

УДК 619:616.995.121

DOI: 10.31016/1998-8435-2018-12-2-117-120

Методика гистохимической окраски на активность кислой фосфатазы для идентификации личинок первой стадии нематод видов *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema dracunculoides* и *A. reconditum* из крови собак

Владимир Михайлович Шайтанов¹, Валерий Брониславович Ястреб²

¹⁻²Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К. И. Скрябина, 117218, Москва, ул. Б. Черёмушкинская, д. 28
(Одобрена методической комиссией «Инвазионные болезни животных» РАН 21 сентября 2017 г., протокол № 2)

Поступила в редакцию: 25.11.2017; принята в печать: 11.04.2018

Аннотация

Модифицирована методика окраски на активность кислой фосфатазы, позволяющая дифференцировать между собой личинок первой стадии нематод четырех видов: *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema dracunculoides*, *A. reconditum* из крови собак. Метод основан на локализации кислой фосфатазы в разных участках тела у разных видов микрофилярий. Для визуализации используется реакция гидролиза субстрата, который катализирует кислая фосфатаза, и образование в этих местах нерастворимого окрашенного преципитата. Приведен перечень оборудования и реактивов, дано краткое описание процесса подготовки клинического материала, проведения окраски и критериев дифференциации видов по окраске.

Ключевые слова: дифференциация, микрофилярии, гистохимическая окраска, кислая фосфатаза.

Для цитирования: Шайтанов В. М., Ястреб В. Б. Методика гистохимической окраски на активность кислой фосфатазы для идентификации личинок первой стадии нематод видов *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema dracunculoides* и *A. reconditum* из крови собак // Российский паразитологический журнал. 2018. Т. 12. № 2. С. 117–120. <https://doi.org/10.31016/1998-8435-2018-12-2-117-120>

© Шайтанов В. М., Ястреб В. Б.

Technique of Histochemical Staining on the Activity of Acid Phosphatase for Identification of Larvae of the First Stage of Nematodes of *Dirofilaria Immitis*, *D. Repens*, *Acanthocheilonema Dracunculoides* and *A. Reconditum* Species from the Blood Of Dogs

Vladimir M. Shaytanov¹, Valery B. Yastreb²

¹⁻²All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K. I. Skryabin, 28, Bolshaya Cheremushkinskaya str., Moscow, 117218
(Approved by the methodological commission "Invasive Animal Diseases" of the Russian Academy of Sciences on September 21, 2017, protocol No. 2)

Submitted 25.11.2017; accepted for printing: 11.04.2018

Abstract

The technique of staining on the activity of acid phosphatase has been modified, which makes it possible to differentiate between larvae of the first stage of nematodes of four species: *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema dracunculoides*, *A. reconditum* from the blood of dogs. The method is based on the localization of acid phosphatase in different parts of the body in different types of microfilariae. For visualization, the substrate hydrolysis reaction, which catalyzes acid phosphatase, and the formation of an insoluble stained precipitate in these areas is used. The list of equipment and reagents is attached, a brief description of the process of preparation of clinical material, coloring and criteria of differentiation of species by color is given.

Keywords: differentiation, microfilariae, histochemical staining, acid phosphatase.

For citation: Shaytanov V. M., Yastreb V. B. Technique of histochemical staining on the activity of acid phosphatase for identification of larvae of the first stage of nematodes of *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema dracunculoides* and *A. reconditum* species from the blood of dogs. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2018; 12(2):117–120. <https://doi.org/10.31016/1998-8435-2018-12-2-117-120>

Назначение и область применения

Методика предназначена для практикующих ветеринарных специалистов и сотрудников профильных научно-исследовательских учреждений. Личинки филяриид имеют мало дифференциальных признаков и сложны в определении. В научных целях важно различать нематод на стадии личинки для изучения морфологии, физиологии, эпизоотологии, клинической паразитологии и др. В практических целях также важно выявлять, в первую очередь, инвазию *D. immitis* у собак, как наиболее патогенную для них, и в меньшей степени – *D. repens* [1]. Метод впервые был предложен Т. Барка в 1962 г. для окраски клеток крови [3]; в паразитологии для окраски филяриид его впервые применили L. Chalifoux и R. D. Hunt в 1971 г. [4]. Методика неоднократно модифицировалась [2, 5]. Последняя модификация была опубликована в 2001 г. с использованием тест-системы Leucognost-SP [6]. В условиях России эти тест-системы не всегда доступны и коммерчески не выгодны. Закупка отдельных реактивов для окраски также обходится дорого, не всегда удобна и подходит только узкому кругу специалистов. Российский набор «Гемстандарт-КФ», выпускаемый для цитохимического определения кислой фосфатазы в лейкоцитах, с изменениями в ходе пробоподготовки и хода реакции, наиболее удобен и доступен для широкого круга специалистов.

Суть метода

Реакция выявления активности кислой фосфатазы проходит в две стадии. Первая стадия (реакция ферментативного расще-

пления) – гидролиза нафтол-AS-фосфата с участием фермента кислой фосфатазы в ацетатном буфере. Вторая стадия (реакция сочетания) – взаимодействие нафтола-AS с парарозанилином с образованием комплексного соединения азокрасителя. Данное соединение выпадает в качестве преципитата в области тела личинки с большей активностью кислой фосфатазы. Личинки разных видов филяриид отличаются по локализации кислой фосфатазы в теле паразита.

Оборудование и реактивы

Термостат; центрифуга; набор «Гемстандарт-КФ» и входящие в него реактивы: нафтол-AS-фосфат, диметилформамид, ацетат натрия, парарозанилин, азотистокислый натрий; дистиллированная вода; 96%-ный этанол; воронки; колба на 100 мл; колба на 1000 мл; эппендорфы на 2 мл; предметные стекла; пробирки с антикоагулянтом; центрифужные пробирки на 10 мл, емкость Хеллендахела для окраски мазков.

Подготовка клинического материала

Для окраски используют мазки цельной крови с антикоагулянтом, мазки из осадка, полученного методом концентрации с дистиллированной водой. Для приготовления мазков на сухое предметное стекло, ближе к узкому краю, наносят пипеткой небольшую каплю крови или осадка. Предметное стекло держат на столе или в левой руке за узкие края. Правой рукой приставляют шлифованное стекло узким краем к стеклу с кровью справа от кап-

ли под углом 45° и продвигают его влево до соприкосновения с каплей крови. Выжидают до тех пор, пока кровь расплывется по всему ребру шлифованного стекла, и затем плавным движением проводят его слева направо до тех пор, пока не будет исчерпана вся капля. Капля крови должна быть небольшой и соразмерна так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя до его края. После приготовления мазок следует высушить на воздухе.

Приготовление растворов

Приготовление ацетатного буфера. Содержимое флакона ацетата натрия растворить в колбе (емкостью 1000 мл) в 500 мл дистиллированной воды.

Приготовление раствора № 1. Растворить содержимое одного флакона нафтол-AS-фосфата в 0,5 мл диметилформамида, долить 40 мл ацетатного буфера.

Приготовление 4%-ного раствора азотистокислого натрия. Содержимое флакона с азотистокислым натрием растворить в 10 мл дистиллированной воды.

Приготовление раствора № 2. В эппендорфе смешать 8 капель парарозанилина и 8 капель 4%-ного раствора азотистокислого Na.

Приготовление рабочего раствора. Раствор № 1 слить с раствором № 2. Тщательно смешать, отфильтровать. Измерить pH с помощью pH-метра или лакмусовой полоски; pH раствора должен быть 5,0–5,5.

Ход реакции и дифференциация личинок

1. Сухие мазки крови или осадка после метода концентрации зафиксировать 96%-ным этанолом. Достаточно однократно погрузить мазки в 96%-ный этанол.
2. Мазки после фиксации высушить.
3. Поместить в свежеприготовленный рабочий раствор (лучше в емкость Хеллендахла, вертикально, во избежание образования преципитата на стекле). Инкубировать в темноте в термостате при температуре 37°C в течение 2 ч.
4. Промыть водопроводной водой и высушить окрашенные стекла.
5. При недостаточном прокрашивании поместить обратно в рабочий раствор на 1 ч.

6. При просмотре мазка фон будет светло-желтый; окрашенными в красный цвет будут только поры микрофилярий и некоторые участки тела личинки. При необходимости можно докрасить мазки азур-эозином (наборы для быстрого окрашивания «Лейкодиф 200»). Для личинок вида *D. repens* характерно окрашивание анальной поры, а у личинок *D. immitis* окрашивается экскреторная и анальная поры. Личинки *A. dracunculoides* проявляют специфичное окрашивание в области экскреторной поры, образуя так называемое «кольцо» основного тела, расположенного в центре между порами, и анальной поры. Личинки *A. reconditum* окрашиваются полностью, но более интенсивно в области между экскреторной и анальной порами.

Литература

1. Ястреб В. Б. Прижизненная диагностика дирофиляриоза // Матер. Науч. Конф. Всерос. о-ва гельминтол. РАН «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». 2011. Вып. 12. С. 588–592.
2. Balbo T., Abate O. Histochemical differentiation of microfilariae of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Dipetalonema* sp. *Parassitologia*. 1972; 14: 240–244.
3. Barka T. Cellular localization of acid phosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 1962;10: 231–232.
4. Chalifoux L., Hunt R. D. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1971; 158(5): 601–605.
5. Ortega-Mora L. M., Gomez-Bautista M., Rojo-Vazquez F. A. The acid phosphatase activity and the morphological characteristic of *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold, 1870) microfilariae. *Vet. Parasitol.* 1989; 33: 187–190.
6. Peribáñez M. A., Lucientes J., Arce S., Morales M., Castillo J. A., Gracia M. J. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP. *Vet. Parasitol.* 2001; 102: 173–175.

References

1. Yastreb V. B. Life-time diagnostics of dirofilariasis. *Mater. Nauch. Konf. Vseros. o-va gel'mintol. RAN «Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami» = Materials of the Scientific Conference of the All-Russian Helminthology Society of the*

- Russian Academy of Sciences "Theory and Practice of Combating Parasitic Diseases". 2011. (12): 588–592. (In Russ.)
2. Balbo T., Abate O. Histochemical differentiation of microfilariae of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Dipetalonema* sp. *Parassitologia*. 1972; (14): 240–244.
 3. Barka T. Cellular localization of acid phosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 1962; (10): 231–232.
 4. Chalifoux L., Hunt R. D. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1971; 158(5): 601–605.
 5. Ortega–Mora L. M., Gomez–Bautista M., Rojo–Vazquez F. A. The acid phosphatase activity and the morphological characteristic of *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold, 1870) microfilariae. *Vet. Parasitol.* 1989; (33): 187–190.
 6. Peribáñez M. A., Lucientes J., Arce S., Morales M., Castillo J. A., Gracia M. J. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP. *Vet. Parasitol.* 2001; (102): 173–175.