

УДК 636.7:616.993.192.6:57.086.13:612.111

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ АНЕМИЧНОГО СОСТОЯНИЯ СОБАК, БОЛЬНЫХ БАБЕЗИОЗОМ

Первушина О.А.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

В работе представлены результаты оценки клинической эффективности трансфузии криоконсервированных эритроцитов для собак больных бабезиозом. После переливания криоконсервированных эритроцитов и комплексной терапии наблюдался прирост количества гемоглобина, эритроцитов и уровня гематокрита, сопровождавшийся положительной динамикой в клиническом состоянии больных животных.

Ключевые слова: криоконсервированные эритроциты, бабезиоз, гемотрансфузия, гемолиз, клинический анализ крови.

Лечение переливанием крови в ветеринарии за последние годы пережило быстрый рост, особенно у домашних животных, и некоторые исследования документально подтвердили его пользу при ряде гематологических заболеваний [1]. В последние годы бабезиоз (пироплазмоз) собак приобретает все более массовый характер – расширяется как география этого опаснейшего заболевания, так и уровень заболеваемости. Пироплазмоз – кровепаразитарное заболевание, которое вызывается простейшими микроорганизмами *Babesia canis* (*Piroplasma canis*), и сопровождается анемией, желтушностью и красно-коричневой окраской мочи. Переносчиком возбудителя являются иксодовые клещи. При укусе клеща *Babesia* с. попадает в кровь собаки и начинает активно размножаться в эритроцитах, вызывая их разрушение. При этом высвобождается большое количество токсичных веществ, действие которых и обуславливает клиническую картину болезни. Выделяют две основные стадии заболевания: острую и хроническую. Первая протекает от 3 до 5 дней, вторая от 3 до 5 недель. Выделяют три основных этапа лечения пироплазмоза:

1. Применение антипротозойных препаратов (азидин, пиросан, пиро-стоп и т.д.), направленных на борьбу с кровепаразитом.

2. Вспомогательная терапия для поддержания организма в зависимости от нарушений общего состояния – применение гепатопротекторов, сердечных препаратов, витаминов.

3. Ощелачивающая терапия для восстановления работы почек.

Однако через несколько часов после применения антипротозойного препарата начинается гибель бабезий и массовое разрушение зараженных эритроцитов, впоследствии количество эритроцитов и гемоглобина уменьшается, а иногда и вовсе приводит к критическому состоянию общей картины красной крови [2]. Поэтому представляло интерес использовать криоконсервированные эритроциты для восстановления субнормального количества эритроцитов, гемоглобина и повышения уровня гематокрита.

Цель работы. Изучить эффективность переливания криоконсервированной эритроцитарной массы для коррекции состояния собак больных пироплазмозом.

Материалы и методы. У собаки донора кровь забирали из плечевой вены путем венопункции.

Манипуляции с животными проводили согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г.). Собака-донор соответствовала следующим требованиям [6, 10]:

Вес составлял 25 кг. Возраст от 5 лет. Спокойный характер. Гематокрит 40%. Регулярная вакцинация против основных инфекционных болезней, таких, как чума, инфекционный гепатит, лептоспироз, парвовирусная инфекция и бешенство. Клинически здорова.

Кровь заготавливали на глюкозо-цитратном консерванте и хранили не более 4 часов при 40°C до проведения экспериментов. Эритроциты осаждали центрифугированием при 750 g 5 мин. После удаления плазмы эритроциты трижды промывали 5-кратным объемом изотонического солевого раствора (150 mM NaCl, 10 mM трис – HCl, pH 7,4).

Для криоконсервации эритроцитов использовали криопротектор гидроксипропилкрахмал (ГЭК) в 17,5% концентрации. Раствор криопротекторов смешивали с эритроцитарной массой (ЭМ) в соотношении 1:1 и выдерживали 30 мин при 22°C. Замораживание осуществляли в микротюбиках «EPENDORFF» объемом 5 мл и 2 мл. Размораживание проводили на водяной бане (40-42°C).

ГЭК относится к группе непроницающих криопротекторов и не требует удаления после размораживания, однако, нами было проведено отмывание эритроцитов от криопротектора путем серийного центрифугирования для улучшения реологических свойств эритроцитов, используя только 1 этап. К суспензии размороженных эритроцитов добавляли равный объем 0,6 M раствора NaCl. Гематокрит определяли путем центрифугирования на гематокритной центрифуге (ELMI CM-70).

Расчет необходимого количества эритроцитов для гемотрансфузии проводили по формуле [14]:

$$K \times MT \times \frac{HbT - HbP}{HbD}$$

где K – постоянный коэффициент (K=70); MT – масса тела реципиента(кг), HbT (г/л) – требуемый гемоглобин для реципиента, HbP (г/л) – гемоглобин реципиента, HbD (г/л) – гемоглобин донора.

Переливание ЭМ, осуществлялось внутривенным путем при помощи специальной системы для переливания крови и внутривенного катетера. ЭМ предварительно была согрета до 37°C, а так же разведена 1:1 физиологическим раство-

ром NaCl, гематокрит которой составлял 45%. (Согласно инструкции по применению компонента крови № 164 от 05.07.99 г.).

Основными критериями эффективности применения ЭМ служили показатели прироста гемоглобина, гематокрита, общего количества эритроцитов.

Клинический анализ крови выполнен на автоматическом гематологическом анализаторе «Abacus Vet»; биохимический – на полуавтоматическом биохимическом анализаторе «Chiron Diagnostics LTD»

Для оценки достоверности различий между группами использовали критерий Манна-Уитни, считая достоверными различия с уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения. У собак, как признано, естественно возникающие антитела являются очень редкими и, если они присутствуют в сыворотке, то в низких титрах или вступают в реакцию при температурах, отличных от температуры тела. Именно вследствие этих иммуногематологических особенностей крайне редко встречается реакция на первую трансфузию при переливании собаке несовместимой крови [10, 11]. Поэтому были проведены гемотрансфузии без предварительного определения групп крови.

Проанализированы 20 историй болезней собак, заражённых *Babesia canis*. Из них 6 случаев были с легкой степенью заболевания и 4 – с тяжелой. Обе подгруппы были сопоставимы по массе тела и объему ЭМ на момент выполнения трансфузии: средняя масса тела собак в подгруппе на ранней стадии заболевания составила 21,1 кг \pm 450,7 г, а в подгруппе на поздней стадии – 18,9 кг \pm 279,9 г ($p > 0,05$); объем переливаемой ЭМ первой подгруппе в среднем составила 217,8 \pm 9,3 мл, во второй подгруппе – 315 \pm 7,7 мл ($p > 0,05$). Скорость внутривенной трансфузии в первые 30 минут не превышала 0,25 мл/кг массы тела, дальнейшее увеличение скорости введения ЭМ проводили постепенно до 5 мл/кг каждый час в течении 4 часов, однократно. Для контроля была сформирована группа из клинически здоровых животных с той же массой тела и возрастными границами.

Таблица 1

Общий клинический анализ крови у здоровых собак, собак-доноров

Показатель	Обозначения	Среднее значение для здоровых собак (контроль)	Собаки-доноры
Эритроциты	1012/л	5.5–8.5	7.46 \pm 0,87
Гемоглобин	г/л	120–180	157 \pm 1,09
Гематокрит	%	39–56	54.2 \pm 1,10
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците	%	32–38	34 \pm 1,11
Среднее содержание гемоглобина в эритроците	пг	18–28	25.0 \pm 0,98
Средний объем эритроцита	фл	60–75	72.7 \pm 0,89

Для специфического лечения бабезиоза собак во всех опытных группах использовали однократно, внутримышечно антипротозойный препарат Пиро-Стоп (в 1 мл содержит имидокарба дипропионат – 120 мг) в дозе 0,25 мл/кг массы тела животного.

В качестве симптоматической терапии всем опытным животным назначали сульфокамфокаин, Эссенциале, рибоксин, цианкобаламин, фуросемид, папаверин, Феррум Лек, гамавит. Дозы препаратов подбирали для каждого животного индивидуально в зависимости от массы тела, курс составлял 5 дней. Однако для усиления эффекта лечения собакам спустя сутки переливали криоконсервированную кровь.

За животными велось наблюдение в течение 10 дней, оценивали общее состояние и клинический анализ крови.

Ранее нами было установлено, что гидроксизилкрахмал (ГЭК) в 17,5% концентрации обладает высоким криозащитным действием для эритроцитов собаки [3]. ГЭК был выбран в качестве криопротектора так как он является производным крахмала, не токсичен, используется в качестве кровезаменителя. Кроме этого имеются литературные данные об успешном его применении в качестве криопротектора [15].

Из таблицы 2 видно, что у больных бабезиозом собак в двух подопытных группах происходило снижение уровня гемоглобина на 49–67,9%, эритроцитов на 67,2–90,5%. Такое значительное уменьшение этих показателей обусловлено внутрисосудистым гемолизом эритроцитов и появлением антиэритроцитарных антител.

Уровень гематокрита снизился на 51,8–73,8%, по сравнению с контролем, и указывает на резкое уменьшение объема эритроцитов в объеме плазмы крови.

При этом из клинических симптомов (табл. 4) наблюдалось отсутствие аппетита, угнетение общего состояния (астеновегетативный синдром), повышение температуры тела, учащение пульса, его аритмичность. В некоторых случаях наблюдалась рвота, иногда с примесью желчи, а также признаки энтерита или энтероколита (жидкие каловые массы, выделяющиеся нерегулярно). Видимые слизистые оболочки сначала анемичны. На поздней стадии заболевания отмечали так же иктеричность слизистых оболочек, нарушение периодичности мочеотделения, гемоглинурия.

После первых суток специфической и симптоматической терапии в группе на ранней стадии заболевания происходило повышение уровня гемоглобина на 9,7%, эритроцитов на 15,7% и гематокрита на 12,3%, а к 10-м суткам гемоглобин вырос на 10,1%, количество эритроцитов увеличилось на 22,7% и уровень гематокрита повысился на 15%.

В группе подопытных животных на поздней стадии заболевания на фоне специфической и симптоматической терапии бабезиоза собак после первых суток происходило повышение гемоглобина на 21,1%, эритроцитов на 80% и уровня гематокрита на 11,3%. Однако из таблицы 2 видно, что уже к 10 суткам лечения происходит повышение количества гемоглобина на 16,3%, эритроцитов на 111% и уровень гематокрит вырос на 112%. Таким образом, данная схема лечения

хотя и активизировала эритропоэз, но его активности было недостаточно, чтобы и на 10-е сутки после лечения компенсировать признаки микроцитарной гипохромной анемии средней тяжести. Поэтому в данную схему лечения бабезиоза для коррекции гемолитической анемии спустя сутки было проведено переливание эритроцитарной массы больным собакам, однократно.

Как видно из данных, представленных в таблице 3, в первой группе животных после лечения и гемотрансфузии ЭМ уровень гемоглобина и гематокрита вырос соответственно на 11,4 и 16,4%, а количество эритроцитов на 26,3%, однако уже к 10-м суткам уровень гемоглобина и гематокрита вырос на 12,5 и 28,6% соответственно, тогда как прирост эритроцитов составил 27%.

Следовательно, все показатели возросли в 2 раза, по сравнению с результатами, полученными после специфического лечения без гемотрансфузии.

Во второй группе больных животных после первых суток лечения в комплексе с гемотранс-

фузией наблюдалось повышение уровня гемоглобина и гематокрита на 24,6 и 14,9% соответственно, тогда как количество эритроцитов возросло на 83,6%. К 10-м суткам после начала курса лечения и трансфузии криоконсервированной ЭМ наблюдалось повышение уровня гемоглобина и гематокрита на 16,4 и 24,7% соответственно, тогда как прирост эритроцитов составил 113%.

Следует отметить, что клинические признаки у собак больных пироплазмозом после специфического лечения, симптоматической терапии и гемотрансфузии криоконсервированной ЭМ в двух подопытных группах постепенно исчезают и приходят в физиологическую норму к 10-м суткам курса терапии (табл.4).

Полученные данные, свидетельствуют, что комплексная схема лечения бабезиоза должна содержать не только препараты, способствующие уничтожению возбудителя и детоксикации организма, но и при необходимости включать в себя гемотрансфузию и лекарственные средства, корректирующие анемию.

Таблица 2

Клинический анализ крови больных собак до и после лечения Пиро-Стоп

Показатель	Контрольная группа	Подопытные группы животных					
		Первая (ранняя стадия) заболевания			Вторая (поздняя стадия) заболевания		
		До лечения	1-е сутки	10-е сутки	До лечения	1-сутки	10-е сутки
Гематокрит (Ht), %	40,5±0,35	19,56±0,34	21,9±0,74*	25,2±0,77	10,6±0,77*	11,8±0,61*	25,1±0,64
Гемоглобин (Hb), г/л	140,5±0,87	71,8±0,94	78,8±1,81*	86,8±1,91*	45,40±0,28*	55±1,80*	64±0,154
Эритроциты (RBC), 10 ¹² /л	5,86±0,82	1,9±0,09	2,2±0,09*	2,7±0,09*	0,55±0,09*	0,99±0,10*	2,09±0,21
Среднее содержание Hb в эритроците (MCH), Пг	24,09±0,25	37,7±0,21	35,8±0,19*	32±0,94	82,9±0,23*	55,5±0,21*	41,6±0,21
Средняя концентрация Hb в эритроците (MCHC), %	34,7±0,55	36,8±0,28	36±0,25*	34,4±0,24	43±0,28*	46,6±0,41*	34,6±0,44
Средний объём эритроцита (MCV), мкм ³	69,5±0,64	102,6±0,98	99,5±1,02*	93,3±1,06	192±0,94*	119±0,43*	120±0,78

* - $p < 0,05-0,001$ по отношению к показателям в контрольной группе

Таблица 3

Клинический анализ крови больных собак до, после лечения и гемотрансфузии

Показатель	Контрольная группа	Подопытные группы животных					
		Первая (ранняя стадия) заболевания			Вторая (поздняя стадия) заболевания		
		До лечения	1-е сутки	10-е сутки	До лечения	1-сутки	10-е сутки
Гематокрит (Ht), %	40,5±0,35	19,56±0,34	22,7±0,74*	29,2±0,77	10,6±0,77*	12,18±0,61*	15,1±0,64
Гемоглобин (Hb), г/л	140,5±0,87	71,8±0,94	80,03±1,81*	90,1±1,91*	45,40±0,28*	56,6±1,80*	65,9±0,154
Эритроциты (RBC), 10 ¹² /л	5,86±0,82	1,9±0,09	2,4±0,09*	3,03±0,09*	0,55±0,09*	1,01±0,10*	2,15±0,21
Среднее содержание Hb в эритроците (MCH), Пг	24,09±0,25	37,7±0,21	33,3±0,19*	29±0,94	82,9±0,23*	57,1±0,21*	30,6±0,21
Средняя концентрация Hb в эритроците (MCHC), %	34,7±0,55	36,8±0,28	35,2±0,25*	30,01±0,24	43±0,28*	46,7±0,41*	32,7±0,44
Средний объём эритроцита (MCV), мкм ³	69,5±0,64	102,6±0,98	94,5±1,02*	96,3±1,06	192±0,94*	122,2±0,43*	93,4±0,78

* - $p < 0,05-0,001$ по отношению к показателям в контрольной группе

Таблица 4

Клинические признаки собак зараженных бабезиозом до и после лечения и переливания ЭМ

Симптомы	До лечения		После лечения и переливания ЭМ	
	Ранняя стадия	Поздняя стадия	Ранняя стадия	Поздняя стадия
Угнетение общего состояния	+	+	-	-
Потеря аппетита	+	+	-	-
Повышение температуры тела	+	+	-	-
Аритмия	+	+	-	-
Рвота	+	+	-	-
Симптомы энтерита	+	+	-	-
Анемичность слизистых оболочек	+	+	-	-
Иктеричность слизистых оболочек	-	+	-	-
Гемоглобинурия	-	+	-	-

Примечание: «+» – клинический признак присутствует; «-» – клинический признак отсутствует

Выводы: 1. Таким образом, представленные данные позволяют подтвердить эффективность трансфузий криоконсервированной эритроцитарной массы в коррекции заболевания пироплазмозом у собак на ранней и тяжелой стадии заболевания.

2. В обоих случаях прирост лабораторных показателей сопровождался положительной клинической динамикой – отмечалась нормализация

и стабилизация показателей артериального давления, частоты сердечных сокращений и частоты дыхания.

3. Переливание криоконсервированной эритроцитарной массы можно использовать в комплексе лечения со специфической и симптоматической терапией для восстановления ОЦК и стимуляции эритропоэза.

Список литературы:

1. Бернард Ф. Фелдман. Рекомендации по переливанию крови // Современный курс ветеринарной медицины Кирка. – Аквариум, 2005 г.; стр. 461-465.
2. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману // Практика, 2006. – 1648 с.
3. Первушина О. А., Денисова О. Н., Жегунов Г. Ф. Влияние криопротекторов и криоконсервирования на сохранность эритроцитов домашних животных // Биофизика живой клетки. Криоконсервация генетических ресурсов / Материалы международной конференции. – Пуццино. – 2014. – С. 143-145.
4. Санин А. В. Бабезиоз собак – новое решение старой проблемы / А. В. Санин, И. К. Васильев // Зооиндустрия. – 2007. – № 7. – С. 19.
5. Уркхарт Г. Ветеринарная паразитология / Г. Уркхарт, Д. Эрмур, Д. Дункан // М.: Аквариум ЛТД, 2000. – 352 с.
6. Authement J. M., Wolfsheimer K. J. and Catchings S. Canine blood component therapy: product preparation, storage, and administration. Journal of the American Animal Hospital Association, 1987;23: 483-93.
7. Bell K. The blood groups of domestic mammals. Agar N. S. and Board P. G. (eds). Red Blood Cells of Domestic Mammals. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 1983, 163-164.
8. Clapisson G. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulphoxide (DMSO) gives better results than only DMSO / Clapisson G. // Bull Cancer. – 2004. – Vol. 91, № 4. – P. E 97-102.
9. Chabanne L., Peyronnet L., Fournel C., Meyer F. and Rigal D. I gruppi sanguigni dei carnivori domestici. Trasfusioni e malattie emolitiche neonatali. – Summa, 1994. 11: 5-17.
10. Dodds W. J. Update on animal blood banking services. Veterinary Practice Staff, 1993, 5: 2-7.
11. Hohenhaus A. E. Transfusion medicine. Problems in Veterinary Medicine, 4. J. B. Lippincott, Philadelphia, 1992, p. 670.
12. Kim H., Tanaka S. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation // J Vet Med Sci. 2004 Dec; 66(12): 1543-1547.
13. Koch N. Massive hepatic necrosis associated with accidental imidocarb dipropionate toxicosis in a dog / N. Koch, P. Kelly // J. Comp. Pathol. – 1991. – Vol. 104. – № 1. – P. 113-116.
14. Lubas G. and Continanza R. Recenti acquisizioni sulle caratteristiche immunoematologiche del gatto e relative applicazioni nella clinica. Veterinaria, 1993, 7: 5-11.
15. Sputtek A. Method for freezing red blood cells for transfusion using hydroxyethyl starch (HES) / Meuser D., Kuhn P. // Cryobiology. Pellerin-Mendes C. – P. 544-545.

Первушина О.А.

Харківська державна зооветеринарна академія

**ЗАСТОСУВАННЯ КРИОКОНСЕРВОВАНИХ ЕРИТРОЦИТІВ
ДЛЯ КОРЕКЦІЇ АНЕМІЧНОГО СТАНУ СОБАК, ХВОРИХ НА БАБЕЗІОЗ****Анотація**

У роботі представлені результати оцінки клінічної ефективності трансфузії криоконсервованих еритроцитів для собак хворих на бабезіоз. Після переливання криоконсервованих еритроцитів і комплексної терапії спостерігався приріст кількості гемоглобіну, еритроцитів і рівня гематокриту, що супроводжувався позитивною динамікою в клінічному стані хворих тварин.

Ключові слова: криоконсервовані еритроцити, бабезіоз, гемотрансфузія, гемоліз, клінічний аналіз крові.

Pervushina O.A.

Kharkiv State Zooveterinarian Academy

APPLICATION OF CRYOPRESERVED ERYTHROCYTES FOR CORRECTING OF THE ANEMIC STATE IN DOGS WITH CANINE BABESIOSIS

Summary

The results of evaluation of the clinical efficacy of transfusion cryopreservation red blood cells in dogs with canine babesiosis. After the transfusion of cryopreserved erythrocytes and combined therapy was observed increase in the amount of hemoglobin, hematocrit, and red blood cells, accompanied by positive changes in the clinical status of sick animals.

Keywords: cryopreserved erythrocytes, babesiosis, blood transfusion, hemolysis, blood count.