

УДК: 616:612.6.993.-192.[57.083(076)]

ПОРІВНЯЛЬНА ЦИТОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА МАЗКІВ КРОВІ ПРИ БАБЕЗІЙНІЙ ІНФЕКЦІЇ

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»

Мікроскопічний метод (ММ) до теперішнього часу залишається найпоширенішим при лабораторній діагностиці бабезійної інвазії (БІ) і ґрунтується на виявленні при світловій мікроскопії з масляною імерсією трофозоїтів і мерозоїтів бабезій в еритроцитах (клітини-мішені для паразитів) тонких, товстих або комбінованих (тонкий-товстий) мазків крові пацієнтів із можливим перебігом бабезіоза. Виявлення методом світлової мікроскопії інтраеритроцитарних паразитів - *Babesia* spp. у забарвлених мазках крові є безсумнівним лабораторним критерієм для встановлення (підтвердження) видової етіології БІ [1,2,3,4,5,6].

Основними (послідовними) етапами ММ виявлення бабезій є: приготування препаратів мазків крові (суспензій еритроцитів), фарбування фіксованих мазків та їх мікроскопічний аналіз. Якщо етапи приготування препаратів мазків крові та мікроскопічний аналіз останніх є достатньо уніфікованими (практично в усіх країнах світу фахівцями медичної і ветеринарної галузі застосовуються майже їх тотожні технології), то етап фарбування мазків крові суттєво варіює. Найчастіше з цією метою застосовують метод фарбування за Романовським-Гімзе (класичний та у його різних модифікаціях, у переважній більшості зарубіжних наукових праць цей метод має назву "Gimsa"). У меншій мірі для фарбування мазків крові з метою виявлення гемопаразитів використовують методи Райта, Папенгейма і Нохта [7,8,9,10]. Слід зазначити, що класичний метод фарбування за Романовським-Гімзе, який широко застосовується у закладах охорони здоров'я України при проведенні типового клінічного аналізу крові, суттєво відрізняється від модифікації цього методу з метою його цілеспрямованого використання для діагностики гемопаразитарних інфекцій (у тому числі – БІ). Для останньої мети метод фарбування мазків крові за Романовським-Гімзе стандартизований Clinical and Laboratory Standards Institute (США) і представлений (під назвою методу Гімзе) в "Laboratory Diagnosis of Blood-borne Parasitic Diseases. Approved Guideline" (CLSI M15-A) [11]. Стандартизований для виявлення гемопаразитів метод Романовського-Гімзе відрізняється від його класичного варіанту буферністю і зсувом у лужний бік розчину фарбника, суттєво нижчим рівнем концентрації останнього в робочому розчині, наявністю у ньому фарбника детергенту, значним збільшенням часу контакту фарбника із клітинами крові, що у цілому забезпечує

його більш ефективне проникання в еритроцити та більш якісне (диференційне) забарвлення паразитів.

На теперішній час в Україні не розроблено і не впроваджено (згідно з наказом МОЗ України від 28.09.2012 р., №751 "Про створення і впровадження медико-технологічних документів по стандартизації медичної допомоги в системі Міністерства охорони здоров'я України") як уніфікованих, так і тимчасових медичних стандартів (клінічних і діагностичних протоколів) для надання медичної допомоги при БІ. Незважаючи на перші зафіксовані і достовірно підтвержені (за участю фахівців США) випадки захворювання на бабезіоз в Україні (нажаль, з літальними наслідками) [12], працівники різних спеціальностей медичної галузі і на сьогодні залишаються не поінформованими про ризики захворювання людей на цей паразитоз, його клінічні прояви, досягнення і можливості щодо проведення діагностики, лікування та профілактики бабезіоза. Пацієнти, що постраждали від укусу кліща (або отримали переливання крові чи її компонентів), і у яких з часом виникло захворювання подібне на бабезіоз не направляються для лабораторного обстеження (у тому числі для виявлення збудника у крові) з метою його діагностики. Більш того, в музеях (колекціях) мікроорганізмів науково-дослідних установ НАН, НАМН, МОЗУ, НААУ відсутні штами найпростіших роду *Babesia*, котрі могли бути використані для проведення відповідних наукових досліджень та у педагогічному процесі для навчання медичних фахівців у ВНЗх і навчальних закладах післядипломної підготовки.

Навпаки, фахівці ветеринарної медицини в Україні є більш обізнаними щодо БІ (раніше відомими як піроплазмоз) у сільськогосподарських і домашніх тварин [13]. Ними встановлено тенденції значного поширення осередків та зростання інтенсивності епізоотій бабезіоза серед зазначених груп тварин. Наприклад: у цілому рівень захворюваності ВРХ з тяжким перебігом бабезіоза становить (3,5 - 5,4) %, серопозитивними щодо його збудників є близько 25 % цих тварин, а в деяких регіонах на півдні України, районах Полісся і Лісостепу зараженість ВРХ бабезіями може досягати рівня (75-100) %; ураженість домашніх собак цим протозоозом у період із кінця весни до початку осені сягає близько 30 % [14]. Важливими обставинами є і широкий спектр видів *Babesia* (великорозмірних і дрібних видів), серед яких одні здатні викликати захворювання у людей, а інші - за морфологічними та біологічними характеристиками у цілому подібні до збудників бабезіоза у людей.

Мета дослідження провести порівняльну цитологічну діагностику мазків крові від об'єктів з бабезійною інфекцією.

Матеріали та методи. Матеріалом дослідження стали зразки крові ($\Sigma=31$) від об'єктів (свійських собак) з високим рівнем вірогідної інфікованості бабезіями: *B. divergens*, *B. canis*, *B. gibsoni* ($n=18$) та контрольних ($n=13$), що виявились здоровими неінфікованими паразитами особинами та цілком відповідали за

статево-віковими, показниками експериментальним особинам. Препарати крові, отримані від обстежених слугували об'єктом цитологічного аналізу для встановлення поширеності і якісного характеру змін, що відбуваються при БІ у клітинах. Матеріал отримували на базі приватних ветеринарних клінік «Айболіт» та «Центр ветеринарної медицини» профільними спеціалістами згідно договорів про співпрацю №1-3/2010 від 26.04.2010 року (поновлений 2014 року). Спостереження над тваринами, встановлення клінічного діагнозу, проведення (у динаміці) серологічного дослідження крові останньої проводились кваліфікованим лікарями ветеринарної медицини. Термін спостереження за піддослідними становив 12 діб, так як у цей часовий період досягала максимального значення концентрація збудників у тканинах і органах тварин [15]. Всі заплановані планом дослідження процедури із ними виконувались у чіткому дотриманні основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментальних наукових цілях" від 18.03.1986 р., Директива ЄВС за № 609 від 24.11.1986 р. Виготовлення мазків крові, їх фіксування, фарбування (азуром та еозином, метиленовою синькою) проводили за методами Романовського-Гімзе (у стандартизованій модифікації CLSI M15-A), Райта, Папенгейма, Нохта за чим здійснювався мікроскопічний аналіз (мікроскоп ЛОМО; х 400; х 600; х 1000).

Результати дослідження.

У результаті мікроскопічного аналізу було встановлено, що у зразках препаратів з високим рівнем інфікованості бабезіями, гемопаразити виявлялись у 81,8 % випадків. Збудники характеризувались наявністю локальної концентрації, нерівномірністю розповсюдження у крові (внаслідок чого з'являлось мозаїчне розподілення збудників у мазках [15,16]) та асиметрією показників, незалежно від рівня виявлення бабезій. За нашими спостереженнями, рівень паразитемії при БІ залежить від багатьох чинників, у тому числі, від стадії та форми перебігу хвороби. Фахівці ветеринарної медицини, які здійснювали відбір зразків крові від піддослідних тварин, вказують на те, що ці зразки крові було відібрано на ранній стадії захворювання тварин (стосовно зразків крові від собак, при першому зверненні їх хазяїна для отримання ветеринарної

допомоги) та, ймовірно, при підгострій формі перебігу гемопаразитозу. Слід також акцентувати увагу на технічній складності, високій праце- і часозатратності визначення показника рівня паразитемії (потребує мікроскопічного перегляду не менше ніж 300 полів зору з підрахунком у них загальної кількості еритроцитів та цих же клітин, які містять паразитів). Тому, є цілком виправданими рекомендації фахівців Центру контролю і профілактики захворювань (CDC, США), згідно яких безсумнівним лабораторним критерієм для встановлення (підтвердження) етіологічного діагнозу бабезіоза є сам факт виявлення методом світлової мікроскопії інтраеритроцитарних форм паразитів у мазках крові без визначення рівня паразитемії [17]. Таким чином, як теоретичного, так і практичного визначального значення для мікроскопічного методу виявлення бабезій і встановлення якісних цитологічних змін при БІ набувають результати опису особливостей морфології та диференційного забарвлення еритроцитів (клітини-мішені) і самих гемопаразитів при різних способах фарбування: стандартизованим методом Романовського-Гімзе у модифікації CLSI M15-A та Райта. Результати цих досліджень викладено у формі послідовних описів (кожного із зазначених методів): препаратів мазків контрольних зразків крові від донорів; препаратів мазків зразків крові із високим рівнем вірогідної інфікованості бабезіями та з описом останніх.

У результаті мікроскопічного дослідження препаратів мазків контрольних зразків крові, забарвлених стандартизованим методом Романовським-Гімзе у модифікації CLSI M15-A (далі за Романовським-Гімзе), було встановлено, що популяція еритроцитів циркулюючої крові являла собою масштабні, однорідно щільні поля клітин, характерно розташовані у площині всього мазка, головним чином, у вигляді двояковигнутих (дискоцити) дисків (лінз). Клітинні маси були представлені чітко диференційованими накопиченнями або окремо розташованими елементами, забарвленими у блакитно-сірий колір (із більш насиченим за концентрацією барви центром та менш контрастною периферією). Типових для еритроцитарної ланки гемопоєзу проявів бета-фолієводефіцитної анемії (ретикулоцитоз, поліхромазія) з появою великих, сіро-блакитних з домішками рожевого кольору еритроцитів виявлено не було.

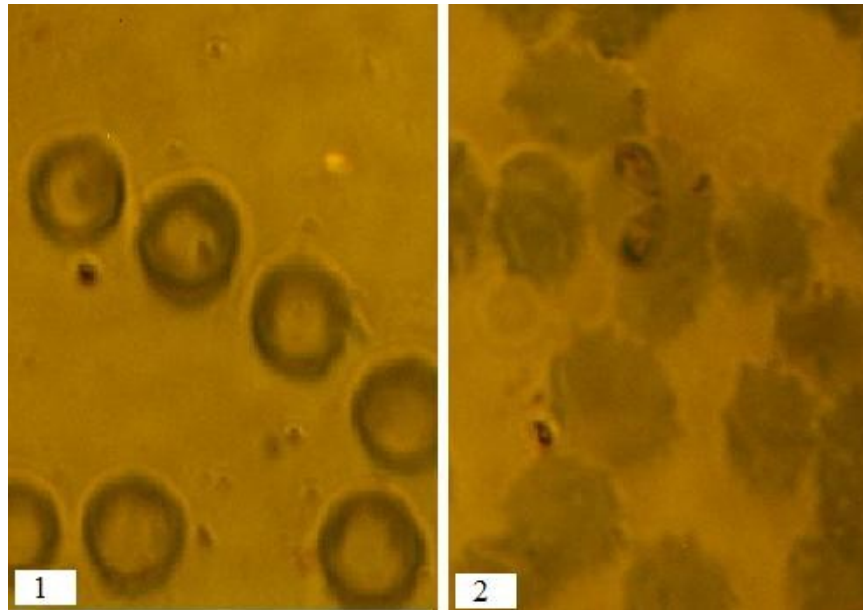


Рисунок 1. – Препарати мазків крові забарвлених стандартизованим методом Романовського-Гімзе (збільшення $\times 1000$). 1 – еритроцити без ознак наявності інтраклітинних форм бабезій; 2 – еритроцити із інтраклітинними мерозоїтами (парна грушоподібна форма) великорозмірних бабезій.

Фрагментовані клітини, різні за величиною та формами (шизоцити), що вважаються цитологічними ознаками мікро- та макроангіопатичної гемолітичної анемії відсутні. Пойкіло- та анізоцитоз підкреслювали наявність різновидів еритроцитів за формою та розміром. Змін об'ємних параметрів еритроцитів (сферо-, овалцитоз), поверхневої цитоархитектоніки (ехіно-, дегмато-, стомато-, акантоцитоз, тощо), ознак

серповидноклітинної анемії (серповидні клітини) не спостерігали. Мішенеподібних клітин (еритроцитів із надто щільно забарвленим центром, зовнішнім обідком та кільцем просвітлення між ними: таласемія) не відмічали. Еритроцити у вигляді краплі, що падає до низу, у представлених зразках не зустрічались. Феномени сладжування або формування «монетних стовпчиків» залишались відсутніми.

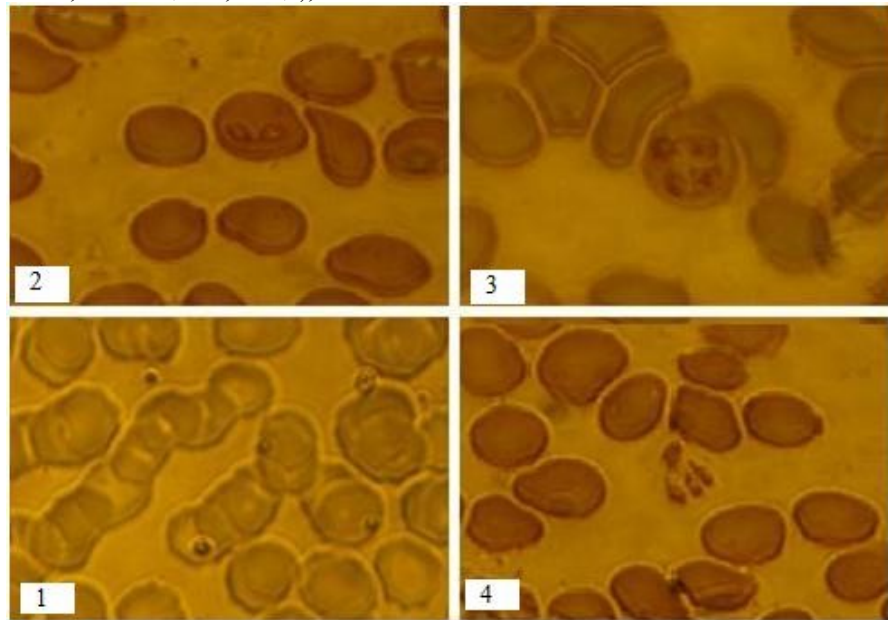


Рисунок 2. - Мазки крові, забарвлені за методом Райта у авторській модифікації (збільшення $\times 1000$). 1 – інтра- і екстраеритроцитарні трофозоїти малорозмірних бабезій, кільцеподібна форма; 2 – інтраеритроцитарні мерозоїти великорозмірних бабезій, парна грушоподібна форма; 3 – інтраеритроцитарні мерозоїти великорозмірних бабезій, форма «мальтійський хрест»; 4 – екстраеритроцитарні спорозоїти великорозмірних бабезій.

Патологічні зміни, на кшталт, появи цитоплазматичної зернистості у вигляді тілець Хоуелла-Жоллі, Гейнца, Паппенгеймера, базofilної зернистості не виявлені. Наявності кілець Райта, ушкоджень мембранних компонентів у поточній серії досліджень встановлено не було.

За даними мікроскопічного аналізу мазків зразків крові із високим рівнем вірогідної інфікованості бабезіями, забарвлених за Романовським-Гімзе, було встановлено, що циркулююча популяція еритроцитів, мезо- та гіпохромна, помірно контрастна. У площині мазка розташовується неоднорідно, як правило, у вигляді гетерогенних асоціацій. щільність розташування яких прогресивно зменшувалась від центру препарату до його периферії (країв, косичок). Скупчення еритроцитів морфологічно виразні, з контрастними краями, позначеним запалим центром. Адсорбційні властивості застосованих розчинів барвників сприяють візуалізації клітинних елементів на імерсійному збільшенні ($\times 1000$).

Позначена дисперсія субпопуляцій еритроцитів проявлялась розвитком феноменів пойкилоцитозу та анізоцитозу, без виразної чи помірної поліхромазії. Рівень чисельності нормоцитів у клітинній популяції циркулюючої ланки крові, взятої від хворих тварин, порівняно з інтактним контролем нижчий (87,5 %). Однак, перевага дискоцитів у кожному із проаналізованих зразків препаратів залишалась стабільною. Ймовірність явища поліхромазії, яке пов'язують із появою та накопиченням ретикулоцитарних клітин і, відповідно до цього, розвитком ретикулоцитозу, виключно ресурсами згаданого методу забарвлення, встановлена не була. За для уточнення був запланований додатковий крок із застосуванням барвника Райта. Результати підрахунків свідчили на користь перевищення 1 % ретикулоцитів від загального числа еритроцитарних клітин у мазку. Як і очікувалось, колір ретикулярних клітин мав сіро-фіолетовий відтінок на тлі темно-, тьмяно-, блакитно-сірого кольору еритроцитів. Типової гетерохроматофілії встановлено не було, проте, деталізація морфологічних форм еритроцитів (ехіно-, дегма-, сферо-, не часто овало-, поодинокі стоматоцити) виявилась можливою за рахунок виразної дисперсії останніх у мазках. Детальний цитологічний аналіз препаратів зразків мазків крові від хворих тварин продемонстрував наявність слабких вторинних ознак мікро- та макроангіопатичної гемолітичних анемії з появою на цьому тлі невеликої кількості ($n=1-3...4$ у полі зору мазка) різних за розмірами фрагментованих клітин (шистоцити). Наявність стійкої динаміки у виявленні ізоцитозу ($d_{\text{etc}}=7,5-8,0$ мкм) спонукало до цілковитого відхилення підозр на користь циркуляції у кровообігу хворих тварин макро- та мікроцитів. Ретельний аналіз внутрішньоклітинних включень еритроцитів у мазках, забарвлених за методом Романовського-Гімзе не підтвердив наявності останніх в жодному із випадків, що складала вибірку наших дослідів.

Оглядовий мікроскопічний аналіз препаратів мазків крові визначив наявність окремих клітин лейкоцитарного спектру (юні та паличкоядерні,

нейтрофільні гранулоцити ($n=4-8...12$ у полі зору препарату); базofilні гранулоцити ($n=2-4...7$ у полі зору препарату); лімфоцити та моноцити ($\Sigma=0-2-3$ у полі зору препарату). Особливість забарвлення зазначених клітин чітко співпадала із їх описом у "Laboratory Diagnosis of Blood-borne Parasitic Diseases. Approved Guideline" (CLSI M15-A). Поява мегакаріоцитів у досліджених зразках препаратів не відмічалась ($n=0$). Тромбоцитарні пластини мали блідо-синю цитоплазму і зустрічались у вигляді вкрай малочисельних юних (з поодинокими азурофільними гранулами, $n=2-3$ у полі зору препарату) та зрілих (з виразною азурофільною зернистістю, $n=1-3$ у полі зору препарату) форм.

При мікроскопічному аналізі мазків зразків крові із високим рівнем вірогідної інфікованості бабезіями було з'ясовано, що найбільш ефективною є мікроскопічне виявлення бабезій у найтонших, маргінальних ділянках мазків. Ними є зони максимального наближення до верхнього, нижнього країв предметного скельця та так звані "косички" мазків (полос, протилежний нанесенню діагностичної краплі крові).

За результатами наших досліджень частота виявлення найпростіших роду *Babesia* з дрібним розміром клітин (види *B. gibsoni*, *B. divergens*, *B. canis*, *B. microti*) становила 92,3 %, що значно (P більше 0,05) перевищувало частоту (7,7 %) виявлення великорозмірних видів бабезій. Найбільш поширені збудники БІ у людей є малими за розміром видами паразитів, а великорозмірні види виявляють значно рідше [18,19,20], що додатково обґрунтовує правомірність виконання започаткованих досліджень щодо освоєння і удосконалення мікробіологічного та культурального методу виявлення бабезій із використанням інфікованої останніми зразками крові від тварин.

Міжнародним стандартом "Laboratory Diagnosis of Blood-borne Parasitic Diseases. Approved Guideline" (CLSI M15-A) при діагностиці БІ рекомендується виявляти інтраеритроцитарні форми бабезій, при цьому найбільш достовірну діагностичну значимість мають кільцеподібні (або грушоподібні) форми паразита, у яких за умови забарвлення стандартизованим методом Романовського-Гімзе цитоплазма набуває блакитного кольору, а ядро – рожевого, або – червоного. Наявність у мерозоїтів бабезій центральної вакуолі зсуває ядро до периферії клітини паразита, внаслідок чого вона набуває морфологічно подібного на перстень вигляду (із кулькою посередині, яка переломлює потік світла при мікроскопії). У цілому ж, виявлялись різноманітні форми паразитів: грушовидної, кільцевої, трапецієвидної (багатогранник), амебовидної, анулярної та інших (рис. 1). Інтраеритроцитарна локалізація бабезій виявлялась доволі різною, у окремих випадках вона була близькою до центру, частіше - маргінальною (край поверхневої мембрани) (P менше 0,05). У порівнянні із зазначеним частота виявлення екстраеритроцитарних паразитів була суттєво меншою (P менше 0,05). У таких випадках мала місце очевидна закономірність локалізації збудників у міжклітинних люфтах парами або

малочисельними групами від (3-4) до (6-8) елементів у полі зору мазка. Деякі збудники агрегувались на поверхні еритроцитів. У таких випадках проводили диференціальну діагностику мерозоїтів бабезій із тромбоцитарними пластинами та можливими артефактами від складових осаду застосованих барвників. Екстрацелюлярні форми збудників характеризувались кільцеподібною, трапецієвидною геометричною конфігурацією, краплеподібною, витягнутою ланцетоподібною, що, на нашу думку, теж доцільно враховувати в якості критерію наявності паразитів у крові.

За результатами освоєння і випробування стандартизованого методу фарбування за Романовським-Гімзе згідно із "Laboratory Diagnosis of Blood-borne Parasitic Diseases. Approved Guideline" (CLSI M15-A) виявлено ряд його недоліків, що, на нашу думку, суттєво ускладнюють впровадження цього методу в широку практику закладів охорони здоров'я. Такими недоліками є наступне: відмінність стандартизованого методу Романовського-Гімзе в модифікації CLSI M15-A від традиційного однойменного методу (який сьогодні повсемірно застосовується в медичній практиці), що обумовлює необхідність виготовлення окремих спеціальних розчинів барвників (їх комерційне виробництво не здійснюється) для відтворення стандартизованого методу; значна тривалість етапу фарбування (за рекомендаціями CLSI M15-A вона становить від 45 до 60 хвилин) та етапу висихання (тобто, зневоднення) забарвлених препаратів (рекомендації CLSI M15-A не передбачають можливості застосування спрямованого потоку повітря для прискорення цього процесу); недостатній рівень диференційного контрасту отриманого забарвлення інтраклітинних гемопаразитів і їх клітин-мішеней (еритроцити мають блакитно-сірий колір, а цитоплазма клітин паразита – блакитний), екстраеритроцитарних форм бабезій (особливо спорозоїтів), а також тромбоцитів і таких інтраеритроцитарних утворень, як кільця Кебота, тільця Хауелла-Жоллі та залишки (артефакти) осаду фарбника, котрі мають певну морфологічну подібність до бабезій, що потребує додаткових зусиль і часу для їх диференціювання при проведенні мікроскопічного аналізу мазків крові. Результати наших подальших досліджень показали, що застосування удосконаленого методу фарбування за Райтом дозволяє усунути вищезазначені недоліки.

Мікроскопічний аналіз препаратів мазків контрольних зразків крові, які були забарвлені за Райтом, показав, що популяція еритроцитарних клітин розташовувалась у вигляді однорідного пласту дискоцитів. Щільність розосередження еритроцитів від краю нанесення крапель апробованої крові до протилежного йому краю потенційно зменшувалась; упорядкованість локалізації клітин у площині мазка повздовж його країв видавалась більш виразною, ніж у центрі. Ознак стійкої агрегації еритроцитів як характерних артефактів виготовлення мазків не спостерігалось. На цьому тлі феноменів сладжування клітин або формування типових «монетних стовпчиків» не виявляли. Еритроцитарні поля мали гомогенну помаранчеву або насичену цегельного

відтінку забарвленість, що чітко контрастувала із оточуючими структурами, в тому числі, субпопуляціями лейкоцитарних клітин. Візуалізованість клітин у зазначеній серії мазків якісно відрізнялась від фарбованих стандартизованим методом Романовського-Гімзе у модифікації CLSI M15-A за рахунок контурованості поверхні, виразної контрастності структур, чітких обрисів еритроцитів, зрозумілої цитоархітектоніки, навіть тих, що знаходились у диспозиції до площини мазку. Відсутність гетерогенності адсорбованого барвника сприяли якісній діагностиці структурно-функціональних змін у кожному із зразків крові даної серії. В окремих препаратах (n=6) останньої було встановлено наявність різновидів за формою та розміром клітин (пойкіло- та анізоцитоз). Типових для еритроцитарної ланки гемопозу проявів бета-фолієводефіцитної анемії (ретикулоцитоз, поліхромазія) з появою великих, сіро-блакитних з домішками рожевого кольору еритроцитів у зазначеній серії препаратів виявлено не було. Фрагментованих клітин з різною величиною та формою (шизоцити), що вважаються цитологічними ознаками мікро- та макроангіопатичної гемолітичної анемії не виявлено. За умов контрольних спостережень фактів змін об'ємних параметрів еритроцитів (сферо-, овалоцитоз), поверхневої цитоархітектоніки (ехіно-, дегмато-, стомато-, акантоцитоз, тощо), ознак серповидноклітинної анемії (серповидні клітини) не спостерігалось. Мішенеподібних клітин у жодному із зразків препаратів зазначеної серії мазків крові (еритроцитів із надто щільно забарвленим центром, зовнішнім обідком та кільцем просвітлення між ними: таласемія) не відмічали. Патологічні зміни, на кшталт появи цитоплазматичної зернистості, не виявлені. Наявності кілець Райта, ушкоджень мембранних компонентів при виконанні даної серії досліджень встановлено не було.

За даними мікроскопічного аналізу мазків зразків крові із високим рівнем вірогідної інфікованості бабезіями, забарвлених за Райтом, встановлено, що клітинний пул еритроцитів представлений у вигляді чисельних гетерогенних популяцій, щільність розташування яких прогресивно зменшувалась від центру препарату до його периферії (країв, косичок). Асоціації еритроцитів чітко диференційовані. За рахунок високої адсорбційної функції барвника клітини характеризувались відмінною контрастністю маргінальних, центральних ділянок, залишались добре візуалізованими на імерсійному збільшенні ($\times 1000$). Позначена дисперсія субпопуляцій еритроцитів полягала у безперервній реєстрації феноменів пойкілоцитозу та анізоцитозу на тлі виразної поліхромазії, локальної та доволі малочисельної переваги нормоцитів (у вигляді двояковигнутих ліній/дискоцитів) у окремих зразках препаратів. Явище поліхромазії пов'язували лише з ретикулоцитарними клітинами та подальшим розвитком помірного ретикулоцитозу. Кількість згаданих клітин у крові суттєво (P менше 0,05) перевищувала 1-1,5 % від загального числа еритроцитів. Ретикулоцитоз проявлявся змінами з

характерного червоно-, темно-цегельного забарвлення еритроцитів на сіро-фіолетовий, тьмяно-бузковий, іноді тьмяно-рожевий кольори. Наявність поліхромазії сприяло розвитку феномену гетерохроматофілії, що створило умови для деталізації морфологічних форм клітин (ехіно, дегма, сферо і рідко- овалцити) та забезпеченню безперечної діагностичної переваги застосованої методики над попередніми. На цьому тлі показовими стали знахідка шистозита ($n=1$) та відсутність у мазках цієї серії зразків крові кодоцитів (дзвоноподібних/ мішенеподібних клітин). Морфологічний спектр еритроцитів залишався вільним від стомато, дрепано, дакриоцитів. У жодному із випадків не було знайдено хрестоматійних форм пойкилоцитів, бульбашкоподібних клітин. Наявність стійкої динаміки у виявленні ізоцитозу ($d_{\text{цит}}=7,5-8,0$ мкм) спонукало до цілковитого відхилення підозр на користь циркуляції у кровообігу хворих тварин макро- та мікроцитів. При проведенні ретельного аналізу внутрішньоклітинних включень еритроцитів у мазках даної групи зразків крові, забарвлених за Райтом, типових для даного методу забарвлення внутрішньоеритроцитарних включень не спостерігалось.

Оглядом мікроскопічним аналізом мазків зразків крові із високим рівнем вірогідної інфікованості бабезіями, було встановлено наявність окремих клітин лейкоцитарного спектру (юні та паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити, $n=4-8...12$ у полі зору препарату; базофільні гранулоцити, $n=2-4...7$ у полі зору препарату; лімфоцити; моноцити $\Sigma=0-2,...3$ у полі зору препарату). Наявність мегакаріоцитів у досліджених зразках препаратів цієї групи не відмічалась ($n=0$). Тромбоцитарні пластини зустрічались у вигляді вкрай малочисельних юних (з поодинокими азурофільними гранулами, $n=2-3$ у полі зору препарату) та зрілих форм (з виразною азурофільною зернистістю, $n=1-3$ у полі зору препарату).

У забарвлених за Райтом мазків зразків крові із високим рівнем вірогідної інфікованості бабезіями були виявлені (аналогічно як і при забарвленні стандартизованим методом Романовського-Гімзе) різноманітні форми гемопаразитів: інтраеритроцитарні – трофозоїти та мерозоїти; екстраеритроцитарні – спорозоїти, трофозоїти, мерозоїти, амебоїди. Застосування методу фарбування за Райтом забезпечує чітке, контрастно-диференційне забарвлення різних стадій розвитку як великорозмірних, так і дрібних видів бабезій (рис. 2).

Еритроцитарна ланка гемопоезу однією із перших реагує на гемопаразитарну інвазію та відповідає на неї розвитком виразної дисперсії форм циркулюючої фракції клітин. Ця відповідь носить як прямий, так і опосередкований характер, з певним поліморфізмом структурно- функціональних проявів. Морфологічна різнобарвність, що з'являється у відповідь на втручання гемопаразитів, пов'язана із вихідною гетерогенністю циркулюючої популяції еритроцитів і, як наслідок, різномірними проявами їх ураження бабезіями. При цьому, виявлені зміни клітинних компонентів крові опосередкованого

характеру, ймовірно, є наслідком ураження паразитами органів (кістковий мозок, селезінка, лімфатичні вузли), які на системному рівні здійснюють функцію гемопоезу (детальне вивчення зазначеного положення планується здійснити на подальших етапах виконання НДР - при розробці біологічного методу виявлення збудників БІ). На опосередковані (однак взаємопов'язані між собою реакції цілісного організму), накладаються зміни, зумовлені прямою взаємодією факторів клітинної популяції крові (мегакаріоцити, тромбоцитарні пластини, лейкоцитарна фракція), з одного боку, та власною фізіологічною реакцією судинної стінки (прискорений синтез та викид у кровообіг ендотелію у разі завданих ендотелію механічних ушкоджень гемопаразитами і отриманих внаслідок цього дефектів). За таким патогенетичним сценарієм структурно і функціонально найбільш уразливими клітинами крові стають еритроцити, чому у великій мірі сприяють відсутність у них (як зрілих форм клітин) систем репарації (не має синтезу ДНК, РНК, ліпідів *de novo*) та, як наслідок, низький адаптивний потенціал. Реакції еритроцитів на вплив збудників БІ носять неспецифічний характер і виражаються змінами морфології поверхневої архітекtonіки (поява у кровососному руслі ехіно, дегмато, стоматоцитів, деградованих форм (іноді з проявом сферо, овалцитозу) та їх внутрішньоклітинного балансу (концентрація гемоглобіну, появи його нових хімічних ізомерів, що виявлялось поліхромазією забарвлення еритроцитів). Зауважимо, що в основі феномену деформації еритроцитів, який розвивається за умов бабезійної інвазії, лежать структурні зміни мембранних комплексів, співвідношення їхніх компонентів, індуковані дефекти. Постінвазивні анізо та пойкилоцитоз (трансформація форми та розмірів) еритроцитів суттєво впливають на їхні реологічні властивості: змінюється спроможність до деформації, яка визначає діapedез еритроцитів та агрегацію (чисельні факти сладжів та формування «монетних стовпчиків») у препаратах мазків зразків крові із високим рівнем вірогідної інфікованості бабезіями). Отримано наукові дані, що агресивне вторгнення в організм людини чи тварин збудників кровепаразитів *Babesia* spp. спонукає програму «аварійного» включення напруженого еритропоезу [18,19,21]. Це сприяє появі онтогенетичних збоїв із перескоками у термінальних зонах розподілу та викиду у кровообіг чисельних «аварійних» еритроцитів зі зміненими адгезивними властивостями клітинної мембрани, до того ж адсорбованими на ній протеїновими комплексами. Таким чином, гіперагрегація еритроцитів *in vivo* (що проявлялось наявністю сладжів, «монетні стовпчики» у досліджених препаратах мазків крові) призводить до різкого постінвазивного збільшення вмісту у крові еритроцитарних агрегатів-мікротромбів. Поява останніх у мікросудинному руслі неодмінно спричиняє повну або часткову блокаду кровообігу окремих ділянок тканин таргетних органів, різко зменшує чисельність активно функціонуючих капілярів, артеріоло-венулярних анастомозів у них, сприяє розвитку тканинної гіпоксії, атрофії, некрозу.

Висновки:

Аналіз отриманих результатів дав змогу надійти таких висновків. Застосування цитологічного методу діагностики виявило 81,8 % гемопаразитів роду *Babesia* у досліджених зразків крові із високим рівнем вірогідної інфікованості бабезіями. Використання цього методу (у модифікації Райта) є доцільним та сприяє усуненню низки недоліків, пов'язаних із високою собівартістю виробничого процесу, його довго тривалістю, ускладненнями та швидкістю в освоєнні окремих ланок. Метод забарвлення мазків крові за Райтом характеризується подовженими строками та якістю збереження фарбованих препаратів, високим диференційно-діагностичним коефіцієнтом (особливо, коли мова йдеться щодо виявлення онтогенетичних, інтра- та екстрацелюлярних форм паразитів *Babesia spp.*), відносною доступністю отримання реагентів за вітчизняних умов.

References:

1. 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.
2. 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
3. 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.
4. Zintl, A. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance [Text] / A. Zintl, G. Mulcahy, H. E. Skerrett [et al] // Clin Microb Rev. 2003. - Vol. 16, No. 4. - P. 622–636.
5. 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.
6. 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
7. Homer, M. J. Babesiosis [Text] / P. J. Homer, I. A. Delfin, S. R. Telford [et al] // Clin. Microbiol. Rev. – 2000. - Vol. 13, No. 3. - P. 451–469.
8. Vannier, E. Update on Babesiosis [Electronic resource] / E. Vannier, P. J. Krause // Inter. Perspect. Infect. Dis. – 2009. - Mode of access <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2009/984568/>
9. 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.
10. Sunaga, F. Continuous in vitro culture of erythrocytic stages of *Babesia gibsoni* and virulence of the cultivated parasite [Text] / F. Sunaga, K. Namikawa, Y. Kanno // J. Vet. Med. Sci. – 2002. – Vol. 64, No. 7. – P. 571-575.
11. Garcia, L. S. Laboratory diagnosis of blood-borne parasitic diseases; Approved guideline [Electronic resource] / L. S. Garcia, S. L. Bullock-Iacullo, T. R. Fritsche, [et al] // Clinical and laboratory standards institute. – 2000. - Vol. 20, No. 12. - Mode of access: http://shopping.netsuite.com/c.1253739/site/Sample_pdf/M15A_sample.pdf ISBN 1-56238-401-5 ISSN 0273-3099
12. 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.
13. 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, No. 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
14. Skotarczak, B. Babesiosis as a disease of people and dogs. Molecular diagnostics: a review [Text] / B. Skotarczak // Veterin. Medic. - 2008. – Vol. 53, No. 5. – P. 229–235.
15. 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
16. Imes, G. Babesiosis (Piroplasmiasis) [Electronic resource] / G. Imes, R. Neafie, F. Chiricosta, 2005. - Mode of access: https://www.google.com.ua/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.dtic.mil%2Fcgi-bin%2FGetTRDoc%3FAD%3DADA547686&ei=PfmPVPjfkUH-ywP7xoCIAg&usq=AFQjCNFD_3W815XQNuXIaKnr8XfW2Co_b-Q&bvm=bv.81828268,d.bGQ
17. 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
18. Vannier, E. Human Babesiosis [Text] / E. Vannier, P. J. Krause // N. Engl. J. Med. – 2012. - Vol. 366, No. 25. – P. 2397-2407.
19. Homer, M. J. A polymorphic multigene family encoding an immunodominant protein from *Babesia microti* [Text] / P. J. Homer, E. S. Bruinsma, M. J. Lodes [et al] // J. Clin. Microbiol. – 2000. - Vol. 38, No. 1. – P. 362-368.
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. Homer, M. J. Babesiosis [Text] / P. J. Homer, I. A. Delfin, S. R. Telford [et al] // Clin. Microbiol. Rev. – 2000. - Vol. 13, No. 3. - P. 451–469.

UDC: УДК: 616:612.6.993.-192.[57.083(076)]

COMPARABLE CYTOLOGICAL DIAGNOSTIC OF BLOOD SMEARS ON BABESIA INFECTION

Pokhyl S.I., Torianik I.I., Tymchenko O.M., Chygyrynska N.A., Kostyria I.A.

In last time Babesiosis as a tick-borne hemoprotozoans human disease have a very important role in differential diagnostics of modern infectious medicine. It caused by protozoan of the genus *Babesia*, which invade and destroy erythrocytes. Babesiosis also has been called tick fever. So, *Babesia* has been known by other genus names, including *Nuttallia*, *Microbabesia*, *Babesiella*, and *Gonderia*. Because all *Babesia* species are piroplasms, a more inclusive term for anthroprotozoan infections caused by these organisms would be piroplasmosis. Their diagnostic complications are such that, tick-borne disease agents from prolonged life cycles involving arthropod and vertebrate host. The complexity is enhanced by the diversity of hosts in different biotopes, which depends on factors like type of vegetation, climate and/or human influence, such as restoration of former industrial sites, which leads to the development of new biotopes. So, on the one hand, new habitats for plants and animals including ticks, and nature are created. About the first case of babesiosis infection was reported as a cause of human sickness in 1969 in northeastern United States. Several hundred cases are now reported from this region each year. The disease is characterized by a gradual onset of malaise with anorexia, fever, headaches, myalgia, and other vague symptoms, which may persist for long period. Occasionally dangerous fulminating infections occur particularly in immunocompromised or aged individuals.

The purpose of the present research was to study of the cytological diagnostic of blood smears from objects with the *Babesia* infection.

Materials and methods. Blood smears (by Romanovsky-Gimze (standard), Wright's standard and staining, the author's modification, 2014) of domestic dogs (n = 31) of both sexes with *Babesia* infection at the age from 3 months to 6 years served as the material for the study. The preparations were fixed during 1-2 seconds with 96 % ethyl alcohol. Then warmed ($t = 36.0 \pm 2.0$)°C commercial matrix solutions of eosin, azure and methylene blue were applied one by one. The smears were rinsed (1-2 seconds) in distilled water and dehydrated. The procedure ended with short-term drying in a diffused stream of warm dry air (Samsung house fan, power 220 W). The results were compared with intact control. Smears were contrasted and analysed under a microscope LOMU (LOMO, Russia): x 300; x400; x1000; x1350 and photographed with a digital camera "Canon EOS-3000".

Results. Blood samples infected with *Babesia* species were collected (May-October) from naturally (promenade in forest-park) tick-borne infected dogs (*Canis familiaris*) in all Kharkov region and city. All (experimental) animals were monitored twice daily by veterinary doctors for

clinical signs and had rectal temperatures taken (authors have a great thanks for the cooperation and consolidation Chif-Mr. Yu. V. Al'okhin and veterinary personal of Kharkov Center of Clinical Veterinary).

Blood was drawn daily for hematocrit determination and peripheral blood smear were made from ear vein blood to determine parasitemia status. As result of the analysis of blood smears it was found out that against a background of orange erythrocyte cytoplasm the preparation area easily revealed crimson- and red-lilac pyriform (n = 8-12 in the field of vision of the preparation), annular (n = 9-16 in the field of vision), amoebiform haemoparasites and those with other shapes ($\Sigma=13$), thereby indicating a high level of infection (81.8 %). Owing to their own chromatophilic feature, protozoan cells looked geometrically marked and clearly contrasted against a background of the saturated red-violet colour of nuclei. The developed technique of staining facilitated: a more qualitative analysis of ontogenetic staging (III) of *Babesia* (trophozoites, merozoites, sporozoites); improvement of differential diagnosis of the haemoparasites with blood platelets (the latter were distinguished from cells of the causative agent by the presence of marked ovaloid azurophilic granules in the cytoplasm of young forms ($\Sigma = 1-3$ in the field of vision) and azurophilic granularity in mature forms; better differential diagnosis with intracellular inclusions (intraerythrocytic Cabot rings, Howell-Jolly bodies); improved differential diagnosis with solid elements of sediments of used stains (the above artifacts were in a saturated dark blue or black colour and observed very seldom).

Conclusions. By the results of the cytological diagnostic of blood smears it was revealed that domestic dogs with clinically detected *Babesia* infection had a high level of contamination with parasites. In our studies this level was 81.8 %. Has been established that using of the blood smears by Romanovsky-Gimze in Wright's the author's modification (2014) are very effective to extrimal medicine and perspective for next clinical investigation.

Keywords: babesia infections, cytology, diagnostics