



УДК 619:616.993-07:636.5

**М.В. БОГАЧ**, докт. вет. наук, директор  
Одеська дослідна станція ННЦ «ІЕКВМ»  
**О.Є. КУКЛІН**, провідний лікар-гістолог  
Одеська регіональна державна лабораторія ветеринарної медицини  
**Г.А. КОВАЛЕНКО**, аспірант  
Одеський державний аграрний університет

## МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ КРИПТОСПОРИДИОЗУ ПТИЦІ

У статті розглянуто мікроскопічні методи виявлення криптоспоридій із невеликими модифікаціями, розробленими під час практичної роботи. Для діагностики криптоспоридіозу птиці доречно використовувати методи фарбування за Цілем – Нільсеном і Кестером як найбільш точні при виявленні ооцист. Методи негативного фарбування можна успішно використовувати при обробці великої кількості матеріалу після його збагачення для швидкого скринінгу препаратів. Метод фарбування за Романовським – Гімзою виявився найменш ефективним.

**К**риптоспоридіоз – протозойне захворювання тварин і людини, спричинюване найпростішими роду *Cryptosporidium*, що означає «прихована спора», тому що, на відміну від раніше відомих кокцидій, ооцисти цього паразита не мають спорист, які оточують спорозоїти (тип *Apicomplexa*, клас *Sporozoa*, підряд *Eimeria*, родина *Cryptosporidiidae*). У птахів описано три види *Cryptosporidium* – *C. meleagridis*, *C. baileyi* та *C. galli* [3, 5, 6].

Зазвичай перебіг хвороби реєструють у формі гастроентериту, при якому порушується всмоктувальна функція кишечника. При значному ураженні птахів паразитів можна знайти (крім кишечника – основного місця їх знаходження) у фабрицевій бурсі, дихальних шляхах, кон'юнктиві ока, органах сечової системи. Іноді можливий і безсимптомний перебіг інвазії. Хвороба посилюється при будь-якому порушенні імунного статусу організму [7, 8].

Один з найнадійніших методів – виявлення криптоспоридій на зрізах зараженої тканини (ендогенні стадії розвитку) або у фекаліях (ооцисти). В останньому випадку дуже важливо диференціювати криптоспоридії від інших найпростіших подібної морфології, дріжджових і дріжджоподібних грибів, мікроорганізмів і елементів пеларварених часточок. Саме цим пояс-

нюється необхідність докладного опису методів лабораторної (мікроскопічної) діагностики хвороби [1, 2].

У світовій літературі запропоновано кілька методів виявлення ооцист криптоспоридій. Деякі з них запозичені з класичних мікробіологічних і гістологічних посібників. Наприклад, фарбування карболовим фуксином за Цілем – Нільсеном уже понад півстоліття застосовують для виявлення кислотостійких мікобактерій туберкульозу. Цей метод набув найбільшого практичного застосування для діагностики й вивчення ооцист криптоспоридій, оболонка яких має кислотостійкі властивості [4].

**Мета роботи** – порівняти мікроскопічні методи діагностики криптоспоридіозу птиці.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на базі Одеської дослідної станції ННЦ «ІЕКВМ». Проби фекалій для мікроскопічного дослідження відбирали від курчат-бройлерів 27-добового віку, хворих на криптоспоридіоз. Із проб після центрифугування (5 хв при 3 тис. об./хв) готували нативні мазки за загальнопринятною методикою.

Для фарбування за методами Ціля – Нільсена і Кестера мазки фіксували над полум'ям спиртівки – у висушеному вигляді їх тричі проводили через полум'я до зникнення ознак запотівання скла. Загальна тривалість перебування мазка в полум'ї не повинна перевищувати 3–5 с.

Для фарбування за методом Романовського – Гімзи мазки фіксували в розчині  $ZnSO_4$  2–3 хв (5 г хлористого натрію, 5 г сірчанокислого цинку додати у ємність і долити дистильованої води до позначки 100 мл). Перед фарбуванням 1% водним розчином генціанового фіолетового й 1% водним азуром II мазки фіксували у 96% етиловому спирті щонайменше 30 хв.

Для виготовлення 500 мл фарби карболового фуксину брали 5 г основного фуксину, 25 г кристалічного фенолу, 10 крапель гліцерину, 50 мл 96% етилового спирту, 500 мл дистильованої води. Розтирали в ступці фарбу, фенол, гліцерин і по краплинах додавали 10 мл 96% етилового спирту, досягаючи повного розчинення. Помішуючи, додавали 500 мл дистильованої води.



Розчин ставили у термостат (+37°C) на 1 добу, потім фільтрували.

Для приготування фарби за методом Кестера необхідно змішати 40 мл 3% водного розчину сафраніну зі 100 мл 5,6% розчину КОН. Розчин профільтрувати.

Фарбу для виконання методу за Романовським – Гімзою готували за загальноприйнятою методикою.

Для негативного фарбування використовували 1% водний розчин генціанового фіолетового і 1% водний азур II (суміш рівних частин азуру II і метиленового синього).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### Фарбування за Цілем – Нільсеном.

На фіксований препарат накладали смужку фільтрувального паперу таким чином, щоб вона закривала мазок повністю. Папір використовували для того, щоб фарба не розлилася по склу, що запобігало можливому осадженню її кристалів на мазок. Наливали на папір розчин карболового фуксину й нагрівали препарат над полум'ям спиртівки до появи легкої хмарки парів, не допускаючи закипання фарби й підсихання паперу. У разі висихання мазка й повторного нанесення барвника нагрівали мазок до появи парів повторно. Залишали на 20 хв. Після фарбування фільтрувальний папір знімали, мазки промивали в проточній воді, знебарвлювали 3% солянокислим спиртом 45–60 с. Знову промивали в проточній воді й дофарбовували 1–2 хв 5% розчином малахітового зеленого на 10% етиловому спирті. Промивали мазки в проточній воді, ретельно висушували й розглядали під мікроскопом (з імерсією) при збільшенні 10×40.

На тлі мікрофлори, пофарбованої в зелені відтінки, ооцисти криптоспоридій виділяються у вигляді округлих червоних організмів (рис. 1).

У червоний колір можуть забарвлюватися краплини жироподібних речовин, гранули детриту й спори грибів. Навіть при випадковій схожості за розмірами ці утворення легко відрізнити від ооцист криптоспоридій за

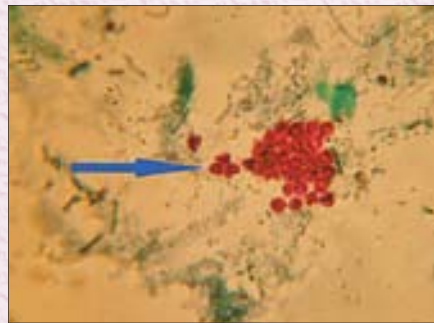


Рис. 1. Ооцисти *Cryptosporidium* у мазку фекалій курчати. Фарбування за Цілем – Нільсеном. ×400

відсутністю в них виразної оболонки та якого-небудь структурованого вмісту всередині. У сумнівних випадках серійні мазки слід забарвити іншим методом. За потреби можна зменшити концентрацію малахітового зеленого (підбирається дослідним шляхом).

**Фарбування за Кестером.** Мазки фарбували в розчині сафраніну 5 хв. Після промивання водою диференціювали 10 с в 0,1% розчині сірчаної кислоти, знову промивали у воді й фарбували в 5% розчині малахітового зеленого (див. вище) 10–15 с. Препарати промивали у воді, ретельно висушували на повітрі й досліджували під мікроскопом (з імерсією) при збільшенні 10×40.

Ооцисти криптоспоридій забарвлюються в блідо-рожевий колір і добре виділяються на зеленому тлі (рис. 2).

Цей метод вважається одним з найбільш точних при виявленні ооцист криптоспоридій. Жоден з інших організмів, які важко відрізнити від криптоспоридій, не фарбується сафраніном. Фарба нестабільна, препарати швидко вицвітають.

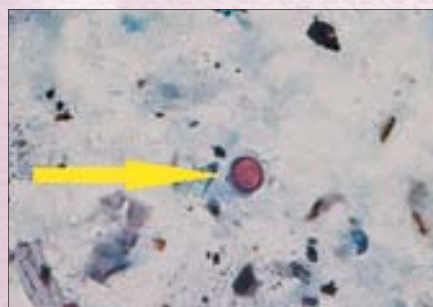


Рис. 2. Ооциста *Cryptosporidium* у мазку фекалій курчати. Фарбування сафраніном за Кестером. ×400

**Фарбування за Романовським – Гімзою.** Цей метод, який використовують у гематологічній практиці, може бути успішно застосований при виявленні ооцист криптоспоридій. В окремих випадках він досить інформативний, оскільки при адекватній попередній підготовці мазка барвник проникає всередину ооцисти й забарвлює спорозоїти.

Фарбували фіксовані й висушені мазки 10% розчином барвника впродовж 40 хв. Ретельно промивали в проточній воді, висушували на повітрі й досліджували під мікроскопом з імерсійною системою при збільшенні 10×40.

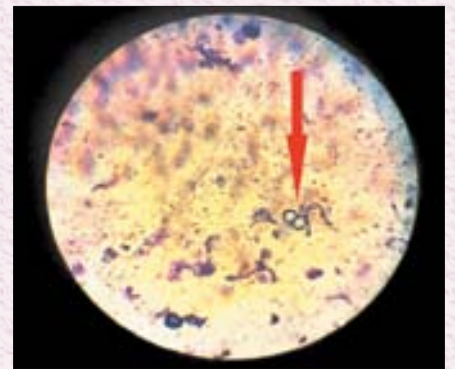


Рис. 3. Ооцисти *Cryptosporidium* у мазку фекалій курчати. Фарбування за Романовським – Гімзою. ×400

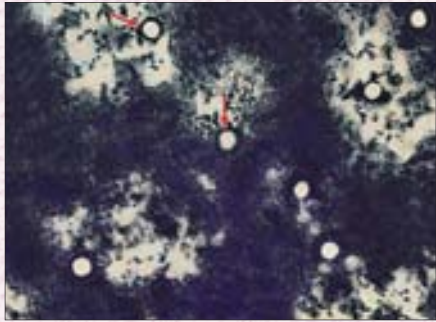
Ооцисти криптоспоридій мають вигляд нефарбованих або слабо забарвлених округлих утворень (рис. 3).

Ідентифікація ооцист криптоспоридій цим методом ускладнена через те, що інші мікроорганізми кишечника також забарвлюються азур-еозином, до того ж значно інтенсивніше від ооцист. Тому слід робити тонкі мазки, в яких накладення мікрофлори на ооцисти не «екранує» останніх від спостерігача.

#### Негативні методи фарбування.

Висушені й фіксовані мазки фарбували 1% водним розчином генціанового фіолетового й 1% водним азуром II упродовж 2 хв. Препарати швидко промивали в проточній воді, ретельно висушували й досліджували під мікроскопом (з імерсією) при збільшенні 10×40.

Ооцисти криптоспоридій на тонкій частині мазка виглядають як світлі



**Рис. 4.** Ооцисти *Cryptosporidium* у мазку фекалій курчати. Негативне фарбування 1% водним розчином генціанового фіолетового. 90×15

овали, найчастіше з синім або фіолетовим обідком на тлі щільно прилеглих забарвлених бактерій і переварених часточок, які ще більше підсилюють негативний контраст (рис. 4).

Негативне фарбування є одним із методів швидкого скринінгу досліджуваного матеріалу. Оболонка ооцисти така міцна, що за 2 хв фарба не проникає всередину. Для підтвердження криптоспоридіозу мазки можна фіксувати й повторно пофарбувати за Цілем – Нільсеном або будь-яким іншим способом. Негативне фарбування слід застосовувати після збагачення матеріалу, оскільки кількість ооцист у фекаліях може бути такою незначною, що їх виявлення за допомогою мікроскопії забарвлених мазків є досить складним завданням. Для збільшення концентрації ооцист криптоспоридій найчастіше використовують центрифугування з флотацією або седиментацією. Після цього вдруге центрифугують матеріал із флотаційним розчином Бреза. Відтак його потрібно обов'язково відмити від зазначеного розчину (матеріал, зібраний з поверхневої плівки після другого центрифугування (1–2 мл), змішати з 10 мл води й центрифугувати 5 хв при 2,5–3,5 тис. об./хв. Ооцисти криптоспоридій у такому разі осідають на дно).

#### ВИСНОВКИ

1. Незважаючи на достатню чіткість при виявленні ооцист криптоспоридій, методи забарвлення за Цілем – Нільсеном і Кестером є багатоетапними й відносно тривалими.

2. Негативні методи фарбування ооцист криптоспоридій мають переваги лише в тому, що на їх виконання витрачається менше часу, а при обробці значної кількості матеріалу швидкий скринінг препаратів має велике значення. Але негативне фарбування слід застосовувати після збагачення матеріалу, тому що кількість ооцист у фекаліях може бути такою незначною, що виявити їх за допомогою мікроскопії забарвлених мазків вдається не завжди.

3. Метод фарбування за Романовським – Гімзою виявився найменш ефективним. У мазках реєстрували незабарвлені та блідо-блакитні округлі організми, але в них не вдалося розгледіти подовжені й зігнуті тільця (спорозоїти) з червонуватими гранулами всередині.

4. Доречно користуватися методами фарбування за Цілем – Нільсеном і Кестером як найбільш точними при виявленні ооцист криптоспоридій. А методи негативного фарбування після збагачення матеріалу можна успішно використовувати для швидкого скринінгу препаратів при обробці великої кількості проб.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Васильева В.А.** Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике криптоспоридиоза новорожденных животных / В.А. Васильева, Л.А. Небайкина. – Саранск, 2001. – С. 25.
2. **Колосова Д.М.** Лабораторная диагностика криптоспоридиоза / Д.М. Колосова, С.В. Ларионов // Ветеринария. – 1999. – № 7. – С. 23–26.
3. **Никитин В.Ф.** Криптоспоридиоз домашних животных (возбудитель, клиническая картина, эпизоотология, диагностика, профилактика и терапия) / В.Ф. Никитин // Ветеринарный консультант. – 2007. – № 24 (163). – С. 6–15.
4. **De Quadros R.M.** Detection of Cryptosporidium oocysts by auramine and Ziehl Neelsen staining methods / R. M. de Quadros, S.M.T. Marques, C.R. Amendoira, L.A. de Souza, P.R. Amendoira and C.C. Comparin // Parasitol. Latinoam. – 2006. – Vol. 61. – P. 117–120.
5. **Pavlasек I.** Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environ-

ment / I. Pavlasек // Remidia Klinicka Mikrobiologie. – 1999. – Vol. 3. – P. 290–301.

6. **Rongjun Wang.** Large-scale survey of Cryptosporidium spp. in chickens and Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Henan, China: prevalence and molecular characterization / Wang Rongjun, Fuchun Jian, Yanping Sun, Qunshan Hu, Jingjing Zhu, Fang Wang, Changshen Ning, Longxian Zhang and Lihua Xiao // Avian Pathology. – 2010. – Vol. 39. – Issue 6. – P. 447–451.
7. **Taylor M.A.** Clinical and pathological observation on natural infection of *Cryptosporidium baileyi* and flagellate protozoa in birds and Broiler / M.A. Taylor, M.R. Geach, W.A. Cooley // Vet. Res. – 1999. – Vol. 145. – P. 695–699.
8. **Trampel D.W.** Urinary tract cryptosporidiosis in commercial laying hens / D.W. Trampel, T. M. Pepper and B. L. Blagburn // Avian Diseases. – 2000. – Vol. 44. – P. 479–484.

Одержано 20.05.2014

#### Методы диагностики криптоспоридиоза птиц. Н.В. Богач, А.Е. Куклин, А.А. Коваленко

В статье представлены микроскопические методы выявления криптоспоридий с небольшими модификациями, выполненными в ходе практической работы. С целью диагностики криптоспоридиоза птиц уместно использовать методы окраски по Циллю – Нильсену и Кестеру как наиболее точные при обнаружении ооцист. Методы негативного окрашивания можно с успехом применять после обогащения материала для быстрого скрининга при обработке большого количества препаратов. Метод окрашивания по Романовскому – Гимзе оказался наименее эффективным.

#### Methods of diagnostics of cryptosporidiosis of birds. M.V. Bogach, A.E. Kuklin, A.A. Kovalenko

This paper presents the microscopic methods for detection of *Cryptosporidium* slight modifications developed during practical work. With the purpose of detection *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears with standard light microscopy it is appropriate to used the Ziehl – Neelsen and Kester staining methods, as most exact at a detection oocysts. Negative staining can be successfully used after enriching of material for rapid screening preparations in the study of a large amount of material. Romanovsky – Giemsa staining method was the least effective. ◉