

УДК: 576.893.192.6:57.053(076)

МЕТОДИ СУЧАСНОЇ ДІАГНОСТИКИ БАБЕЗІОЗА. КРИТЕРІЇ ЯКОСТІ. ПЕРЕВАГИ ТА НЕДОЛІКИ (Повідомлення перше)

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

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

Сучасна діагностика бабезійної інфекції (БІ) ґрунтується на основі комплексного епідеміологічного, клінічного і лабораторного обстеження. З урахуванням поліетіологічності та політипності клінічної картини бабезіоза лабораторним методом його діагностики відведена вирішальна роль. Сьогодні для лабораторної діагностики БІ активно використовується п'ять груп методів: мікроскопічні, культуральні, імунологічні, молекулярно-генетичні, біологічні [1, 2, 3].

Фахівцями Центру контролю і профілактики захворювань США (Center for Disease Control and Prevention, CDC, 1600 Clifton Road, Mailstop CO2, Atlanta, GA 30333) були розроблені вимоги дефініції (визначення) випадків захворювання людей на бабезіоз, у тому числі лабораторні критерії для встановлення (підтвердження) етіологічного діагнозу [4].

І. Діагностичні критерії бабезіозу:

1) основні підтверджуючі (безсумнівні) критерії:

- виявлення методом світлової мікроскопії інтраеритроцитарних організмів *Babesia* у мазках крові, забарвлених за Гімзе, Райтом або Райтом-Гімзе; або:

- виявлення ДНК *Babesia microti* у нативній крові методом полімеразної ланцюгової реакції; або:

- виявлення геномних послідовностей *Babesia* spp. у нативній крові шляхом ампліфікації відповідних нуклеїнових кислот; або:

- виділення організмів *Babesia* із нативної крові лабораторних тварин при їх зараженні.

2) допоміжні (вірогідні) підтверджуючі критерії:

- виявлення методом імунофлюоресценції антитіл проти *Babesia microti* загальних імуноглобулінів (Ig) або IgG у титрі більше або дорівнює 1:256 (або більше або дорівнює 1:64 у епідемічно поєднаних зразках крові донора чи реципієнта); або:

- виявлення в реакції імуноблотингу специфічних IgG *Babesia microti*; або:

- виявлення методом імунофлюоресцентного аналізу загального Ig, або IgG - антитіл проти *Babesia divergens* у титрі більше або дорівнює 1:256; або:

- виявлення методом імунофлюоресцентного аналізу загального Ig або IgG - антитіл проти *Babesia duncani* у титрі більше або дорівнює 1:256.

Кожна із груп лабораторних методів діагностики БІ має свої переваги і недоліки, які

визначають доцільність та ефективність їх практичного застосування за конкретних мети, завдань та умов досліджень.

II. Методи діагностики бабезіозу:

1) мікроскопічний метод (ММ) діагностики БІ

ґрунтується на прямому виявленні при світловій мікроскопії з масляною імерсією бабезій в еритроцитах тонких і товстих (або комбінованих: тонкий-товстий) мазків крові забарвлених за методами Романовського-Гімзе (найчастіше), Райта, Папенгейма і Нохта (рідше) та Лейшмана, Ерліха (за певних умов) [5]. Чутливість ММ діагностики БІ становить близько 0,1 % паразитемії і залежить від досвіду фахівців, рівня їхнього технічного оснащення, термінів забору матеріалу, які пов'язані із характером та перебігом захворювання. За умов правильного (якісного) забарвлення мазків крові класичним методом Романовського-Гімзе еритроцити мають рожевий, цитоплазма лейкоцитів і лімфоцитів - синій, а їхні ядра - темно-фіалковий кольори. Цитоплазма *Babesia* spp. набуває блакитного, а ядра - темно-червоного кольорів. Морфологічно трофозоїти і мерозоїти великорозмірних бабезій (наприклад - *Babesia canis*) у мазках крові частіше виявляється у вигляді парно-грушоподібної форм із розмірами (2,5-5) мкм, а малі (дрібні) види бабезій (наприклад - *B. microti*, *B. divergens*, *B. gibsonii* та інші) частіше мають округлі (кліщеподібні, перстнеподібні), видовжені (паличкоподібні), грушоподібні форми із розмірами (1,2-1,9) мкм. Рівень паразитемії до певної міри корелює із видом бабезій, але узагальнююча закономірність полягає в тому, що для великорозмірних бабезій більш характерними є низькі показники паразитемії (наприклад, для *B. canis* вони не перевищують 0,5 %), а для дрібних видів паразитів навпроти - більш високі (наприклад, середні значення вказаних показників сягають для видів *B. microti*, *B. divergens* і *B. gibsonii* від 2 до 6 %) [6, 7]. Для виявлення бабезій деякі дослідники віддають перевагу приготуванню мазків із шкіркокапілярної крові з дослідженням її першої краплі, в якій, на їх думку, за звичай, зосереджена найвища концентрація збудника на відміну від магістрального кровообігу. За даними цих фахівців, уражені бабезіями еритроцити *in vivo* найчастіше концентруються в кровеносних судинах кишечника, паренхіматозних органів, шкіри. *Ad mortu* (людей і тварин), для приготування мазків трупної крові (із урахуванням її акротопізма), зразки відбирають із судин вух, кінцівок, а також застосовують кляч-препарати (мазки-відбитки) із паренхіматозних органів [8]. Оскільки збудники БІ швидко лізуються, дослідження рекомендують проводити якомога раніше. Для видової ідентифікації гемопаразитів роблять тонкі мазки крові. За для патогенетичної діагностики стадійності процесу (гострий, блискавичний перебіг) застосовують товстий мазок. Однак, проблематичним видається виявлення паразитемії у підгострій і хронічній стадії

процесу, коли рівень останньої незначний, а діагностична ефективність вище зазначених методів доволі низька. За таких умов фахівці наголошують на доцільності мікроскопічного перегляду великої кількості (від 200 до 800) полів зору досліджуваних мазків крові, оскільки бабезії можуть бути виявлені у невеликій кількості. Наприклад, Clinical and Laboratory Standards Institute (США) для діагностики бабезійної інвазії у людини мікроскопічним методом рекомендує переглядати не менше ніж 300 полів зору як тонких, так і товстих мазків крові (останніх - мінімум 100 полів) із масляною імерсією (загальне збільшення мікроскопу $\times 1000$). Крім того, уражені бабезіями еритроцити є більш легкими за вагою (у порівнянні із інтактними еритроцитами), тому в мазках крові їх частіше вдається виявляти на периферії або в кінці мазка. За умов приготування товстих мазків крові зазначені факти суттєво спрощують детекцію еритроцитів із інтраклітинними паразитами.

Отже, для покращення результативності мікроскопічного методу діагностики БІ дослідники різних країн світу спрямовують свої зусилля на розробку способів підвищення контрастності диференційного забарвлення інтраеритроцитарних паразитів, удосконалення технології приготування препаратів мазків крові [7] та їх перегляду [8]. Важливою обставиною, що стосується виявлення бабезій мікроскопічним методом, є видові особливості морфологічних форм інтраеритроцитарних паразитів та необхідність отримання даних щодо регіонального різноманіття клінічнозначущих видів *Babesia* [6,9].

У сучасній інфекційній гематології класичний ММ діагностики кровепаразитарних хвороб (у тому числі – БІ) має не лише раритетне значення (в історичному сенсі), а продовжує відігравати важливу роль у їх сучасній лабораторній діагностиці. Результати мікроскопічного дослідження мазків крові дозволяють не лише діагностувати БІ (за безсумнівним критерієм виявлення паразитів в еритроцитах), але й здатні надати важливі об'єктивні дані стосовно важкості стану пацієнта, ефективності лікування та прогнозу подальшого перебігу хвороби. На думку фахівців, цитологічний аналіз клітин крові завдяки технологічній доступності, простоті та стислим строкам виконання, й на сьогодні залишається одним із універсальних методів лабораторно-клінічної діагностики, який дає змогу адекватно оцінити не лише структуру клітин крові у цілому, але й визначити наявність та поширеність якісних змін поверхневих мембран, цитоплазми, ядер, внутрішньоядерних включень та інше [1]. Цитологічний аналіз крові ґрунтується на здатності різних пулів клітин крові та структурних елементів останніх до диференційного забарвлення при використанні як класичних, так і удосконалених методів.

Одним із таких є метод М. Романовського, що вважають прототипом методик забарвлення за Л. Дженнером (1865-1904 рр.), Май-Грюнвальдом (1887-1925 рр.), В. Б. Лейшманом (1865-1926 рр.) та А.

Папенгеймом (1870-1916 рр.) з модифікаціями за Г. Гімзе (1867-1948 рр.) та Дж. Райтом (1869-1928 рр.). Хронологія вдосконалень цього методу розпочинається з 1879 року, коли П. Ерліхом вперше застосовується суміш кислих та основних барвників. Дещо пізніше М. Романовський та П. Малаховський, незалежно один від одного, удосконалюють методику, застосовуючи суміші еозину Y та окисленого метиленового синього. У зв'язку із тим, що водні розчини барвників не виявляли необхідної стійкості, а препарати, пофарбовані ними, з часом втрачали контрастність та чіткість, у 1901 році В. Б. Лейшман, а в 1902 році В. Райт запропонували перед забарвленням застосовувати в якості фіксатора метанол. У 1904 році Г. Гімза довершив методику шляхом стандартизації розчинів барвників та додаванням гліцерину з метою підвищення розчинності та стабільності. Отже, класичний барвник М. Романовського відтоді став поєднувати у своєму складі крім еозинату (хімічно відновлений еозин), метиленовий синій та продукти окислення останнього (азур А, азур Б), фіксатор та стабілізатори барвника.

На сьогодні метод М. Романовського широко застосовують для диференціації клітин крові, кісткового мозку, виявлення кровепаразитів (у тому числі – бабезій) та широкого кола інших патологічних станів. Деякі його варіанти зазнали процедурних (технологічних) вдосконалень і застосовуються дослідниками з метою скорочення тривалості процесу ідентифікації збудників, підвищення її ефективності та якості проведеного дослідження. Сутність заявлених прототипів полягає в кількісних змінах тривалості строків та поетапної динаміки мікроскопічної ідентифікації паразитів. За цим, стереотипи та якісний спектр реагуючих речовин залишаються попередніми. Мікроскопічну діагностику здійснюють шляхом послідовних декілька разових (4-5), скорочених до блискавичності (тривалістю близько 1-2 секунд) фіксацій у метилені з наступним фарбуванням мазків периферичної крові аніоновими (еозином) та катіоновими (азуром, метиленовим синім, метиленовим блакитним) барвниками. Зазначений спосіб суттєво скорочує тривалість контакту барвників із клітинами крові, зосереджених у площині мазку, забезпечує останнім цілковиту збереженість, чим, безперечно, підвищує візуалізованість препарату та діагностичну якість останнього [9].

Барвник Райта переважно використовують для забарвлення мазків крові та аспіратів кісткового мозку з метою виявлення кровепаразитів (у тому числі – бабезій), а також для здійснення диференціального підрахунку лейкоцитів (дозволяє легко розрізнити різні формени елементи білої крові і структурно-функціональні зміни останніх) та для більш якісної цитодіагностики внутрішньоклітинних включень. Забарвлення за Райтом широко застосовується цитогенетиками для визначення специфіки та характеру розладів ядерно-цитоплазматичного співвідношення, наявності каріопікнозу, каріорексису, якісних змін у будові та

розташуванні хроматину. При цьому слід пам'ятати, що буферний барвник Райта, барвник Райта-Гімзе та буферний барвник Райта-Гімзе є різними модифікаціями барвника Райта. Модифікації барвника Райта також можуть містити еозин Y, азур B, метиленовий синій та деякі інші доступні комерційні препарати, які можуть долучатись до робочих розчинів барвника для покращення якості забарвлення клітин та їх компонентів [5].

Найбільш зручним методом для виявлення гранулоцитів при гемопаразитарних хворобах вважається забарвлення мазків крові за Май-Грюнвальдом. Для цього найчастіше застосовують комерційний розчин еозинметиленового синього. Нативні мазки периферичної крові без попередньої фіксації заливають зазначеним барвником, а через 5 хвилин промивають проточною водою та висушують на повітрі. Перевагами цього методу досліджень є його технологічна доступність, простота та уніфікованість, економічна дешевизна та швидкість виконання дослідження [9].

З метою дослідження структури ядер, їх ушкоджень, виявлення цитоплазматичної зернистості (у тому числі - гранулоцитів) у разі розвитку кровейфекції застосовується метод забарвлення мазків за Папенгеймом. Він являє собою комбінацію двох попередніх методів. Сутність його складається в одночасних фіксації та забарвленні (впродовж 2-3 хвилин) нативних мазків крові комерційним фіксатором-барвником (виготовленим за рецептурою Май-Грюнвальда) та наступному, після промивки препаратом, його дофарбовуванню розчином Романовського (1-1,5 краплі на 1 мл води). Метод вважають функціонально доцільним, оскільки завдяки йому є змога встановити не лише структурні розлади клітин, але й хронобіологію останніх, що є важливим при спостереженні за перебігом БІ [10].

У диференціальній цитодіагностиці при БІ виключне значення має метод забарвлення клітин крові за Нохтом. Його технологічна сутність полягає у градієнтному титруванні барвника на декількох пробних попередньо фіксованих мазках крові за для визначення найбільш співвідносного поєднання, яке дозволяє досягти максимальних чіткості та контрастності забарвлення потрібного пулу клітин крові. У разі якісного забарвлення за Нохтом клітини крові набувають характерних лише для зазначеної методики кольорів: еритроцити - рожево-жовтого, цитоплазма нейтрофілів - рожевого, еозинофілів - блідно-небесного, моноцитів - димчастого [9].

При дослідженні ММ мазків крові від людей і тварин з підозрою на бабезіоз рекомендовано керуватись такими положеннями. Відсутність клінічних проявів хвороби не є підставою для відмови від підозри щодо наявності бабезій в організмі. Клінічний перебіг бабезіоза ніколи не відбувається без паразитемії. Негативний результат при мікроскопічному дослідженні мазків крові людей і тварин, що підозрюються у паразитозі, не може бути розцінений як свідчення на користь відсутності останніх. Початкові етапи хвороби

супроводжуються появою в крові незначної кількості паразитів, їх чисельність збільшується за умов пролонгації процесу та його ускладнень. За умов визначення паразитозу рекомендовано застосовувати методи збагачення паразитів (виращування *in vitro* на культурах еритроцитів та *in vivo* з використанням чутливих лабораторних тварин) та спостереження у динаміці [8]. Крім того, при негативних результатах мікроскопічного дослідження для лабораторної діагностики БІ застосовуються імунологічні, біологічні та молекулярно-генетичні методи [7,5,10].

2) Біологічний метод діагностики бабезіозу

Грунтується на розвитку БІ (із швидким та інтенсивним накопиченням збудника) у піддослідних лабораторних тварин після їх зараження зразками досліджуваного матеріалу. Зразок досліджуваного матеріалу (яким найчастіше буває кров пацієнта) вводять у вену або у черевну порожнину чутливим видам лабораторних тварин. У подальшому кров заражених тварин перевіряють на присутність бабезій, які у достатній кількості для мікроскопічного виявлення з'являються через два тижні. Тому, попри високу чутливість біологічного методу (дозволяє виявляти у крові *Babesia* spp. і при негативних результатах мікроскопії її мазків) він не використовується для експресної діагностики БІ. Проте, розробка методів культивування представників *Babesia* spp. *in vitro* сприяло вивченню біології збудників, факторів їх патогенності, взаємодії на клітинному рівні системи паразит - хазяїн, імунної відповіді організму останнього на інвазію, чутливості бабезій до антипротозойних препаратів [11, 12]. Крім того, наявність чистої культури паразитів дало змогу досліджувати їх генетичні варіанти та отримувати низьковірulentні штами в якості кандидатів для створення засобів імунізації тварин, а можливо, в наступному, і людей [1].

3) *культуральний метод діагностики БІ* у порівнянні із мікроскопічним є більш чутливим. Із даних наукової літератури відомо про отримання культури паразитів при висіві *in vitro* крові від диких кабанів і чорнохвостих оленів із рівнем паразитемії менше 0,01 %. Дослідники з Техаського університету, США у 1993 році виростили культуру *B. caballii* із крові клінічно здорових коней та без видимої паразитемії у тонких мазках крові. Пізніше у 1998 році вони ж отримали культуру *B. odocoilei* із крові від білохвостих оленів із рівнем паразитемії при співвідношенні інфікованих еритроцитів до неінфікованих 1:6000, а у подальшому ці ж науковці, досліджуючи кров, відібрану у абсолютно здорових коней з ендемічних на бабезіоз районів та без видимої паразитемії тонких мазків крові з використанням мікроцентрифужного методу виростили *in vitro* культури бабезій із 65,2 % зразків. Схожі дані було отримано щодо виділення культур *B. equi* із 60 % досліджуваних зразків крові від коней без видимої паразитемії. Використовуючи серійні розведення

зараженої *B. divergens* крові від великої рогатої худоби (ВРХ) з використанням культурального методу фахівцям вдалося отримати культуру із зразків із рівнем паразитемії 10^{-7} , що відповідає кількості 10 паразитів в 1 мл крові.

Перші спроби безперервного культивування найпростіших *in vitro* відносяться до другої половини ХХ століття (1976 р.), коли дослідники із США розробили метод постійного вирощування *in vitro* одного із збудників малярії – *Plasmodium falciparum*. За цією технологією збудник вирощувався впродовж 48 годин на статичному прошарку еритроцитів людини в середовищі Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) із сироваткою людини при температурі 38 °С в атмосфері із 7 % CO_2 та низьким вмістом кисню (близько 1-5 %), що досягалося вміщенням колб для культивування в ексікатор із запаленою свічкою. При цьому, *P. falciparum* розмножувався безстатевим шляхом упродовж 2-3 діб із досягненням 3 % рівня паразитемії, після чого розмноження ставало асинхронним. Ураховуючи те, що збудники бабезіоза (*Babesia* spp.) та збудники малярії (*Plasmodium* spp.) є певною мірою спорідненими і належать до одного типу Аріскомплекса (апікомплексні) або Sporozoa (споровики) та мають схожі біологічні властивості, було обґрунтованим припущення, що розроблений авторами метод може бути ефективним і для культивування бабезій.

Можливість адаптації вищезазначеної техніки для безперервного культивування *Babesia* spp. випробувано на добре відомому збуднику бабезіоза ВРХ – *B. bovis*, що вперше (1978 р.) відображено в цілій низці досліджень [1,6,8,12]. Короткострокове *in vitro* розмноження *B. bovis* виконано в суспензії еритроцитів бика (20-30 %, об'ємна частка) в середовищі 199 та із сироваткою бика у співвідношенні об'ємів 1:1, при рН=7. При цьому, усю суміш вміщували у центрифужні пробірки, культивували при постійному слабкому перемішуванні із щодобовою заміною поживного середовища при температурі 38 °С та вмісті в атмосфері 5 % CO_2 . Розмноження паразитів спостерігали впродовж не більше ніж 72 годин, але в цілому, ця система слугувала відправною моделлю для визначення найважливіших технологічних умов для довгострокового безперервного росту в наступні роки. Так, фахівці у 1980 р. змінивши методику вирощування отримали безперервний ріст *B. bovis in vitro* впродовж 85 діб із рівнем паразитемії 10-15 % та збереженням патогенних (характерних для *in vivo* у заражених спленектомованих телят) властивостей. Також, емпіричним шляхом було визначено найважливіші етапи і параметри *in vitro* культивування бабезій, такі як дефібринування зразків досліджуваної крові, додавання свіжовідмитих еритроцитів в об'ємі (гематокриті) від 20 до 30 %, використання складних поживних середовищ з додаванням близько 25 % від об'єму сироватки в якості живильного компоненту, жорсткий контроль рН середовища, інкубування в атмосфері з 5 % CO_2 та субкультивування паразитів кожні 3 дні.

У цей самий період іншою групою науковців створено систему довгострокового культивування *B. bovis* із використанням схожих за складом (складних багатокомпонентних) поживних середовищ і умов, але із застосуванням нерухомого або статичного шару еритроцитів на дні культуральних ємкостей, а не суспензії, що в цілому, було технічно більш зручним і забезпечувало достатній рівень паразитемії (від 5 до 10 %, а за даними окремих дослідників - майже 60 %) із підтриманням культури впродовж багатьох пасажів упродовж декількох місяців [8]. Цей метод культивування отримав назву microaerophilous stationary phase (MASP).

Техніка MASP в наступному була апробована для *in vitro* культивування різних видів бабезій. Науковці багатьох країн світу для вирішення різних завдань із урахуванням відмінних умов удосконалювали MASP, підвищували її результативність, спрощували протоколи досліджень, змінюючи склад поживних середовищ (тип середовища, склад та концентрацію буферів, різновиди донорських еритроцитів та сироваток, факторів і стимуляторів росту, вітамінів, антибіотиків), умов культивування (складу газової суміші, атмосфери вирощування, термінів спостереження паразитемії, схем підкорму, пересіву, тощо) [5, 13,14,15].

В якості поживних середовищ для вирощування бабезій найчастіше використовують RPMI 1640, 199, NCTC-135, HL-1, молекулярна одиниця маси (MOM), α -medium. Для росту бабезій в умовах *in vitro* найважливіше значення мають: нейтральні або слабо лужні значення рН середовища (оптимальне значення від 7,02 до 7,79), і для багатьох видів згубним є слабко кислий рівень; співвідношення об'єму (V, мл) всієї культуральної суспензії до площі (S, cm^2) дна культуральної ємності (флакону або лунки), тобто глибина/товщина прошарку поживного середовища над шаром еритроцитів, що забезпечує мікроаерофільні умови культивування. При цьому, за умови розмноження бабезій і використання ними кисню та дезоксигенації гемоглобіну культуральні системи стають темно-червоними, а рівень рН зменшується. Для забезпечення стабільних умов проводиться щодобова заміна старого поживного середовища над прошарком статичних еритроцитів на нове в об'ємі від 70 % до 90 %, або корелюється буферна стійкість системи [5].

В експериментах було визначено оптимальні значення рівня гематокриту в середовищі (співвідношення об'єму еритроцитів до об'єму поживного середовища) на рівні від 5 % до 30 % (найчастіше 5-7,5 %) або за показником їх кінцевої концентрації $10^8 - 10^9$ клітин/мл [14]. В процесі розмноження бабезій еритроцити руйнуються, їх кількість зменшується, що вимагає регулярного додавання свіжої дози неінфікованих відмитих донорських еритроцитів – аутологічних (того самого виду, що і досліджувана кров) або від інших хребетних тварин чи людини, до яких конкретні види бабезій володіють тропізмом і достатнім рівнем пермісивності.

Науковцями [15,16] зазначається, що саме походження та концентрація донорської сироватки та еритроцитів в поживному середовищі має вирішальне значення для успішного вирощування *Babesia* spp. *in vitro*. Іноді, аутологічна сироватка, отримана від різних видів донорів, навіть в межах однієї породи, не здатна підтримувати ріст паразитів.

Для виду *B. divergens* – збудника бабезіозу ВРХ та домінуючого етіологічного агента захворювання у людей в Європі, зазвичай застосовується сироватка ВРХ (у тому числі, ембріональна, інактивована прогріванням) або людини в об'ємних співвідношеннях 20 % та 10 %, відповідно, рідше - сироватка вівці (10 %, об'ємна частка) в поживному середовищі, що забезпечує необхідний ріст паразита впродовж тривалого часу із достатнім рівнем паразитемії та із збереженням патогенних властивостей бабезій, що вирости [14]. Додавання інших компонентів до середовища, таких як вітаміни, L-глутамін, бичий сироватковий альбумін, альбумакс І, стимулятор НВ101, гіпоксантин, тімідин призводило до певного збільшення рівня паразитемії окремих видів бабезій, але не змогло повністю замінити додавання сироватки. Для запобігання мікробного забруднення в поживні середовища додають антибіотики та антимікотики, найчастіше – гентаміцин, стрептоміцин, пеніцилін, амфотерицин В (Fungizone) в різних поєднаннях та концентраціях. Умови культивування - при температурі що дорівнює 37 °С в газовій суміші інкубатора (із вмістом близько 2 % O₂, 5 % CO₂, 93 % N₂), а після пристосування до умов *in vitro* – у зволоженій атмосфері повітря із 5 % CO₂. Контроль рівня паразитемії найчастіше проводиться щоденно або через добу під час ротації поживного середовища. Відбирають 0,1 мкл суспензії, роблять тонкий мазок, висушують на повітрі, двічі фіксують метанолом, фарбують за Романовським-Гімзе [17,18]. Відсоток рівня заражених еритроцитів вираховують не менш, ніж із тисячі переглянутих. Тривалість терміну інкубування поживних середовищ, інокульованих досліджуваними зразками еритроцитів, до моменту першого мікроскопічного виявлення *Babesia* spp. може сягати трьох тижнів [19], але найчастіше (у 80,6 % випадках) становить від 6 до 12 діб після засіву (ініціації) [17,19,20,21,22].

Висновки:

1) найбільш доступними та поширеними на сьогодні у лабораторній діагностиці бабезійної інфекції залишаються мікроскопічні методи, що поєднують у собі економічну доцільність, відносно технічну простоту застосування, можливості експер-аналізу. З ними пов'язані доступність, якість первинної діагностики, непримхливість у відтворенні за екстремальних умов, в тому числі, військово-польових;

2) за науково-практичним сенсом вагоме місце посідають затратні та відтерміновані культуральні методи, що є більш чутливими, суттєво допомагають у конкретизації типології збудників, у певних ситуаціях відіграють роль методик вибору.

References:

1. Vannier, E. Human Babesiosis [Text] / E. Vannier, P. J. Krause // N. Engl. J. Med. – 2012. - Vol. 366, No. 25. – P. 2397-2407.
2. Emerging protozoan pathogens navedd ahmed [Electronic resource] / K. Garland. - 2008. - Mode of access http://books.google.com.ua/books?id=bY9qczJ4owMC&dq=Krause+P.J.,+2003&hl=ru&source=gbs_navlinks_s
3. Martinot, M. Babesiosis in immunocompetent patients, Europe [Text] / M Martinot, M. M. Zadeh, Y. Hansmann [et al] // Emer. Infect. Dis. – 2011. - Vol. 17, No. 1. - P. 114-116.
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. Adaszek L. Analysis of the culture-derived soluble *Babesia canis* antigens derived from the Polish strains of the parasites [Text] / L. Adaszek, A. Puchalski, M. Dec, S. Winiarczyk // Tierärztl Prax Kleintiere. – 2012. - Vol. 40. – P. 399 – 403.
6. 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.
7. Dawood, K. E. Observation of a novel *Babesia* spp. in Eastern Grey Kangaroos (*Macropus giganteus*) in Australia [Electronic resource] / K. E. Dawood, J. A.T. Morgan, F. Busfield [et al] // Intern. J. of Parasitology Parasites and Wildlife. – 2013. - Vol. 2. - P. 54–61 Mode of access: www.elsevier.com/locate/ijppaw.
8. Zhao, Y. A fatal case of transfusion-transmitted babesiosis in the State of Delaware [Text] / Y. Zhao, K. R. Love, S. W. Hall, F. V. Beardell // Transfusion. – 2009. – Vol. 49, No. 2. – P. 2583-2587.
9. Ernst, D. J. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; Approved standard—sixth edition [Electronic resource] / D.J. Ernst, L.O. Balance, R.R. Calam [et al]//Clinical and laboratory standards institute. – 2007. - Vol. 26, No. 27. - Mode of access http://shopping.netsuite.com/c.1253739/site/Sample_pdf/H3-A6_sample.pdf H3-A6 ISBN 1-56238-650-6 ISSN 0273-3099.
10. Blevins, S. Blood smear analysis in babesiosis, ehrlichiosis, relapsing fever, malaria, ehrlichiosis, relapsing fever, malaria, and chagas disease [Text] / S. Blevins // Clin. Microbiol. – 2008. - Vol. 15, No. 2. - P. 521-530.
11. 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.
12. Sun, Y. The invasion process of bovine erythrocyte by *Babesia divergens*: knowledge from an in vitro assay [Electronic resource] / Y. Sun, E. Moreau, A. Chauvin, L. Malandrin // Veterinary Research. - 2011. - Vol. 42. – P. 62. Mode of access: <http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/62>.

13. Babesia Species [Electronic resource] // Transfusion. – 2009. - Vol. 49, Append. 2. – P. 215S-218S. - Mode of access:

<http://www.aabb.org/resources/bct/eid/Documents/215s.pdf>

14. Nehrass-Stuedli, A. Novel diamidines with activity against Babesia divergens in vitro and Babesia microti in vivo [Text] / A. Nehrass-Stuedli, D. Boykin, R. R. Tidwell, R. Brun // *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. – 2011. - Vol. 55, No. 7. - P. 3439–3445

15. Montero, E. Babesia divergens apical membrane antigen 1 and its interaction with the human red blood cell [Text] / E. Montero, M. Rodriguez, Y. Oksov, C. A. Lobo // *Infect. and Immun.* – 2009. - Vol. 77, No. 11. – P. 4783-4793.

16. Bosman, A. M. *Babesia lengau* sp. nov., a novel Babesia species in Cheetah (*Acinonyx jubatus*, Schreber, 1775) populations in South Africa [Text] / A. M. Bosman, M. C. Oosthuizen, M. A. Peirce [et al] // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. - Vol. 48, No. 8. – P. 2703-2708

17. Holman, P. J. In vitro cultivation of a zoonotic Babesia sp. isolated from eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) on nantucket Island, Massachusetts [Text] / P. J. Holman, A. M. Spencer, R. E. Droleskey [et al] // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. - Vol. 43, No. 8. – P. 3995-4001.

18. Lehtinen, L. E. In vitro cultivation of a newly recognized Babesia sp. in dogs in North Carolina [Text] / L. E. Lehtinen, A. J. Birkenheuer, R. E. Droleskey, P. J. Holman // *Veterinary Parasitology*. – 2008. - Vol. 151. - P. 150–157.

19. Guan, G. Course of infection by Babesia sp. BQ1 (Lintan) and B. divergens in sheep depends on the production of IFN γ and IL10 [Text]//G. Guan, A. Chauvin, H. Yin [et al] // *Parasite Immunology*. - 2010. - Vol. 32. - P. 143–152.

20. Hunfeld, K. P. Babesiosis: recent insights into an ancient disease [Text] / K. P. Hunfeld, A. Hildebrandt, J.S. Gray // *Intern. J. Parasitol.* – 2008. - Vol. 38. - P. 1219-1237.

21. Shah, J. S. Human babesiosis and ehrlichiosis – current status [Text] / J.S. Shah, R. Horowitz, N. S. Harris // *European infectious disease*. – 2012. - Vol. 6, No. 1. – P. 49–56.

22. Zweygarth, E. In vitro cultivation of Babesia equi: detection of carrier animals and isolation of parasites [Text] // E. Zweygarth, M. C. Just, D. T. De Waal // *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. – 1997. - Vol. 64. – P. 51-56.

UDC: 576.893.192.6:57.053(076)

METHODS OF THE BABESIOSIS MODERN DIAGNOSTICS. QUALITY CRITERIUM.

ADVANTAGES AND LIMITATIONS (First report)

Pokhyl S. I., Torianik I. I., Tymchenko O.

M., Chygyrynska N. A., Kostyria I. A.

Introduction. Babesia spp. is a tick-transmitted protozoan parasite, one of the causative agents of piroplasmosis (babesiosis). The disease is characterized by signs of malaise, inappetence, fever, hemolytic anemia and hemoglobinuria. The parasite has a wide distribution

and occurs on all continents, except Australia. The life cycle of the parasite in animals organism (equine hosts, cattle, raveling dogs, cats) comprises two intracellular stages: sporozoites inoculated by infected ticks develop into schizonts within lymphocytes where they multiply and subsequently transform into microzoites, which then invade erythrocytes. **Purpose and tests** was to study the retrospective analysis of scientific reports about classic and modern microscopic and culture technique of blood smear staining. **Materials and methods** The objects of this investigations are the retrospective analysis of Ukrainian, European and pan American scientific papers (reports) about using classic and modern microscopic and culture technique of blood smear staining. **Results of the study.** As the result of the study (theoretic and patent literature analysis) it was revealed that the used microscopic (by Romanovsky, Write, Papengaim, Nocht) and culture 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 wide 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 grey and blur in their contours were striking. Erythrocytes were bright braun, characterized by a round shape and presence of clarification in their centre (discocytes). Single sajes were well discerned; determination of their quantity was not a problem. The cytoplasm of leukocytes was notable for its gray and the nuclei for their violet-red tints. The colour of the granules was saturated, up to blue. 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 red-grey, with a well-outlined border and evident changes of the superficial architectonics (echino-, dacryo-, stomato-, ovalo- and microspherocytes). 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 demonstrated numerous aggregations of thrombocytes 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 wide 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:** investigations of the scientific reports about the declared technique (microscopic and culture) of staining of blood smears from domestic dogs and cattie have been proved that is a qualitative, economically sound and technically available method of rapid diagnosis of haemoparasitic diseases like babesiosis.

Keywords: retrospective analysis scientific reports, classic and modern microscopic methods, culture technique, blood smears staining, domestic dogs, cattie, babesiosis.