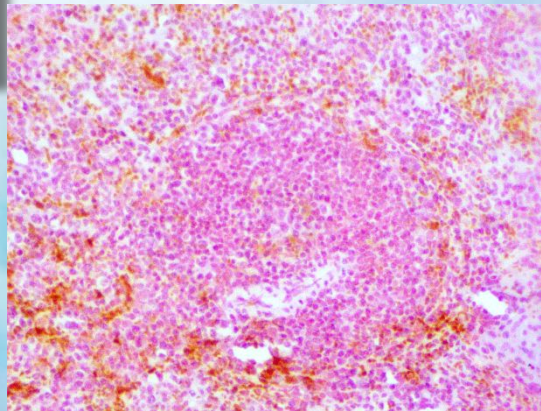
Імуногістохімічні методи

В основі є специфічна взаємодія тканинних і клітинних антигенів тварин або людини із спеціально отриманими антитілами, що несуть на собі різні мітки.

Імуногістохімія (імуноцитохімія):



- Виявлення та визначення точної локалізації антигенів збудників інфекційних захворювань в гістологічних зрізах в результаті їх реакції з міченими антитілами
- ідентифікація збудника в органах і тканинах

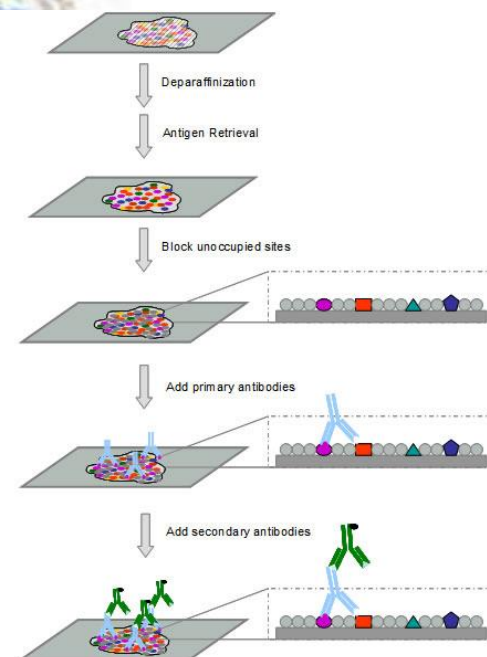
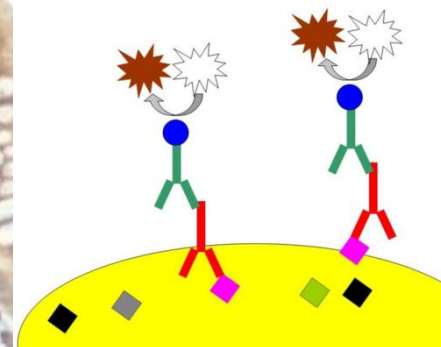
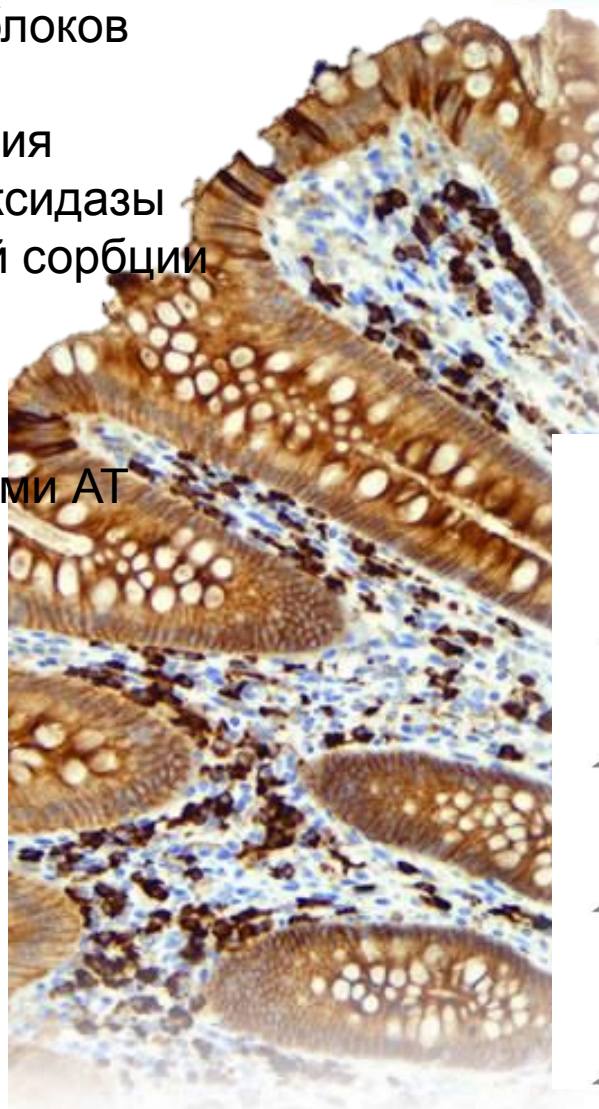


Позитивне імуногістохімічне забарвлення при цирковірусній хворобі свиней (PCVІІ)

Імуногістохімічна діагностика включає обов'язкове дослідження органів імунної системи (лімфатичний вузол, селезінка) та одного органа з урахуванням тропізму збудника інфекції (печінка, нирки, легені та ін.).

ЭТАПЫ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

1. Фиксация
2. Изготовление парафиновых блоков
3. Изготовление срезов
4. Депарафинизация и гидратация
5. Блокировка эндогенной пероксидазы
6. Блокировка неспецифической сорбции
7. Промывка (ФСБР)
8. Демаскировка АГ (МХО)
9. Промывка (ФСБР)
10. Инкубация со специфическими АТ
11. Промывка (ФСБР)
12. Инкубация с вторичными АТ
13. Промывка (ФСБР)
14. Визуализация (ДАБ)
15. Промывка (ФСБР)
16. Докраска гематоксилином
17. Дегидратация
18. Заключение срезов



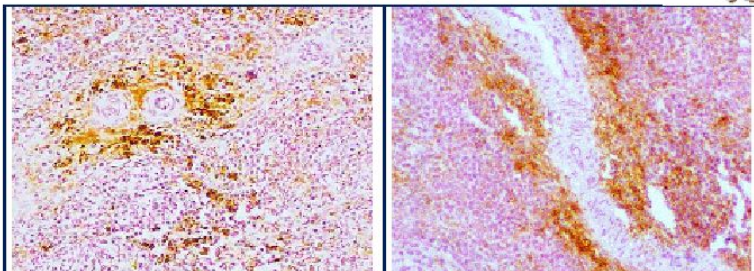


НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
БИОБЕЗОПАСНОСТИ И ЭКОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
РЕСУРСОВ АПК ДДАУ

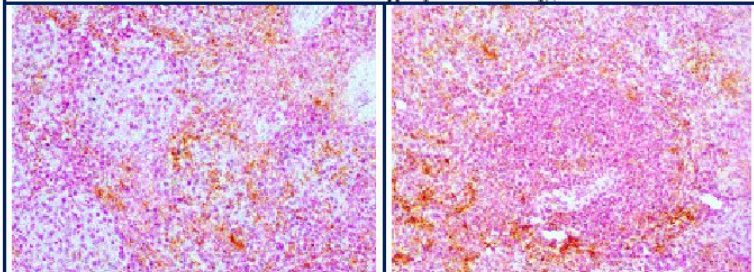
Фактический адрес: ул. Мандрыковская, 276, г. Днепропетровск, Украина, 49100
Юридический адрес: ул. Ворошилова, 25, г. Днепропетровск, Украина, 49600
тел./ факс: (0562) 36-17-14; www.biosafety-center.dp.ua; pipm@ua.fm

ОПТИМАЛЬНЫЕ ЦЕНЫ ПРИ ВЫСОКОМ КАЧЕСТВЕ И ПРОФЕССИОНАЛИЗМЕ «CREDE EXPERTO»

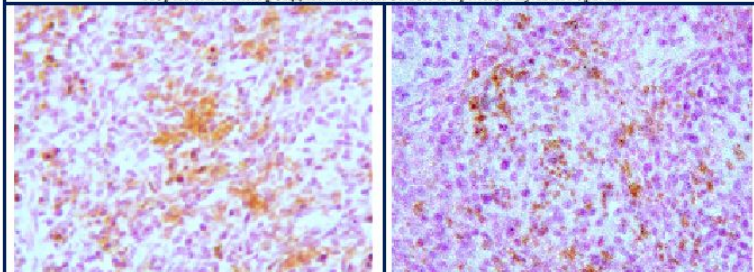
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ (PCV2)



Позитивное иммуногистохимическое окрашивание селезенки (x40)
Накопление антигена вокруг кровеносных сосудов



Позитивное иммуногистохимическое окрашивание селезенки (x100)
Поражение лимфоидных клеток белой и красной пульпы органа

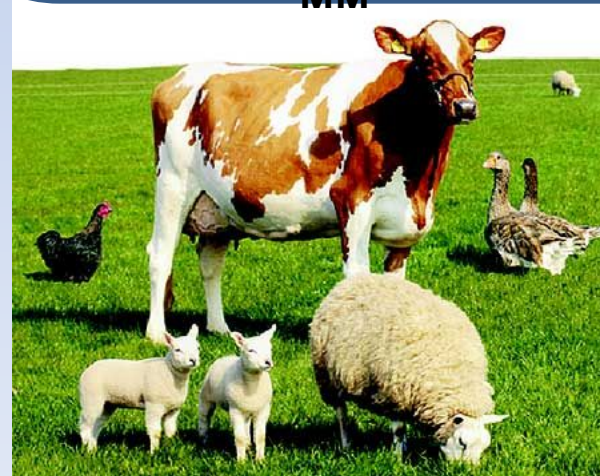


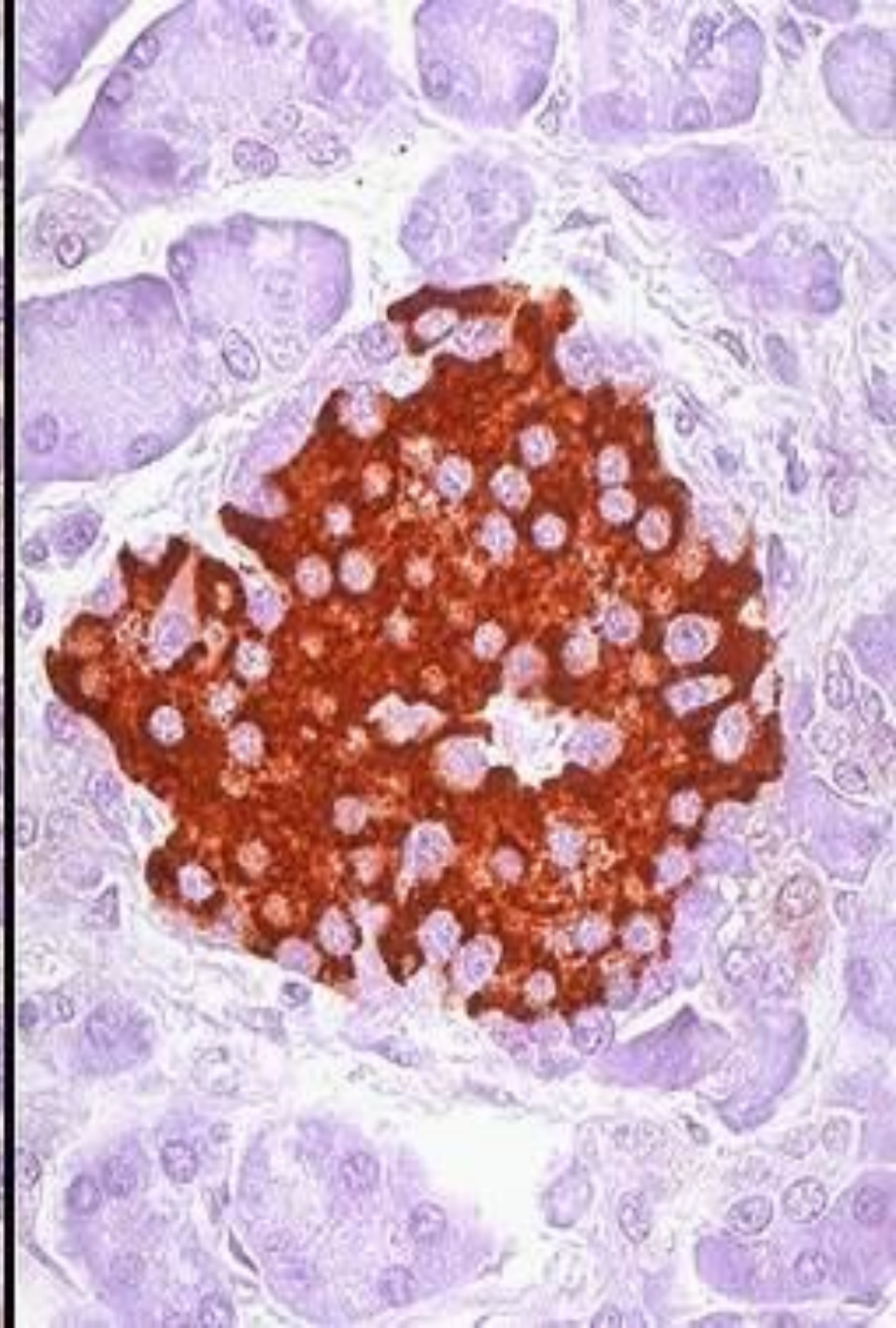
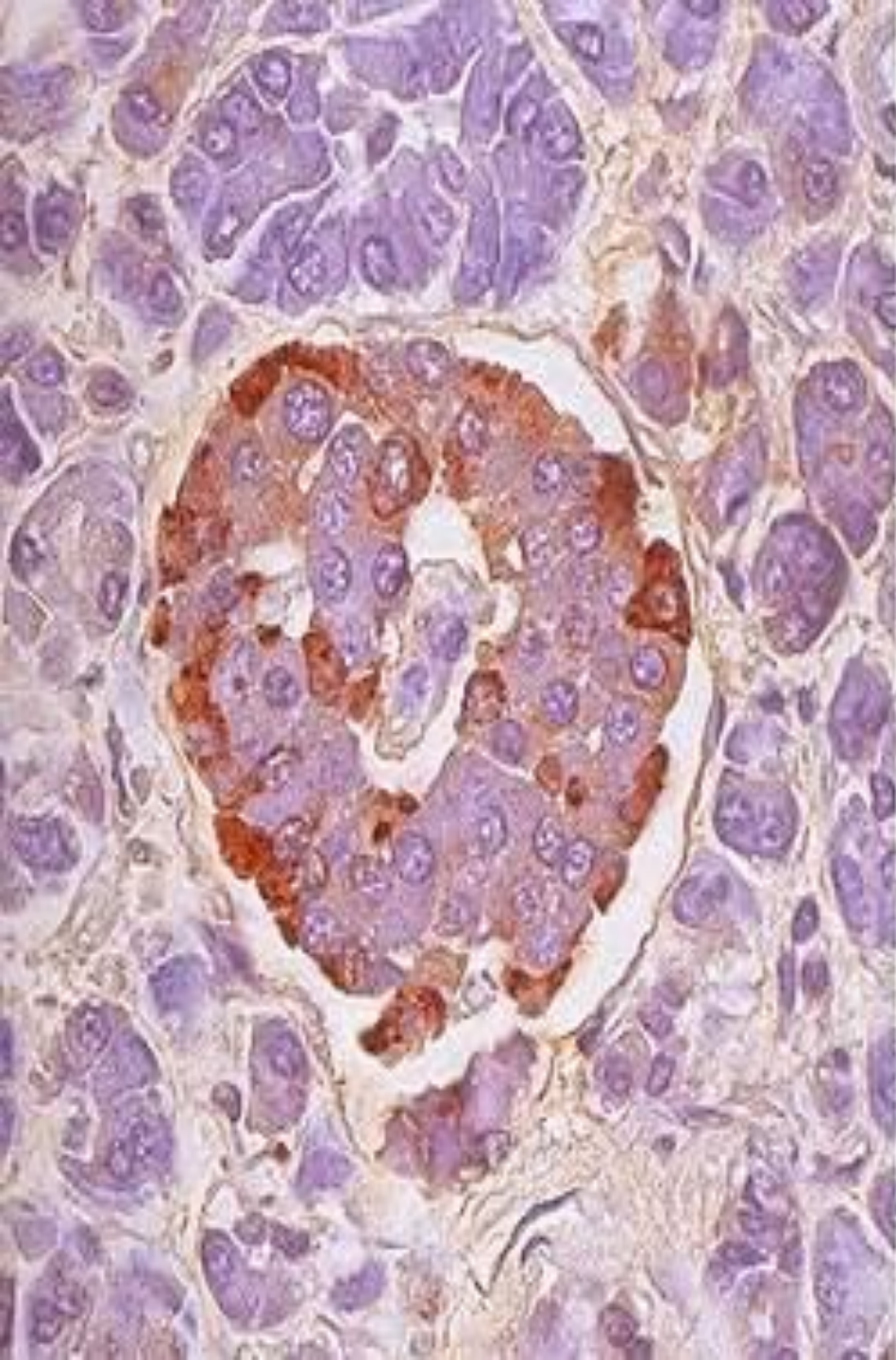
Позитивное иммуногистохимическое окрашивание селезенки (x400)
Внутрицитоплазматические включения в цитоплазме макрофагов

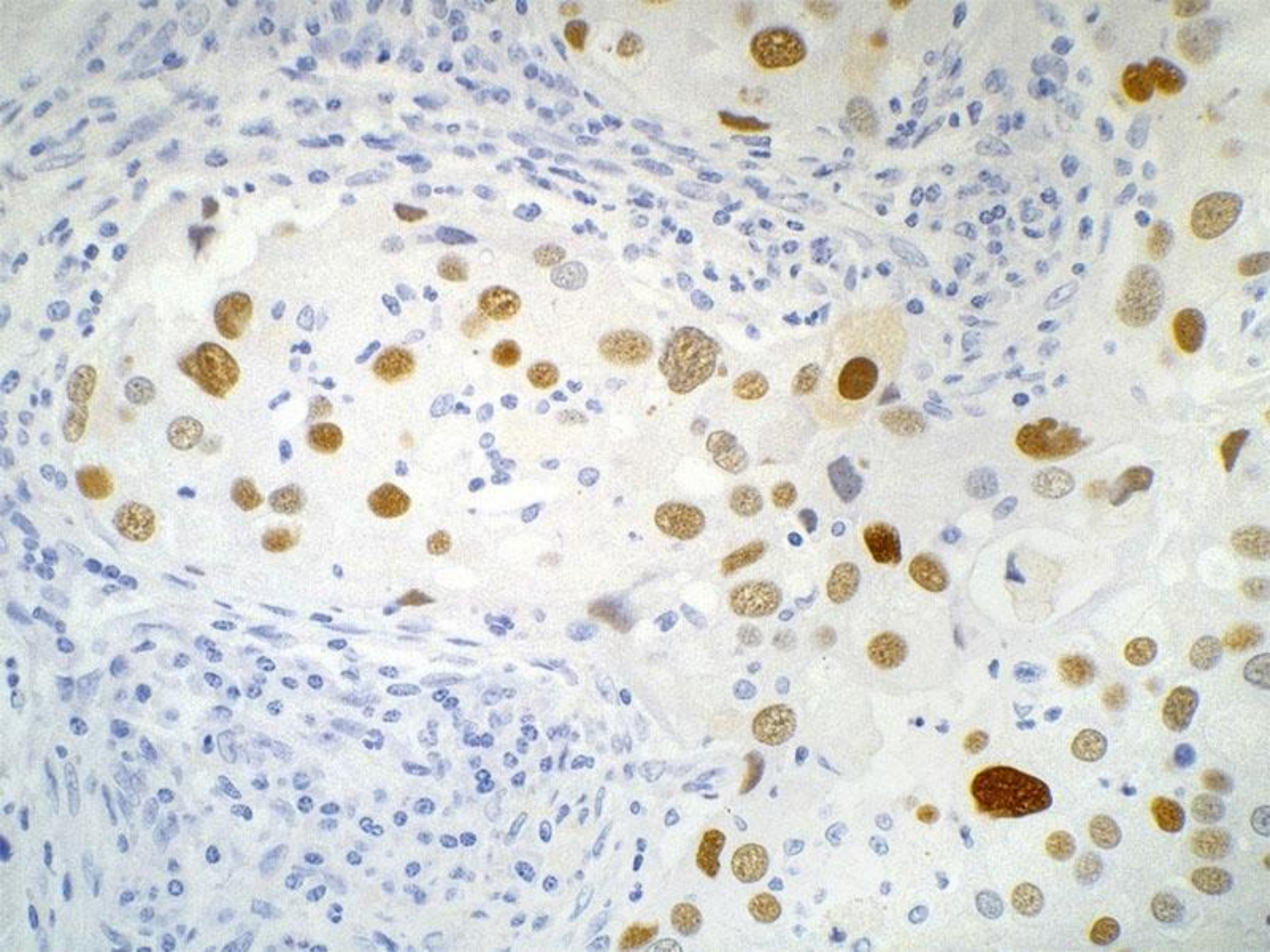
Для дослідження відбирають
фрагменти органів і у
нефіксованому охладженому
вигляді доставляють в
лабораторію.
Заморожування зразків
не бажане.

У випадках більш тривалого
транспортування матеріал
фіксують в 10%
нейтральному забуференому
формаліні.

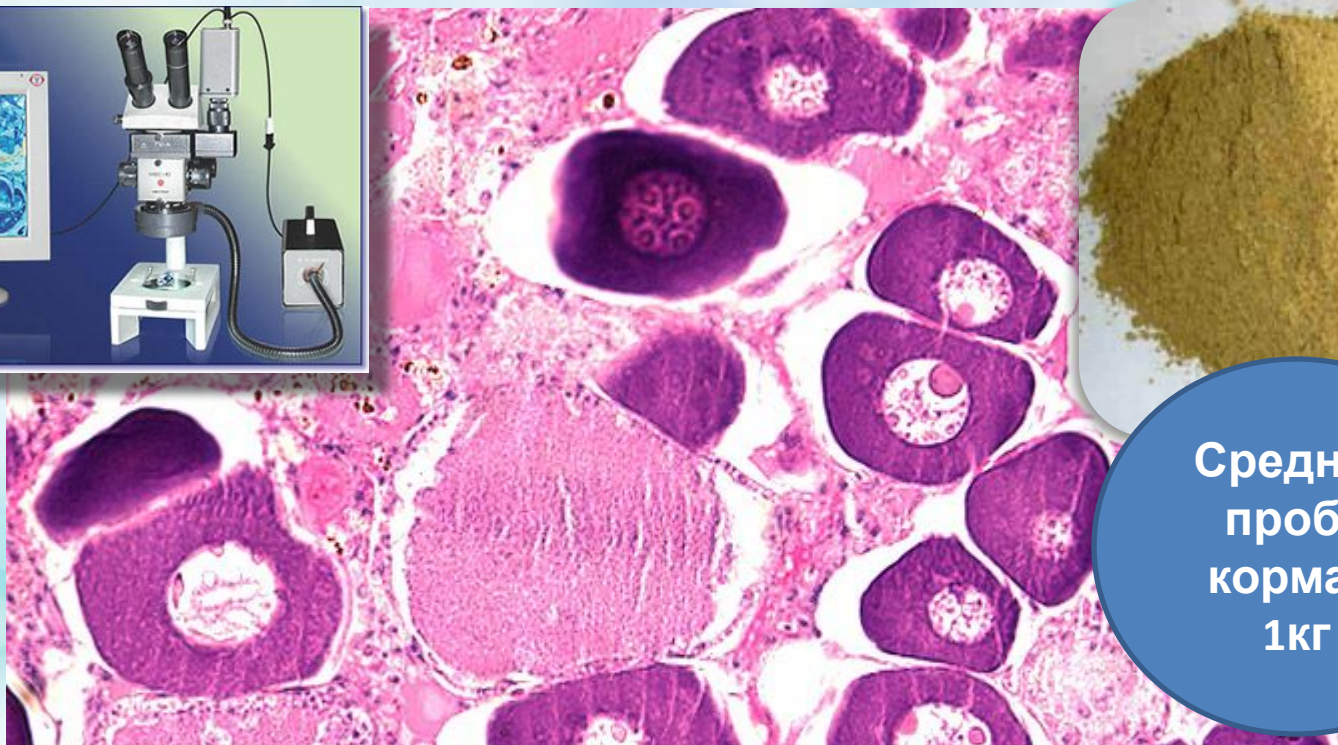
Розмір шматочків 10 мм x 5
ММ







Микроструктурное исследование кормов:

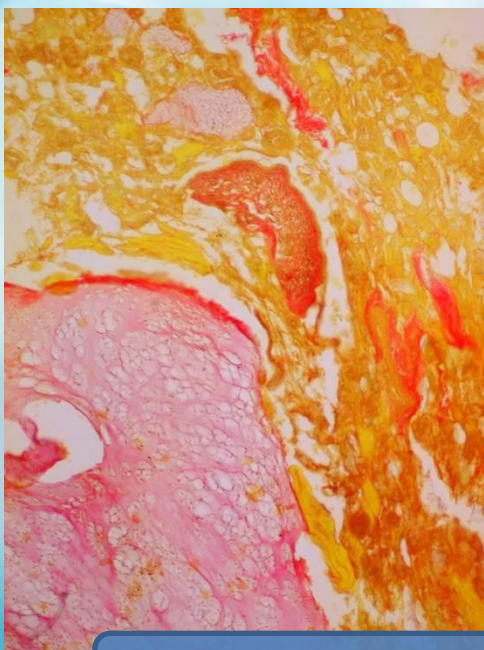


Средняя
проба
корма –
1кг

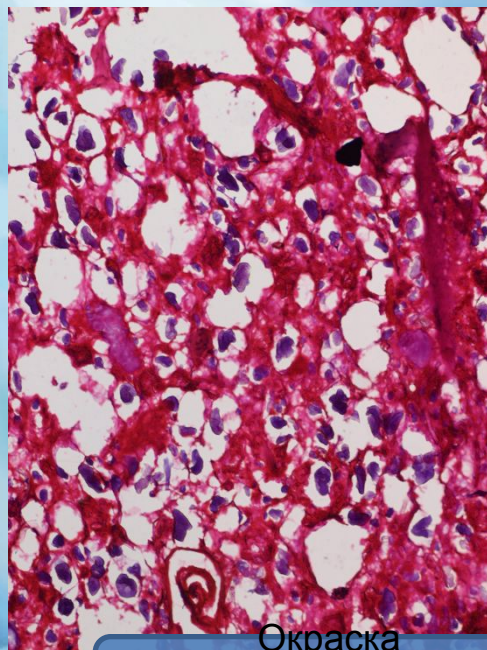
Для проверки структурных компонентов и выявления фальсификатов комбикормов, рыбной и мясокостной муки используется метод двухступенчатой микроскопии. Образец корма помещается под специальный микроскоп с компьютеризированной системой обработки изображения и рассматривается в различных диапазонах увеличения, что позволяет сделать точный анализ мельчайших частиц. Данная методика дает возможность со стопроцентной гарантией выявить фальсификацию и определить структурные компоненты кормов.

Микроструктурное исследование мясного сырья, полуфабрикатов, готовых мясных и комбинированных продуктов:

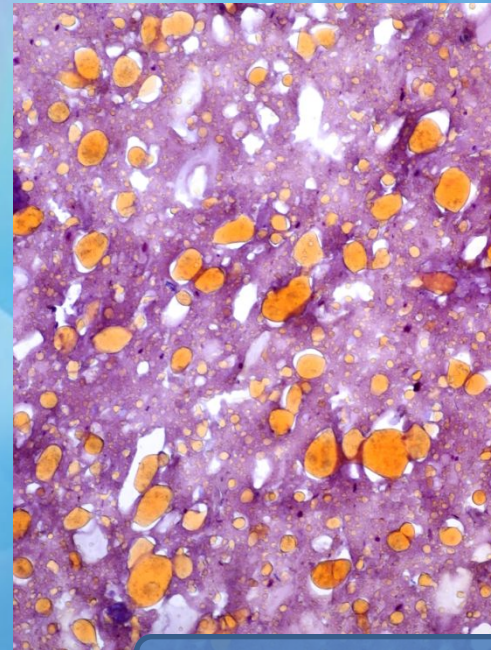
Определение свежести мяса, замороженного, засоленного мяса, количественный и качественный состав мясных изделий, выявление фальсификации и нарушения рецептуры.



Окраска по Ван-Гизон



Окраска гематоксилином и эозином



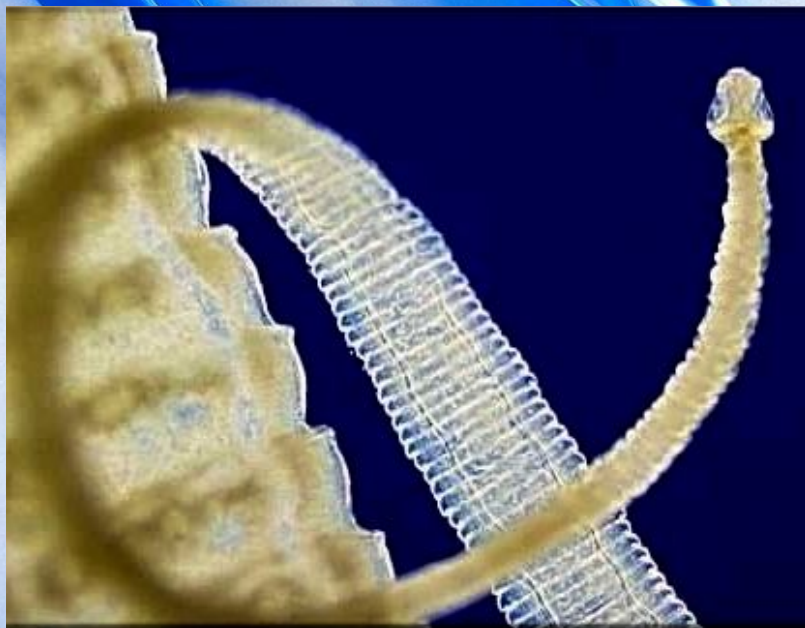
Окраска Судан III

ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



Диагностика инвазионных заболеваний

(трематодозы, цестодозы, нематодозы, протозоозы, энтомозы)



Комплексные исследования фекалий

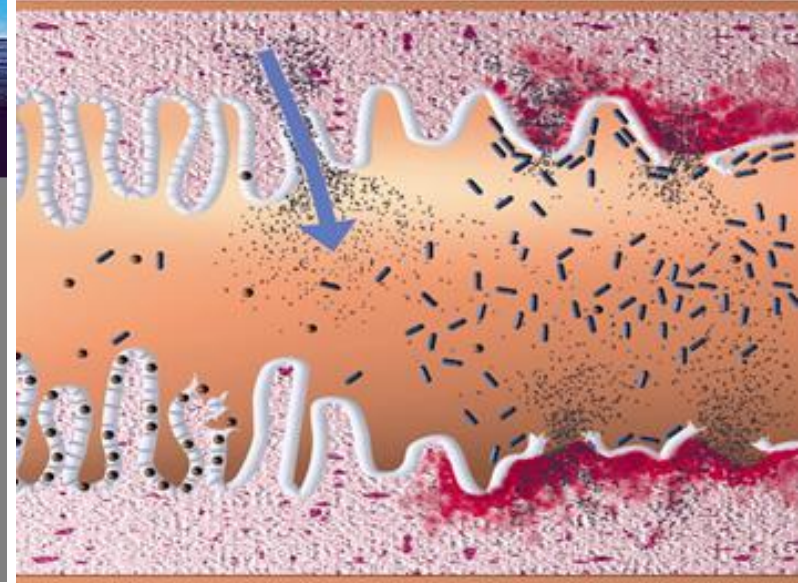
- физико-химические показатели
- микроскопическое исследование
- гельминтоовоскопия

Требования к отбору материала

1. Свежесть
2. Масса пробы 5-10г.
3. Выборка (10% поголовья одной возрастной группы)
4. Посуда для транспортировки
5. Сопроводительный документ



ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



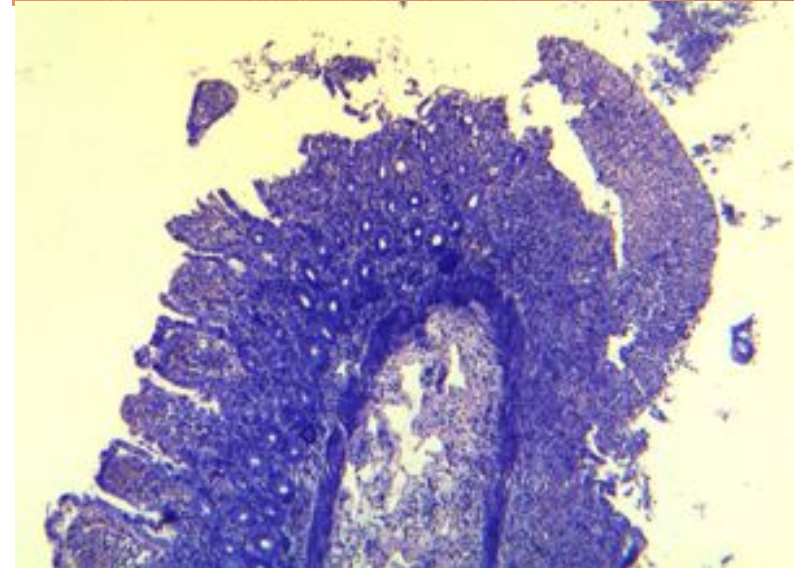
Экономический ущерб

Снижение привесов

Снижение продуктивности

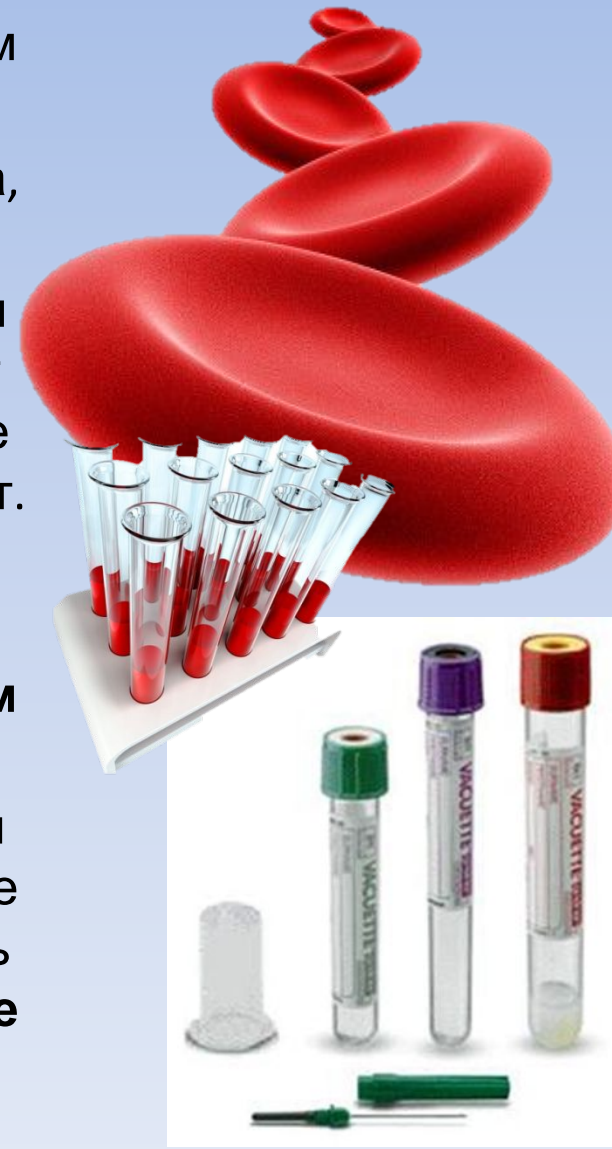
Снижение конверсии корма

Падеж



Исследование биологических субстратов и органов животных

- **Кровь** отбирают одноразовым шприцом вместимостью 5-10 мл.
- Переливать кровь по стенке пробирки без напора, создаваемого шприцом.
- С целью получения крови для морфологических исследований применяют антикоагулянты либо специальные вакуумные системы отбора крови, содержащие антикоагулянт.
- ЭДТА-натрий или ЭДТА-калий (0,5 мл 1,5% раствора на 10 мл крови).
- **Необходимый для проведения анализа объем крови – 2 мл.**
- Подсчет количества форменных элементов и концентрации гемоглобина допускается в течение суток. При длительной транспортировке кровь передается в термосе со льдом. **Замораживание не допускается.**



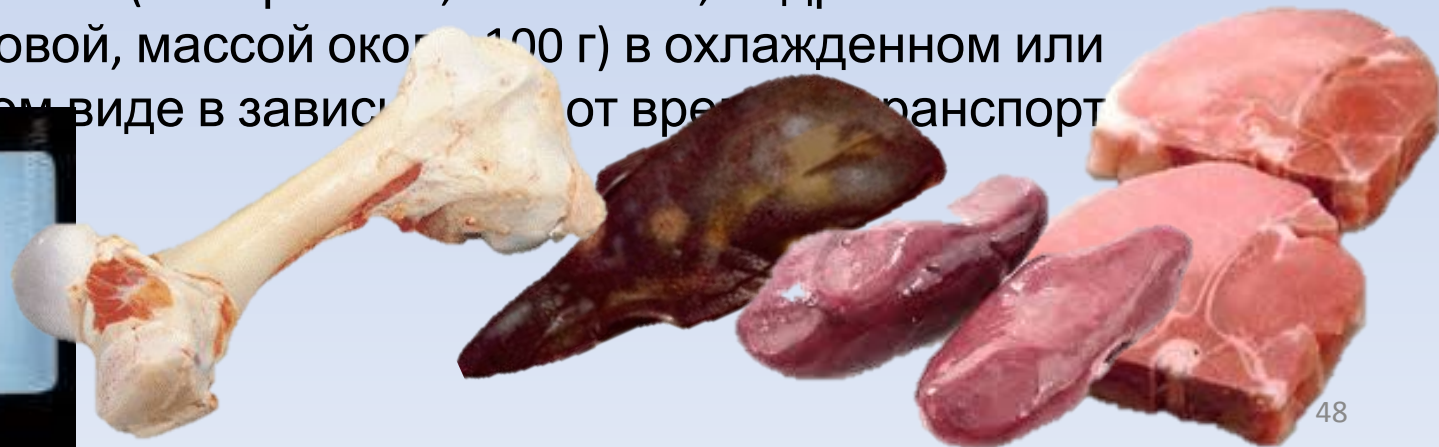
Исследование биологических субстратов и органов животных

- Для биохимических исследований используют сыворотку и плазму крови.
- **Сыворотка:** кровь без коагулянта ставят в пробирке в теплое место ($37-38^{\circ}\text{C}$); после сворачивания крови ее обводят по краю пробирки длинной иглой, а через несколько часов сыворотку отбирают пипеткой и сохраняют в холодильнике.
- **Плазму** получают центрифугированием при 2-3 тысячах оборотов в минуту стабилизированной гепарином (5-10 ЕД/мл) крови. Необходимый для проведения биохимических исследований объем сыворотки или плазмы крови составляет от 2 до 10 мл в зависимости от перечня необходимых показателей.



Исследование биологических субстратов и органов животных

- **Паренхиматозные органы (печень, почки) или образцы мышечной ткани** для проведения химического и токсикологического анализа отбирают от свежеспавшего (забитого) животного. Для исследования направляют образцы органов массой **не менее 50 г** от каждого животного, а также мышечную ткань в том же количестве, отобранную из ягодичной группы мышц. В случае, если пересылка материала требует длительного времени, отобранные образцы замораживают при температуре **-20°C** и направляют в замороженном виде с хладагенами.
- При отборе **образцов кости** для исследования направляют эпифизы трубчатых костей (как правило, плечевой, бедренной или большеберцовой, массой около 100 г) в охлажденном или замороженном виде в зависимости от времени транспорта.



Полимеразная цепная реакция

- метод определения конкретных последовательностей ДНК или РНК в любом биологическом образце
- ПЦР – это осуществляемая *in vitro* амплификация (т.е. увеличение числа копий) нуклеиновых кислот, инициируемая синтетическими олигонуклеотидными праймерами

ПРАВИЛА ОТБОРА И ТРАНСПОРТИРОВКИ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПЦР ИССЛЕДОВАНИЯ

СТАБИЛИЗИРОВАННАЯ КРОВЬ

Для ПЦР исследования кровь отбирают в объеме **не меньше 1 – 1,5 мл** в стерильные шприцы или пробирки с 10% раствором ЭДТА (Трилон Б) из расчета 1:20 (0,5 мл стабилизатора и 10 мл крови). Закрытую пробирку или шприц с кровью несколько раз плавно переворачивают для тщательного смешивания стабилизатора с кровью, охлаждают до 2 - 8 °С и в этот же день доставляют в лабораторию.

Заморозка не допускается!!!



ПРАВИЛА ОТБОРА И ТРАНСПОРТИРОВКИ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПЦР ИССЛЕДОВАНИЯ

ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ И АБОРТИРОВАННЫЕ ПЛОДЫ С КУСОЧКАМИ ПЛАЦЕНТЫ

Образцы патологического материала и абортированных плодов с кусочками плаценты помещают в стерильные флаконы или пакеты, герметично их закрывают, складывают в общий полиэтиленовый пакет или коробку. Допускается разовая заморозка и хранение материала при температуре не выше минус 16 °С в течение 30 дней.



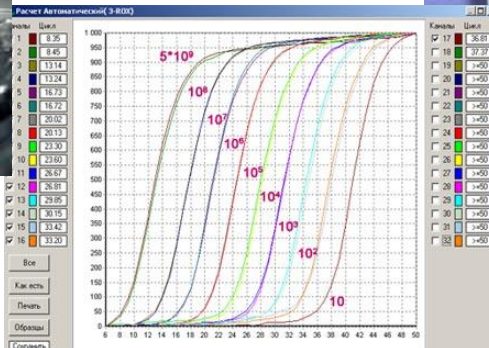
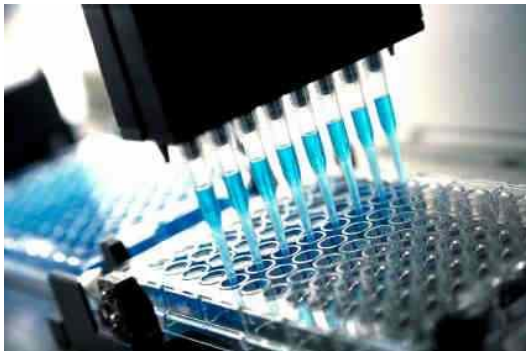
МОЧА

У животных отбирают утреннюю мочу в стерильные пробирки или флаконы (минимум 10 – 15 мл). Затем, в эти же флаконы вносят глицерин, с расчётом 10% от объёма мочи (к 10 мл мочи добавляют 1 мл глицерина). Пробирки герметично закрывают пробками и аккуратно перемешивают. Образцы охлаждают при температуре +2 – +8°C. Допускается разовая заморозка и хранение при температуре не выше минус 16 °С в течение 3-5 дней. Образцы помещаем в термос со льдом. Герметично запаковывают и транспортируют в лабораторию.

ПРАВИЛА ОТБОРА И ТРАНСПОРТИРОВКИ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПЦР ИССЛЕДОВАНИЯ

СМЫВЫ

Для отбора смывов нужно использовать стерильные ватные тампоны и пробирки объемом 1,5 – 2 мл или аппликаторы, в которые вносят 500 мкл стерильного физиологического раствора или раствора фосфатного буфера pH 7,2-7,4.



ПРАВИЛА ОТБОРА И ТРАНСПОРТИРОВКИ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПЦР ИССЛЕДОВАНИЯ

ФЕКАЛИИ

Фекалии отбирают в стерильные пластиковые контейнеры, охлаждают до 2 - 8 °С и в этот же день транспортируют в лабораторию. Допускается разовая заморозка и хранение материала при температуре не выше минус 16 °С в течение 30 дней.



ИМУНОХИМИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

ПРАВИЛА ОТБОРА И ТРАНСПОРТИРОВКИ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИФА ИССЛЕДОВАНИЯ



Для иммуноферментного анализа используют сыворотку крови

Кровь для исследования отбирают в объеме 4 – 5 мл в стерильные шприцы или пробирки **без антикоагулянта**. Желательно использовать одноразовые системы взятия крови с активатором свёртывания. Шприц или пробирку помещают в теплое место для отделения сыворотки крови, которую затем сливают в пробирку или оттягивают одноразовым шприцом, предупреждая попадание взвеси эритроцитов. Образцы охлаждают до +2 - +8 °С и в течение 24 ч транспортируют в лабораторию. С целью более длительного хранения, образцы сыворотки замораживают при температуре не выше -16 -20 °С.

Многократное замораживание и оттаивание образцов не допускается!!!

ПОСМЕРТНАЯ ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

- **Поражения респираторной системы:** легкие с сердцем (с перевязанными лигатурой сосудами или отдельно кровь из сердца в шприце), печень, селезёнка, лимфоузлы, целые трупы.
- **Поражения ЖКТ:** сердце (с перевязанными лигатурой сосудами или отдельно кровь из сердца в шприце), печень, селезёнка, лимфоузлы, трубочки кисти, целые



Упаковка и транспортировка патологического материала

- Отбор производится как можно быстрее после гибели животного
- Упаковывается в водонепроницаемую тару
- Замораживается для длительной транспортировки
- Если возможна быстрая доставка – обкладывается хладагентами



Витальная диагностика бактериальных болезней

- **Респираторные болезни** – отбирают мазки из носовой полости свабами.
- **Поражения ЖКТ** – отбирают мазки из прямой кишки свабами, фекалии в стерильном пластиковом стакане.
- **Метриты, баланопоститы** – мазки из половых органов свабами.
- **Маститы** – секрет поражённых долей в стерильном пластиковом стакане.



Упаковка и транспортировка биологического материала

- Мазки без транспортных сред и материалы в стерильной таре упаковывают с хладагенами



- Мазки с транспортными средами упаковывают без хладагенов

**Благодарю за
внимание!**