



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 01052**

(22) Data de depozit: **20/12/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2018** BOPI nr. 2/2018

(41) Data publicării cererii:
30/06/2014 BOPI nr. 6/2014

(73) Titular:
• **MĂTIUȚ DOINA SIMONA,**
ȘOS. NAȚIONALĂ MR. 198, BL. B, SC. B,
ET. 8, AP. 30, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• **MĂTIUȚ DOINA SIMONA,**
ȘOS. NAȚIONALĂ MR. 198, BL. B, SC. B,
ET. 8, AP. 30, IAȘI, IS, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**WO 92/19952; "WORKING WITH
PROTOZOA",**
[https://media.vwr.com/emdocs/docs/scied/
Working_with_Protozoa.pdf](https://media.vwr.com/emdocs/docs/scied/Working_with_Protozoa.pdf), 2005;
R. F. CROSS, P. D. MOORHEAD,
**"AN AZURE AND EOSIN RAPID STAINING
TECHNIQUE", CAN. J. COMP.MED., NR. 4,**
VOL. 33, P. 317, 1969

(54) **PROCEDEU DE COLORARE A PROTOZOARELOR
PENTRU EVIDENȚIEREA, LA MICROSCOP, A STRUCTURII
CELULARE**



Prezenta invenție se referă la un procedeu de colorare a protozoarelor în materii fecale, pentru evidențierea la microscop a structurii celulare.

Se cunosc diferite procedee de colorare uzuale (histopatologice) și speciale (histochimice), pentru celulele din țesuturile epiteliale, țesuturi limfoide, utilizând colorații uzuale standard pentru țesuturi: colorația Hemalaun Eozina, colorația Van Gieson, Tricroma Masson, Giemsa, Mallory, colorația AZAN, la glande endocrine Colorația Lie, a celor utilizate pentru structuri subcelulare: Metoda Cajal Da Fano, în histochimia glucidelor, lipidelor și proteinelor: Colorația PAS: pentru diferite structuri patologice, colorația Perls, Masson - Fontana, Grimelius, în domeniile analizelor medicale umane, veterinare. De asemenea, sunt cunoscute colorațiile citologice și bacteriologice: Colorația Babeș - Papanicolau, May Grumwald Giemsa, Gram, Ziehl - Neelsen.

Remarcăm colorația Babeș - Papanicolau, în care reactivul Hemalaun este utilizat pentru colorarea nucleelor, iar combinația colorării OG-6 cu EA-50 asigură o gamă de nuanțe de verde, albastru, roz și oranj pentru citoplasma celulară. Colorația Papanicolau se poate realiza manual sau automat (**WO 92/19952**).

În literatură sunt descrise modalități de fixare și colorare a protozoarelor, menționând ca posibil fixator de spectru larg fluidul Schaudinn, care cuprinde clorură de mercur, etanol și acid acetic glacial (**WVR, Working with protozoa, 2005**).

O altă tehnică de colorare folosită pentru protozoare utilizează combinația dintre azure și eozină (**R. F. Cross, P. D. Moorhead, An azure and Eosin Rapid Staining Technique, Can J Comp Med., 1969, vol. 33, nr. 4, p. 317, PMID: PMC1319457**).

Probele microscopice sub formă de frotiuri, obținute prin procedeele de colorare cunoscute, prezintă dezavantajul că nu pot fi folosite în surprinderea cu acuratețe a structurilor parazitului în evoluție stadială, cum sunt formele de viață ale parazitului: forma vacuolară, granulară, amebiodală sau chist.

Conținutul vacuolei variază în funcție de ce substanțe găsește în particular parazitul în fiecare gazdă, de aceea se colorează diferit, în funcție de compoziție. Nu sunt surprinse cu ajutorul colorațiilor cunoscute aspectele legate de activitatea metabolică, înmulțire, închistare.

Nu este preservată forma vegetativă a parazitului, care este fragilă. Metodele cunoscute, de asemenea, nu asigură o fixare adecvată a probei, necesitând numeroase spălări, specifice diverselor colorații, ce determină degradarea sau mobilizarea parazitului din preparatul umed. În plus, timpii mari pentru pregătirea probelor de colorare, precum și faptul că unele dintre procedeele de colorare utilizează pentru dizolvarea pulberilor de colorare solvenți cu grad ridicat de toxicitate, se adaugă dezavantajelor prezentate.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unei colorații destinate evidențierii la microscop a structurii celulare a parazitului *Blastocystis*.

Procedeu de colorare a protozoarelor, implicit a parazitului *Blastocystis* în materii fecale, cu fixare și clarificare, pentru evidențierea la microscop a structurilor celulare conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că, într-o primă fază, premergătoare colorării, se prepară o soluție de lucru de fixator Schaudinn, ca fixator pentru protozoare, care preservă forma vacuolară (de diagnostic) dintr-o soluție stoc de 600 ml soluție saturată de clorură de mercur și 300 ml alcool etilic 95%, prin adăugarea de 5 ml acid acetic glacial la 95 ml de soluție stoc. Se prepară frotiuri de fecale, fără a permite frotiurilor să se usuce, uscare ce ar modifica parazitul, dar și afinitatea structurilor lui pentru coloranți, cu plasarea imediată în fixatorul Schaudinn (8 min), și spălare soft cu apă distilată (10 s), urmată apoi de:

- faza 1, imersie în băi de alcool, timp de câte 7 s, în 3 băi de alcool metilic în concentrații descrescătoare (80%, 70%, 50%);

- faza 2, imersie în apă distilată, 7 s;

RO 129598 B1

- faza 3, imersie în baie de Hematoxilina-eozina Harris, timp de 5...8 min;	1
- faza 4, imersie în baie de apă distilată, 10 s;	
- faza 5, imersie în baie de HCl 0,05%, 3 s;	3
- faza 6, imersie în apa de robinet, 8 min;	
- faza 7, imersii succesive în 4 băi de alcool metilic de concentrații crescătoare (prima baie alcool metilic 50%, a doua 70%, a treia 80%, a patra 95%), timp de 7...8 s în fiecare baie;	5
- faza 8, imersie în baie cu Orange G, pentru 5 min;	7
- faza 9, imersie în 2 băi succesive de alcool metilic 95%, timp de 7 s;	
- faza 10, imersie în baie de Eozin azure 50, pentru 2 min;	9
- faza 11, imersie în baie de alcool metilic 95%, 3 min, urmată de imersia în alte 2 băi de alcool metilic 95%, câte 8 s;	11
- faza 12, imersie în 2 băi succesive de alcool metilic absolut, câte 8 s în fiecare;	
- faza 13, imersie în baie de xilen diluat 1:9, pentru 8 s;	13
- faza 14, imersie în 2 băi de xilen succesive, pentru 8 s fiecare.	
Preparatul astfel colorat se montează în balsam și se acoperă cu o lamelă histologică, remarcându-se la microscop nucleeele cu colorația roșu-violet, citoplasmă - bleu până la roz, vacuola în nuanțe de verde cărămiziu, cu granulații de diverse culori, în funcție de compoziția vacuolei.	15
Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:	19
- surprinde cu ajutorul unei singure colorații aspecte legate de activitatea metabolică, înmulțire, închistare, fixatorul prezervă structurile celulare în evoluție stadială, cum sunt formele de viață ale parazitului;	21
- structurile sunt bine diferențiate, datorită fixărilor și afinității coloranților utilizați pentru componentele proteice în special, dar nu numai, și combinațiilor: lipoproteice glicoproteice etc.;	23
- este redus timpul de colorare;	25
- este redus numărul de manevre de scufundări, prin menținerea unui timp scurt, de câteva secunde, în aceeași baie;	27
- s-au redus timpii de fixare și clarificare în xilen;	
- colorația are caracter permanent și este stabilă timp îndelungat;	29
- colorația obținută are sensibilitate crescută și este foarte generoasă ca gamă de nuanțe.	31
Se prezintă, mai jos, un exemplu de aplicare a procedurii, în legătură cu fig. 1...3, ce reprezintă:	33
- fig. 1, traseul tehnologic de colorație conform procedurii;	
- fig. 2, un aspect microscopic ce evidențiază parazitul;	35
- fig. 3, un aspect microscopic ce evidențiază forma de diagnostic - forma vacuolară, și servește pentru evidențierea la microscop a structurilor celulare ale parazitului <i>Blastocystis</i> în produsul biologic (materii fecale), cu fixare și clarificare, în care, într-o primă fază, premergătoare colorării, se utilizează fixatorul Schaudinn (soluție de lucru), ca fixator pentru protozoare care prezervă forma vacuolară (de diagnostic) cu soluția stoc: clorură de mercur de 600 ml soluție saturată, la care se adaugă alcool etilic (95%) 300 ml, iar soluția de lucru: la 95 ml din soluția stoc se adaugă 5 ml acid acetic glacial.	37
Se prepară frotiuri de fecale, fără a permite frotiurilor să se usuce, uscare ce ar modifica parazitul, dar și afinitatea structurilor lui pentru coloranți, cu plasarea imediată în fixatorul Schaudinn (8 min), și spălare cu apă distilată (10 s), urmată apoi de: faza 1 - imersie în băi de alcool, câte 7 s în 3 băi de alcool metilic în concentrații descrescătoare (80%, 70%, 50%), faza 2 - imersie în apă distilată, 7 s, faza 3 - imersie în baie de Hematoxilina-eozina Harris, 5...8 min, faza 4 - imersie în baie de apă distilată, 10 s, faza 5 - imersie în baie de HCl 0,05%, 3 s, faza	43
	45
	47

RO 129598 B1

1 6 - imersie în apa de robinet, 8 min, faza 7 - imersii succesive în 4 băi de alcool metilic de con-
centrații crescătoare (prima baie alcool metilic 50%, a doua 70%, a treia 80%, a patra 95%, timp
3 de 7...8 s în fiecare baie, faza 8 - imersie în baia cu Orange G, pentru 5 min, faza 9 - imersie
în 2 băi succesive de alcool metilic 95%, timp de 7 s, faza 10 - imersie în baia de Eozin azure
5 50, pentru 2 min, faza 11 - imersie în baie de alcool metilic 95%, 3 min, urmată de imersia în
alte 2 băi de alcool metilic 95%, câte 8 s, faza 12 - imersie în 2 băi succesive de alcool metilic
7 absolut, câte 8 s în fiecare, faza 13 - imersie în baie de xilen diluat 1:9, pentru 8 s, faza 14 -
imersie în 2 băi de xilen succesive, pentru 8 s fiecare, preparatul astfel colorat se montează în
9 balsam și se acoperă cu o lamelă histologică, remarcându-se la microscop nucleeele cu colorația
roșu-violet, citoplasmă - bleu până la roz, vacuola în nuanțe de verde cărămiziu, cu granulații
11 de diverse culori, în funcție de compoziția vacuolei.

Nucleeele **a**, ale formelor vacuolare **b**, sunt situate periferic în citoplasma **c**, care
13 mărginește vacuola centrală **d**, ce conține diverse incluziuni **e**. Colorația rezultă din schema de
colorare ce conține faza pregătitoare și cele 14 faze ale procedului de colorare.

Procedeu de colorare a protozoarelor de tipul parazitului <i>Blastocystis</i> în materii fecale, cu fixare și clarificare, pentru evidențierea la microscop a structurii celulare, caracterizat prin aceea că se prepară o soluție de lucru de fixator Schaudinn, dintr-o soluție stoc de 600 ml soluție saturată de clorură de mercur și 300 ml alcool etilic 95%, prin adăugarea de 5 ml acid acetic glacial la 95 ml de soluție stoc, urmată de preparare de frotiuri de fecale, fără a permite frotiurilor să se usuce, plasare imediată în fixatorul Schaudinn, timp de 8 min, și spălare cu apă distilată, timp de 10 s, urmată apoi de următoarele faze:	3
- faza 1, imersie în băi de alcool, timp de câte 7 s, în 3 băi de alcool metilic de concentrații descrescătoare de 80%, 70% și 50%;	5
- faza 2, imersie în apă distilată, timp de 7 s;	7
- faza 3, imersie în baie de Hematoxină-eozină Harris, timp de 5...8 min;	9
- faza 4, imersie în baie de apă distilată, timp de 10 s;	11
- faza 5, imersie în baie de HCl 0,05%, timp de 3 s;	13
- faza 6, imersie în apă de robinet, timp de 8 min;	15
- faza 7, imersii succesive în 4 băi de alcool metilic de concentrații crescătoare, și anume, într-o primă baie de alcool metilic 50%, apoi într-o a doua baie de alcool metilic 70%, apoi într-o a treia baie de alcool metilic 80%, și într-o ultimă baie de alcool metilic 95%, timp de 7...8 s pentru fiecare baie;	17
- faza 8, imersie în baie cu Orange G, timp de 5 min;	19
- faza 9, imersie în 2 băi succesive de alcool metilic 95%, timp de 7 s;	21
- faza 10, imersie în baie de Eozin azure 50, timp de 2 min;	23
- faza 11, imersie în baie de alcool metilic 95 %, timp de 3 min, urmată de imersie succesivă în alte două băi de alcool metilic 95%, timp de câte 8 s;	25
- faza 12, imersie în 2 băi succesive de alcool metilic absolut, timp de câte 8 s în fiecare baie;	27
- faza 13, imersie în baie de xilen diluat 1:9, timp de 8 s;	29
- faza 14, imersie în 2 băi succesive de xilen, timp de 8 s în fiecare baie, rezultând un preparat colorat care se montează în balsam și se acoperă cu o lamelă histologică, remarcându-se la microscop nucleeele cu colorația roșu-violet, citoplasma în culori bleu până la roz, vacuola în nuanțe de verde cărămiziu, cu granulații de diverse culori în funcție de compoziția vacuolei.	31
	33

(51) Int.Cl.

G01N 1/30 (2006.01);

C12Q 1/02 (2006.01);

C12R 1/90 (2006.01)

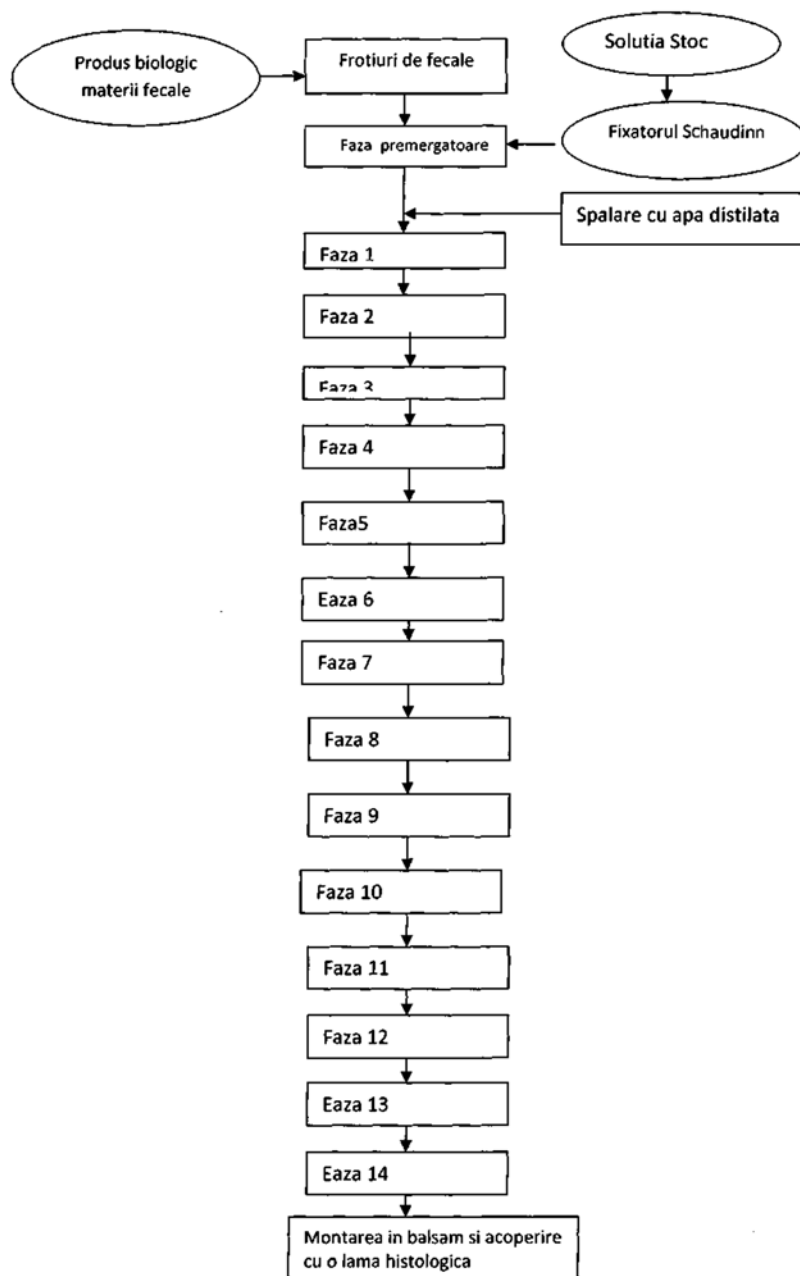


Fig. 1

(51) Int.Cl.

G01N 1/30 (2006.01),

C12Q 1/02 (2006.01),

C12R 1/90 (2006.01)

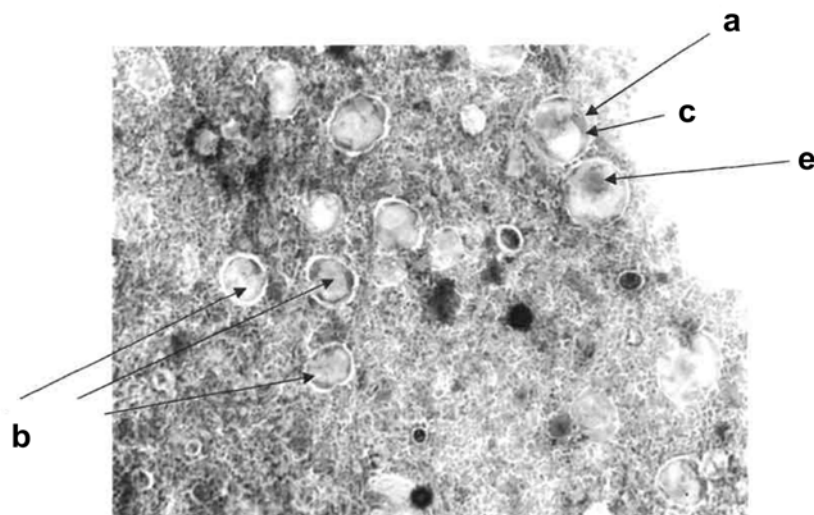


Fig. 2

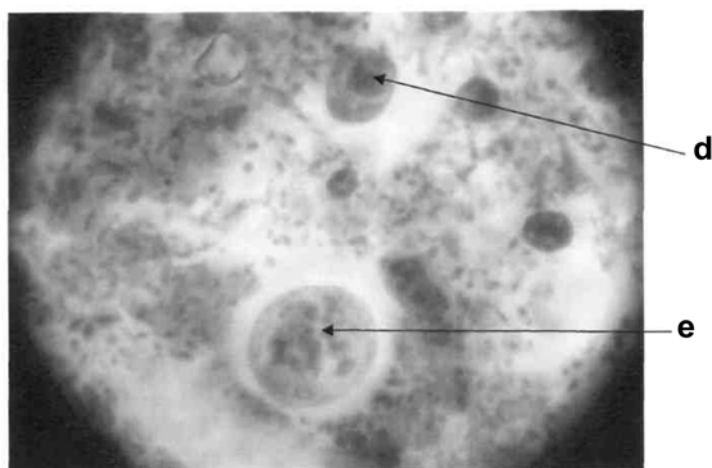


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 83/2018