

МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

© Похил С.І., Торяник І.І., Тимченко О.М., Чигиринська Н.А., Костирия І.А.

УДК 619:616-993.192:636.7

Похил С.І., Торяник І.І., Тимченко О.М., Чигиринська Н.А., Костирия І.А.

ПРИСКОРЕНИЙ МЕТОД ПОДВІЙНОГО ЗАБАРВЛЕННЯ МАЗКІВ КРОВІ

З НАШАРУВАННЯМ ДІАМАНТОВОГО ЗЕЛЕНОГО

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України»

kamish_in@ukr.net

Робота являється фрагментом поточної науково-дослідної тематики: «Розробка методів лабораторної діагностики бабезіоза», КП № держ. реєстрації 0114U000242, Інв. № НАМН 116/2014.

Вступ. Сучасні цитологічні дослідження гемопаразитарних захворювань (у тому числі, і бабезійної інфекції) вимагають від науковців динамічних пошуків нових та вдосконалення існуючих методів якісної та доступної експрес-діагностики [1,2,3,4]. Серед останніх вагоме місце посідають різновиди способів зафарблення зразків (крові, лімфи, кляч-препаратів), комплексне поєднання в них класичних методик (нашарування відомих та перевірених барвників).

Мета роботи. Колективом авторів пропонується застосовувати у цитологічній діагностиці гемопаразитарних захворювань якісний контрастний, доволі доступний та показовий метод експрес-діагностики із застосуванням нашарування діамантового зеленого.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом дослідження стали мазки крові свійських собак (n=21) обох статей, віком від 1,5 до 6 років, клінічно хворих на бабезіоз (*Babesia canis*). Діагноз встановлювався за умов ветеринарного контролю профільних спеціалістів «Центру клінічної ветеринарії», м. Харків. За для уточнення діагнозу застосовували ПЛР у кожному із підозрілих випадків. Спостереження за хворими тваринами відбувалось протягом 1,5-2-х місяців, епізотологічно актуальних для згаданої хвороби [5]. Отримані препарати порівнювали із інтактним контролем. Роль останнього відігравала група клінічно здорових особин відповідних віку і статі. Кров для досліджень брали із периферичних судин вуха, кінчика хвоста або з вени. Місце забору крові депілювали, протирали 70 % етиловим спиртом або спирт-ефіром. Вухо чи кінчик хвоста надрізали, робили венегункцію. За для об'єктивізації дослідження брали лише першу краплю крові, завбільшки з просяне зерно, наносили її на кінець знежиреного предметного скла. Мазки виготовляли ребром шліфованого скла, висушували на повітрі, маркували, фіксували. Методика складалась із двох поступових етапів. Перший полягав у зафарбленні мазків крові тварин за Майн-Грюнвальдом у модифікації. Наступний долучав авторський підхід, що базувався на короткотривалому нанесенні/нашаруванні (2-3 с) 5% розчину діамантового зеленого на попередньо забарвлений та висушений (2-3 хв.) під струмом сухого теплого повітря (фен побутовий, фірми «Samsung», Корея) препарат. Отриманий у такий спосіб зразок терміново змивали під струмом проточної води, висушували, як у попередньому

випадку, аналізували у люмінесцентному мікроскопі x1350. Результати оцінювали сумарно.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Результати дослідження та їх обговорення.

У результаті дослідження було встановлено, що застосований метод забарвлення мазків крові здорових та хворих на бабезійну інфекцію свійських собак має певні переваги. Він простий, не трудомісткий, невибагливий та нетривалий у здійсненні, що надає перспективи застосування останнього у польових умовах експедицій, тощо. Метод доступний за своєю ціновою політикою, інгредієнти активно вживаються у дослідницькій практиці українськими науковцями, широко представлені на вітчизняному ринку. Наявність контрастних за кольоровим спектром фарб сприяє цілісному усвідомленню морфологічного сюжету змін у дослідженіх тканинах.

З технічної точки зору, існують характерні приваби чіткої візуалізації у структурній диференціації ядер, цитоплазматичних компонентів, мембрани. За умов аналізу препаратів крові (мазки), що належали контролю тваринам вражали виразність та насиченість забарвлення клітин крові, чіткість межі кожної із них, відсутність розмитості у контурах. Еритроцитарні клітини мали яскравий смарагдовий колір, позначались круглою формою та наявністю просвітлень у центрі (дискоцити). Добре розрізнялись поодинокі саджі (n=0-2 у полі зору препарату), визначення їхньої чисельності не становила проблеми. Цитоплазма лейкоцитів відрізнялась сіро-зеленим, ядра-буряковим відтінками. Гранули мали насичений колір вщерть до темно-синього, чорного. Внутрішньоклітинні компоненти візуалізовані, їхня диференціація-безперечна.

У разі спостереження за ураженими клітинами якісні характеристики барв залишались незмінними. Еритроцити – смарагдового кольору, з чітко позначеною межею, помітними змінами поверхневою архітектонікою (ехіно-, дакріо-, стомато-, овало-, мікро-сферицити, $\Sigma=7-11$ у полі зору). Пойкілоцитоз доволі виразний у 60% препаратів, анізоцитоз – у 25%. Феномен утворення «монетних стовпчиків» більш поширеній, ніж у контролі. Внутрішньоклітинні включення бузкового, червоно-фіалкового кольорів. Характер забарвлення лейкоцитарної популяції незмінний.

МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

У декількох випадках ($n=4$) у безпосередній близькості до еритроцитів спостерігали чисельні скучення тромбоцитарних пластин ($\Sigma=8-13$ у полі зору). Вони забарвлювались у малиновий колір, їхні гранули (різni за формою та розмірами, відповідно ступеню зрілості тромбоцитів) відрізнялись темно-синім відтінком.

Виявлені феномени пов'язували із виразними адсорбційними властивостями заявлених барвників на тлі поглинаючої здатності клітин крові (за типологією – сполучнотканинні) та результатом сумації кольорового спектру [6,7]. Скрізна дифузія хімічних складових, застосованих барвників, сприяла у відтермінований період спостереження довготривалому збереженню

препаратів, якісному зображення головних елементів клітинних структур та внутрішньоклітинних включень.

Висновки. Заявлений спосіб подвійного забарвлення мазків крові з нашаруванням діамантового зеленого є якісним, економічно вигідним, технічно доступним методом експрес-діагностики гемопаразитарних захворювань, на кшталт бабезіозу.

Перспективи подальших досліджень полягають у широкому застосуванні експрес-методу подвійного забарвлення мазків крові з нашаруванням діамантового зеленого за для підвищення ефективності цитологічної діагностики гемопаразитарних хвороб.

Література

1. Babesiosis Surveillance – 18 States, 2011 [Electronic resource] // MMWR. – 2012. – Vol. 61, No. 27. – P. 505-509. – Mode of access http://www.cdc.gov/parasites/babesiosis/resources/babesiosis_case_report_form.pdf.
2. Callihan D. R. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline-fourth edition [Electronic resource] / D.R. Callihan, T.J. Gile, K.G. Beavis [et al.] // Clinical and laboratory standards institute. – 2014. – Vol. 34, № 8. – Mode of access http://shopping.netsuite.com/c.1253739/site/Sample_pdf/M29A4_sample.pdf M29-A4 ISBN 1-56238-962-9 ISSN 2162-2914.
3. Gray J. Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity [Text] / J. Gray, A. Zintl, A. Hildebrandt [et al.] // Ticks and Tick-borne Diseases. – 2010. – Vol. 1. – P. 3-10.
4. Manson's tropical diseases: expert consult – [Electronic resource] / J. Farrar, P. Hotez, T. Junghanss. – 2013. – Mode of access http://books.google.com.ua/books?id=GTjRAQAAQBAJ&dq=Senanayake+S.N.,+2012&hl=ru&source=gbs_navlinks_s.
5. Skotarczak B. Babesiosis as a disease of people and dogs. Molecular diagnostics: a review [Text] / B. Skotarczak // Veterin. Medic. – 2008. – Vol. 53, № 5. – P. 229–235.
6. Vannier E. Human Babesiosis [Text] / E. Vannier, P. J. Krause // N. Engl. J. Med. – 2012. – Vol. 366, № 25. – P. 2397-2407.
7. Yabsley M. Natural history of zoonotic babesia: role of wildlife reservoirs [Electronic resource] / M. J. Yabsley, B. C. Shock // Intern. J. Parasitol.: Parasites and Wildlife. – 2013. – Vol. 2. – P. 18-31. – Mode of access : www.elsevier.com/locate/ijppaw.

УДК 619:616-993.192:636.7

ПРИСКОРЕНИЙ МЕТОД ПОДВІЙНОГО ЗАБАРВЛЕННЯ МАЗКІВ КРОВІ З НАШАРУВАННЯМ ДІАМАНТОВОГО ЗЕЛЕНОГО

Похил С.І., Торяник І.І., Тимченко О.М., Чигиринська Н.А., Костирия І.А.

Резюме. У представлений роботі міститься інформація щодо преференцій прискореного контрастного методу подвійного зафарблення мазків крові шляхом нашарування 5% діамантового зеленого на попередньо забарвлений (за Майн-Грюнвальдом) препарат. У дослідженні застосовувалась хрестоматійну методику. Кров відбирали від здорових свійських собак ($n=7$) обое статі, віком від 1,5 до 6 років та особин з клінічно встановленою бабезійною інфекцією ($n=21$). У зразках визначали наявність чи відсутність збудників (*Babesia canis*); характерне для заявленого способу чітке, контрастне забарвлення клітин крові та їхніх органел (еритроцити-яскравого смарагдового кольору, ядра лейкоцитів-бурякового, цитоплазма сіро-зеленого відтінку). Методологічний сенс забарвлення препаратів саме у такий спосіб полягав у його простоті і доступності, низькотривалості та доволі високій якості світлооптичної діагностики гемопаразитарних хвороб, на кшталт, бабезіозу. Запропонований спосіб подвійного забарвлення мазків крові рекомендовано до практичного застосування.

Ключові слова: мазки крові, подвійне забарвлення нашаруванням, діамантовий зелений, свійські собаки, бабезіоз.

УДК 619: 616-993.192: 636.7

УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ДВОЙНОЙ РАСЦВЕТКИ МАЗКОВ КРОВИ С НАСЛОЕНИЕМ БРИЛЛИАНТОВОГО ЗЕЛЕНОГО

Похил С.И., Торяник И.И., Тимченко О.М., Чигиринская Н.А., Костирия И.А.

Резюме. В представленной работе содержится информация, относительно преференций, предоставляемых ускоренным контрастным методом двойной окраски мазков крови путем наслоения 5 % бриллиантового зеленого на прежде окрашенный (по Майн-Грюнвальду) препарат. В работе использовали хрестоматийную методику. Кровь отбирали у здоровых собак (домашних питомцев), $n=7$ обоего пола, в возрасте от 1,5 до 6 лет, а так же особей с клинически установленной бабезиозной инфекцией ($n=21$). В образцах определяли наличие/отсутствие возбудителя (*Babesia canis*); характерную для заявленного способа четкую контрастную окраску клеток крови, их органелл (эритроциты – ярко-изумрудного цвета, ядра лейкоцитов – красно-фиолетового, цитоплазма – серо-зеленого оттенка). Методологическая суть окраски препаратов именно этим способом состояла в его простоте и доступности, кратковременности и достаточно высоком качестве светооптической

МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

диагностике гемопаразитарных заболеваний, таких как бабезиоз. Предложенный способ двойной окраски мазков крови рекомендован к практическому применению.

Ключевые слова: мазки крови, двойная окраска наслоением, бриллиантовый зеленый, домашние собаки, бабезиоз.

UDC 619: 616-993.192: 636.7

Express Method of Blood Smears Double Twice Contrastation with a Layer of Brilliant Green

Pokhil S.I., Torianik I.I., Tymchenko O.M., Chygrynska N.A., Kostyria I.A.

Abstract. *Introduction.* Babesiosis is a zoonotic disease transmitted ticks and caused by protozon of the genus *Babesia*, which invade and destory erythrocytes and endotheliocytes roof of blood vessels. Babes discovered the organism in Romania in 1888 while studying cattle dying with fever and hemoglobinuria. The first documented case of babesiosis in humans was in 1957. The disease is characterized by sings of malaise, inappetence, fever, hemolytic anemia.

Materials and methods. The objects of this investigations are the control domestic dogs ($\Sigma=7$) of the 1,5-6-year-old and such paterns, which were with the babesious infection ($\Sigma=21$). For all of examinational animals groups were used macroscopic and hystological methods. Microscopic examination was carried out in a traditional way. Preparations of the material were fixed in spiritus vini rectiphicatus (96 %) during 25-40 min. Blood smears were contrasted by Main-Grunwalds, analysed under a microscope LOMU (LOMO, Russia): x 1350; 1000 and photographed with a digital camera «Canon EOS-3000».

Results of the study. As the result of the study it was revealed that the used technique of blood smear staining in healthy domestic dogs and those ill with *Babesia* infection had certain advantages. This method is simple, undemanding, short-term and not labour-consuming; these features make it promising for use in field conditions of expeditions, etc. The method is reasonable for its pricing; the ingredients are actively used in research practice by Ukrainian scientists and widely represented on the domestic market. The presence of stains, which contrast by their colour spectrum, facilitates the integral awareness of the morphological plot of changes in studied tissues. From the technical viewpoint there are typical appeals of clear visualization in the structural differentiation of nuclei, cytoplasmic components and membrane. In conditions of analysis of blood preparations (smears), which belonged to control animals, the expressiveness and saturation of staining of blood cells, well-outlined borders of each of them and absence of any blur in their contours were striking. Erythrocytes were bright emerald green, characterized by a round shape and presence of clarification in their centre (discocytes). Single sajes were well discerned ($n = 0-2$ in the field of vision of the preparation); determination of their quantity was not a problem. The cytoplasm of leukocytes was notable for its gray-green and the nuclei for their wine red tints. The colour of the granules was saturated, up to dark blue and black. The intracellular components were visualized, their differentiation was obvious. In case of observation of affected cells the qualitative properties of the stains remained unchanged. Erythrocytes were emerald green, with a well-outlined border and evident changes of the superficial architectonics (echino-, dacryo-, stomato-. ovalo- and microspherocytes; $\Sigma = 7-11$ in the field of vision). Poikilocytosis was rather strongly pronounced in 60 % of preparations, anisocytosis in 25 %. The phenomenon of formation of «coin columns» was more widespread than in controls. The intracellular inclusions were lilac and red-violet. The character of colour of the leukocyte population did not change. Some cases ($n = 4$) demonstrated numerous aggregations of thrombocytes ($\Sigma = 8-13$ in the field of vision) in the immediate proximity to erythrocytes. These blood platelets were crimson, their granules (with different shape and size according to the degree of thrombocyte maturity) were notable for their dark blue tint. The revealed phenomena were attributed to pronounced adsorptive properties of the above stains against a background of absorptive ability of blood cells (connective-tissue ones according to typology) and the result of summation of the colour spectrum. Through diffusion of chemical components of the used stains facilitated long-term preservation of the preparations within the established period of observation as well as qualitative representation of major elements of cell structures and intracellular inclusions.

Conclusions: the declared technique of double staining of blood smears with a layer of brilliant green is a qualitative, economically sound and technically available method of rapid diagnosis of haemoparasitic diseases like babesiosis.

Keywords: blood smears, twice contrastation, brilliant green, domestic dogs, babesiosis.

Рецензент – проф. Лобань Г.А.

Стаття надійшла 05.06.2015 р.