

УДК: 619.616.993.192

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРАСИТЕЛЯ БРИЛЛИАНТОВОГО КРЕЗИЛОВОГО СИНЕГО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БАБЕЗИОЗА СОБАК

¹Голубцов А.В. – к.в.н., доцент, ¹Семёнов С.Н. – к.в.н., доцент, ^{1,2}Ромашов Б.В. – д.б.н., профессор, ^{1,3}Михайлов Е.В. – к.в.н., доцент, ¹Фальков М.А. – аспирант
¹ФГБОУ ВО «Воронежский ГАУ», ²ФГБУ «Воронежский государственный заповедник», ³ГНУ ВНИВИПФиТ

Ключевые слова: бриллиантовый кристаллический синий, диагностика бабезиоза, окраска ретикулоцитов

Keywords: brilliantcresylblue, diagnosis of babesiosis, reticulocyte staining

РЕФЕРАТ

Диагностика бабезиоза по результатам исследований фиксированных и окрашенных мазков крови и в настоящее время остается одним из основных методов. Поэтому поиск альтернативных красителей позволяющих уменьшить время окраски мазков крови, повысить их диагностическое качество, удешевить диагностические мероприятия, адаптировать методику исследования для производственных условий, а также снизить токсическое влияние реагентов на исследователя является актуальной. В работе представлены материалы по использованию для диагностики бабезиоза животных альтернативного витального красителя, которым является бриллиантовый кристаллический синий. Окрашивание бабезий с помощью данного красителя возможно по одной из двух предлагаемых методик. Первая методика предполагает проведение окраски путём добавления 1 капли концентрированного красителя в пробирку, содержащую 0,5-1,0 мл стабилизированной антикоагулянтной крови и приготовления мазка через 7-10 минут после этого. Вторую методику можно выполнять сразу на предметном стекле путём смешивания 1 капли красителя и 1 капли крови, не содержащей антикоагулянта и приготовления мазка, который необходимо поместить во влажную камеру на 7-10 минут. Бабезии при окрашивании бриллиантовым кристаллическим синим приобретают темно-синий цвет внутри светло-желтых, светло-салатовых или светло-розовых эритроцитов. Среди подобных методов предлагаемый способ окраски отличается простотой в выполнении, так как не требует применения токсичных фиксаторов, приготовления растворов, что сокращает затраты времени на проведение исследований. При этом данный метод окраски обладает высокой диагностической эффективностью, обеспечивая четкую визуализацию бабезий как в эритроцитах, так и плазме крови, исключает появление артефактов, а соответственно и ложно положительных или ложно отрицательных результатов. Применение данного способа и красителя экономически выгодно не только при единичных исследованиях, но и при массовых обследованиях и диспансеризации животных. Предложенный способ окраски предполагает реальную возможность выполнения массовых диагностических исследований в производственных условиях.

ВВЕДЕНИЕ

Бабезиоз – природно-очаговая облигатно-трансмиссивная протозойная болезнь, вызываемая беспигментными эндоглобулярными кровепаразитами семейства Babesiidae рода *Babesia* (= *Piroplasma*) (*Babesiabovis*, *B. canis*, *B. microti*, *B. divergens*, *B. ovis*, *P. bigeminum* и др.) [2, 6]. Бабезиоз относится к тяжелым заболеваниям сельскохозяйственных животных и имеет важное экономическое значение, существенно влияя на здоровье и продуктивность животных, увеличивая затраты на диагностику и ветеринарно-санитарные мероприятия [1, 2].

Диагностика бабезиоза по результатам исследований фиксированных и окрашенных мазков крови и в настоящее время остается актуальной [2, 4, 5, 6]. Однако нередко у бабезий возникает морфологическая изменчивость, затрудняющая интерпретацию результатов и постановку правильного диагноза. При этом исследователи выявляют овальные, амёбовидные, серповидные и даже точечные формы паразитов. В этой связи очень важно дифференцировать бабезии от различных телец-включений (тельца Хауэла-Жолли и тельца Гейнца), а также сгустков красителя и других артефактов [3].

Цель нашей работы была обусловлена поиском красителей улучшающих эффективность микроскопической диагностики бабезиоза, за счёт уменьшения времени окраски мазков, повышения диагностического качества мазков крови, удешевления диагностических мероприятий, адаптации исследований для производственных условий, а также снижения токсического влияния реагентов на исследователя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованию были подвергнуты образцы крови в количестве 20 от зараженных бабезиями собак. Из анамнеза известно, что собаки были подвержены нападению клещей и у них возникли клинические признаки, характерные для развития бабезиоза.

В качестве сравниваемых красителей использовали концентрированные раство-

ры: 1) азур-эозин по Романовскому; 2) коммерческий набор Дифф-Квик; 3) бриллиантовый крезильовый синий. Окраску образцов крови проводили согласно наставлениям по применению данных красителей. По результатам исследований сделали сравнительный анализ с указанием преимуществ и недостатков каждого из красителей и способов окрашивания мазков крови при диагностике бабезиоза.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использование красителя азур-эозин по Романовскому в настоящее время остается эталонным для окраски крови при выявлении различных патологий. Недостатками при работе с раствором азур-эозина по Романовскому является необходимость приготовления для исследования свежего рабочего раствора красителя, контроль pH дистиллированной воды или применения буферного раствора, обязательная фильтрация рабочего раствора, фиксация препарата крови перед окрашиванием, длительное время окрашивания препарата крови, необходимость использования большого количества лабораторной посуды (киюеты для приготовления рабочего раствора красителя, для фиксации, окрашивания и промывания).

В недавнее время в России появился коммерческий набор для быстрого окрашивания мазков крови Дифф-Квик. Применение данного набора позволяет приготовить препарат для исследования в течение 2,5 минут. Недостатками при работе с коммерческим набором типа Дифф-Квик является использование нейротоксичного метилового спирта для фиксации препарата (фиксатор входит в набор).

В настоящее время при оценке интенсивности эритропоза используется бриллиантовый крезильовый синий, который в основном окрашивает трикулоциты. При его применении мы отметили, что этот витальный краситель также хорошо прокрашивает и простейших внутриклеточных паразитов, в первую очередь бабезий.

Техника окрашивания осуществляется следующим образом.

Первый вариант, в пробирку, содержащую 0,5-1 мл стабилизированной антико-

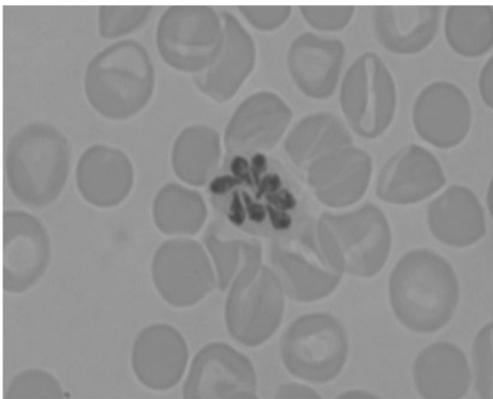


Рис. 1. Бабезии после окрашивания бриллиантовым крезильным синим в мазке крови от собаки (увеличение x100, ориг.).

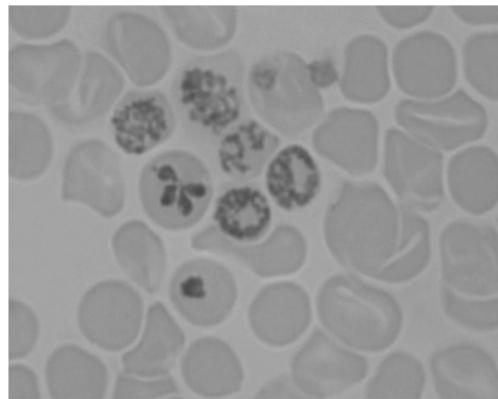


Рис.2.Бабезии после окрашивания бриллиантовым крезильным синим в мазке крови от собаки (увеличение x100, ориг.).

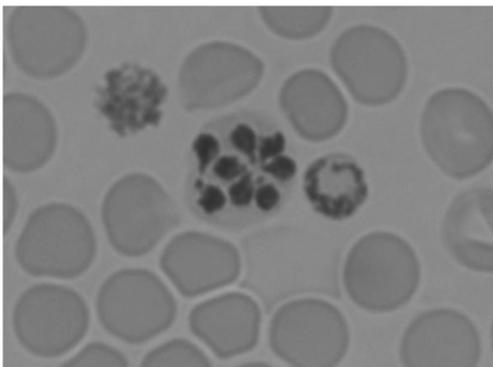


Рис. 3. Бабезии после окрашивания бриллиантовым крезильным синим в мазке крови от собаки (увеличение x100, ориг.).

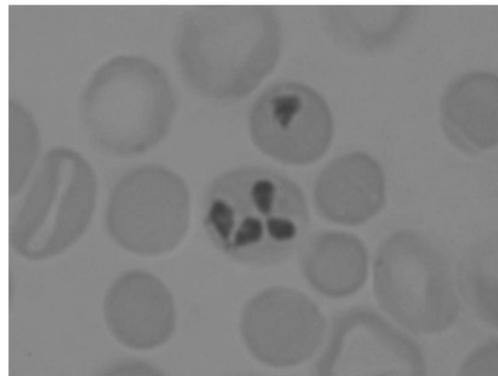


Рис. 4. Бабезии после окрашивания бриллиантовым крезильным синим в мазке крови от собаки (увеличение x100, ориг.).

агулянтном крови, вносят одну каплю концентрированного красителя – бриллиантового крезильного синего. Время окрашивания составляет 7-10 минут. После этого готовят мазок крови по общепринятой методике, высушивают его на воздухе в течение 10-15 секунд и исследуют с помощью иммерсионной системы микроскопа.

Второй вариант, окрашивание можно проводить непосредственно на предметном стекле путем смешивания капли кро-

ви (при взятии крови из краевой ушной вены) с одной каплей бриллиантового крезильного синего. После этого готовят мазок крови по общепринятой методике сразу помещают его во влажную камеру на 7-10 минут, затем высушивают на воздухе и исследуют с помощью иммерсионной системы микроскопа.

Бабезии при окрашивании бриллиантовым крезильным синим приобретают темно-синий цвет внутри светло-желтых, светло-салатовых или светло-розовых эритроцитов (рис. 1-4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный способ окраски крови красителем бриллиантовым крезиловым-синим при диагностике бабезиоза характеризуется простотой в выполнении и высокой диагностической эффективностью. При минимальных затратах времени на изготовление препарата краситель обеспечивает высокое диагностическое качество мазков крови, которые не содержат осадка частиц красителя на эритроцитах, что наблюдается при других известных способах окраски. Предложенный способ окраски предполагает реальную возможность выполнения многочисленных (массовых) диагностических исследований в производственных условиях.

Весомым преимуществом данного способа является применение однокомпонентного красителя и небольшой его расход. Данный способ позволяет отказаться от необходимости применения дистиллированной воды, предварительного разведения красок, использования фиксирующих растворов (в том числе метанола) и как следствие большого количества лабораторной посуды. Применение данного способа (и красителя) экономически выгодно не только при единичных исследованиях, но и в особенности при массовых обследованиях и диспансеризации животных.

USE OF THE DYE OF BRILLIANT CRESIL BLUE FOR DIAGNOSTIC OF BABESIOSIS OF DOGS

¹Golubtsov A.V., ¹Semenov S.N., ^{1,2}Romashov B.V., ^{1,3}Mikhailov E.V., ¹Falkov M.A.

¹Voronezsky State Agrarian University, ²Voronezsky State Reserve, ³SSI ARVRIPP of the RAAS

ABSTRACT

Diagnosis of babesiosis according to the results of studies of fixed and stained blood smears and currently remains one of the main methods nowadays. Therefore, the search for alternative dyes to reduce the time of staining blood smears, increase their diagnostic quality, reduce the cost of diagnostic measures, adapt the research methodology for production conditions, and also reduce the toxic effect of reagents on the researcher is relevant. The paper presents materials on

the use for the diagnosis of babesiosis of animals of an alternative vital dye, which is brilliantcresil blue. *Babesia* staining using this dye is possible according to one of two proposed methods. The first technique involves staining by adding 1 drop of concentrated dye to a test tube containing 0.5-1.0 ml of stabilized anticoagulant blood and preparing a smear 7-10 minutes after that. The second technique can be performed immediately on a glass slide by mixing 1 drop of dye and 1 drop of blood not containing an anticoagulant and preparation of a smear, which must be placed in a moist chamber for 7-10 minutes. *Babesia*, when stained with brilliantcresil blue, acquire a dark blue color inside light yellow, light green or light pink red blood cells. Among these methods, the proposed method of coloring is easy to perform, since it does not require the use of toxic fixatives, preparation of solutions, which reduces the time spent on research. At the same time, this staining method has high diagnostic efficiency, providing a clear visualization of babesia in both red blood cells and blood plasma, eliminates the appearance of artifacts, and, accordingly, false positive or false negative results. The use of this method and dye is economically advantageous not only for single studies, but also especially for mass examinations and medical examination of animals. The proposed method of stain suggests a real opportunity to perform mass diagnostic tests in a production environment.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белименко, В.В. Экономический ущерб, причиняемый пироплазмозами сельскохозяйственным животным в России / В.В. Белименко, А.М. Гулюкин, Е.В. Новосед // Ветеринария Кубани. – 2017. – №2. – С. 6-7.
2. Заблоцкий, В.Т. Бабезиоз (пироплазмоз) крупного рогатого скота / В.Т. Заблоцкий, В.В. Белименко, Н.А. Ахмадов // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2012. – № 1. – С. 43-44.
3. Луцук, С.Н. Морфология, биология и лабораторная диагностика возбудителей протозойных заболеваний животных / С.Н. Лу-

- цук, А.А. Водянов, В.П. Толоконников и др. – Ставрополь: АГРУС, 2009. – 60 с.
4. Стайков, В.В. Бабезиоз / В.В. Стайков // Ветеринария с.-х. животных. – 2007. – №7. – С. 23-25.
5. Терлецкий, А. Биология паразитирования и методы цитологической диагностики пред-
ставителей рода *Babesia* в крови животных и человека / А. Терлецкий, Л. Ахмерова, Э. Галиева и др. // Ветеринария с.-х. животных. – 2009. – №9. – С. 41-43.
6. Uilenberg G. *Babesia* – a historical overview / Uilenberg G. // Vet. Parasitol. – 2006. – №138. – P. 3-10.

УДК 636.2:612.64.089.67

ВЛИЯНИЕ КРАТНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРОВ-ДОНОРОВ НА ВЫХОД ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Л.В. Голубец¹, А.С. Дешко¹, Ю.А. Якубец¹, Д.В. Машталер², В.И. Белевич¹, Н.И. Целуева³, Д.Н. Кольцов³

¹ - УО «Гродненский государственный аграрный университет», ² - ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела», ³ - ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур»

Ключевые слова: крупный рогатый скот, донор, ооцит, *in vitro*, трансвагинальная аспирация ооцитов (ТАО), фолликул, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), воспроизводство животных, трансплантация эмбрионов. **Key words:** cattle, donor, oocyte, *in vitro*, transvaginal oocyte aspiration (TOA), follicle, *in vitro* fertilization (IVF), animal reproduction, embryo transplantation.



РЕФЕРАТ

Известно, что с разработкой технологии искусственного осеменения, позволившей получать от одного производителя десятки тысяч потомков, роль быков в совершенствовании стада резко возросла. В то же время роль маток осталась на прежнем уровне. В условиях промышленной технологии за всю продуктивную жизнь она может произвести от 3 до 6 телят, в то время как в их яичниках насчитывается десятки тысяч потенциальных яйцеклеток. В работе представлены впервые проведенные в Республике Беларусь результаты исследований по изучению влияния биологических факторов прямого и опосредованного влияния на эффективность получения ооцитов в системе трансвагинальной аспирации. По результатам исследований не установлено достоверных различий по влиянию количества аспираций на выход ооцитов. Наибольшее количество ооцитов отличного и хорошего качества было отмечено у группы животных, аспирация у которых проводилась раз в неделю и составило 24,1%. Уровень извлекаемости ооцитов с частотой извлечения каждые 7 дней снижался по сравнению с частотой извлечения в 3 дня на 10,0 п.п. Вместе с тем выход ооцитов отличного и хорошего качества увеличивался незначительно (на 4,5 п.п. так же, как и выход пригодных клеток в целом, – на 2,9 п.п.) и находился в пределах погрешности. По количеству извлеченных ооцитов 78% животных показали более высокий результат через 7 дней. У доноров с количеством аспираций от 20 до 30 выход жизнеспособных клеток увеличивался до 84,4%. Полученные данные имеют практическую значимость для разработки технологии получения эмбрионов *in vitro* в системе трансвагинальной аспирации ооцитов, использование которой будет способствовать ускорению селекционного процесса и повышению эффективности селекционно-племенной работы в скотоводстве в целом.