



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **20.12.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.06.2014 BOPI nr. **6/2014**

(71) Solicitant:
• **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

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

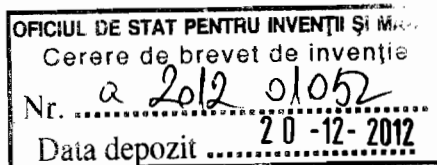
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de colorare a unor protozoare de tipul parazitului *Blastocystis*, într-un produs biologic utilizat pentru analiza microscopică a structurii celulare. Procedeu conform invenției constă din tratarea frotiurilor de fecale cu fixator pentru protozoare, care prezervă forma vacuolară de diagnostic, urmată de 14 etape de imersare în băi de alcool metilic având concentrații de 80%, 70% și 50%, colorații

uzuale standard pentru țesuturi, apă distilată, HCl, xilen, fiecare etapă timp de 7...10 s, după care preparatul astfel colorat se montează în balsam și se acoperă cu o lamelă histologică, pentru evidențierea structurilor celulare ale parazitului.

Revendicări: 1
Figuri: 3





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 coloratii uzuale standard pentru țesuturi: colorația **Hemalaun Eozina**, colorația **Van Gieson**, **Tricroma Masson**, **Giemsa**, **Mallory**, coloratia **AZAN**, la glande endocrine **Coloratia Lie**, a celor utilizate pentru structuri subcelulare: **Metoda Cajal Da Fano**, în histochimia glucidelor, lipidelor și proteinelor: Coloratia **PAS**: pentru diferite structuri patologice colorația **Perls**, **Masson – Fontana**, **Grimelius**, în domeniile analizelor medicale umane, veterinare. Sunt deasemenea cunoscute coloratiile citologice și bacteriologice: Coloratia **Babes – Papanicolaou**, **May Grumwald Giemsa**, **Gram**, **Ziehl – Neelsen**.

Remarcăm colorația **Babeș- Papanicolau** în care reactivul Hemalaun-ul 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.

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,

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

Nu este prezervată forma vegetativă a parazitului, care este fragilă. Metodele cunoscute deasemenea nu asigură o fixare adecvată, a probei, necesitând numeroase spălări, specifice diverselor colorații, ce determină degradarea sau mobilizarea parazitului din preparatul umed. În plus, timpi mari pentru pregătirea

probelor de colorare, precum și faptul că unele din 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 destinată evidențierii la microscop a structurii celulare a parazitului Blastocystis.

Procedeul de colorare a protozoarelor, implicit al parazitului Blastocystis în produsul biologic (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 utilizează fixatorul Shaudin (soluție de lucru), ca fixator pentru protozoare care prezervă forma vacuolara (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.

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 Shaudin (8 min), și spălare soft cu apă distilată (10 sec), urmată apoi de: Faza 1. Imersie în bai de alcool câte 7 sec în 3 bai de alcool metilic în concentrații descrescătoare (80%, 70%, 50%); Faza 2. Imersie în apă distilată 7 sec. Faza 3. Imersie în baia de **Hematoxilina-eozina Harris** – 5-8 min; Faza 4. Imersie în baie de apă distilată 10 sec; Faza 5. Imersie în baie de HCL 0.05% 3 sec; Faza 6. Imersie în apă de robinet 8 min; Faza 7. Imersii succesive în 4 bai de alcool metilic de concentrații crescătoare (prima baie alcool metilic 50%, a doua 70%, a treia 80%, a patra 95% timp de 7-8 secunde în fiecare baie); Faza 8. Imersie în baie cu **Orange G** pentru 5 min; Faza 9. Imersie în 2 bai succesive de alcool metilic 95% timp de 7 sec; Faza 10. Imersie în baie de **Eozin azure** 50 pentru 2 min; Faza 11. Imersie în baie de alcool metilic 95% 3 min urmată de imersia în alte 2 bai de alcool metilic 95% câte 8 sec; Faza 12. Imersie în 2 bai succesive de alcool metilic absolut câte 8 sec în fiecare; Faza 13. Imersie în baie de xilen diluat 1:9 pentru 8 secunde; Faza 14. Imersie în 2 bai de xilen succesive pentru 8 sec în fiecare; Preparatul astfel colorat se montează în balsam și se acoperă cu o lamelă histologică, remarcându-se la microscop nucleele cu colorația-roșu-violet, citoplasma - bleu până la roz, - vacuola în nuanțe de verde caramiziu, cu granulații de diverse culori în funcție de compoziția vacuolei.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- 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;
- Structurile sunt bine diferențiate datorită fixărilor și afinității coloranților utilizați pentru componentele proteice în special, dar nu numai, și combinațiilor: lipoproteice glicoproteice, etc;
- Este redus timpul de colorare;
- Este redus numărul de manevre de scufundări prin menținerea unui timp scurt de câteva secunde în aceeași baie;
- S-au redus timpurile de fixare și clarificare în xilen;
- Colorația are caracter permanent și stabilă timp îndelungat;
- Colorația obținută are sensibilitate crescută și este foarte generoasă ca gamă de nuanțe

Se prezintă, mai jos, un exemplu de aplicare a procedurii, în legătură cu fig 1, 2, 3, ce reprezintă:

Fig. 1 –traseul tehnologic de coloratie conform procedului,

Fig.2. – un aspect microscopic ce evidențiază parazitul,

Fig. 3 – un aspect microscopic ce evidențiază forma de diagnostic – forma vacuolară. și servește pentru evidențierea la microscop a structurilor celulare ale parazitului *Blastocystis* în produsul biologic (materii fecale), cu fixare și clarificare, în care, într-o primă fază premergătoare colorării se utilizează fixatorul Shaudin (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.

Se prepară frotiuri de fecale, fără a permite frotiurilor să se usuce, uscare ce ar modifica parazitul dar și afinitatea structurilor lui pentru coloranții, cu plasarea imediată în fixatorul Shaudin (8min), și spălare soft cu apă distilată (10 sec), urmată apoi de: faza 1-Imersare în băi de alcool câte 7 sec. în 3 bai de alcool metilic în concentrații descrescătoare (80%, 70%, 50%), faza 2 - Imersare în apa distilată 7 sec., faza 3 - Imersie în baia de **Hematoxilina-eozina Harris** – 5-8min, faza 4 - Imersie în baie de apă distilată 10 sec., faza 5 - Imersie în baie de HCL 0.05%, 3 sec., faza 6- Imersie în apa de robinet 8 min., faza 7 -Imersii succesive în 4 bai de alcool metilic de concentrații crescătoare (prima baie alcool metilic 50%, a doua 70% , a treia 80% , a patra 95% timp de 7-8 secunde în fiecare baie, faza 8- imersie în baia cu **Orange G**, pentru 5 min., faza 9 - imersie în 2 bai succesive de alcool metilic 95% timp de 7 sec., faza 10- imersie în baia de **Eozin azure** 50, pentru 2 min., faza 11- imersie în baie de alcool metilic 95%, 3 min. urmată de imersia în alte 2 bai de alcool metilic 95%, câte 8 sec., faza 12 - imersie în 2 bai succesive de alcool metilic absolut câte 8 sec. în fiecare, faza 13 - imersie în baie de xilen diluat 1:9 , pentru 8 sec., faza 14 - imersie în 2 bai de xilen succesive pentru 8 sec. fiecare, preparatul astfel colorat se montează în balsam și se acoperă cu o lamelă histologică, remarcându-se la microscop nucleele cu colorația- roșu –violet, citoplasma - bleu până la roz,- vacuola în nuanțe de verde caramiziu ,cu granulații de diverse culori în funcție de compoziția vacuolei.

Nucleii **a**, a formelor vacuolare **b**, situate periferic în citoplasma **c**, care 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.

Revendicare

Procedeu de colorare a protozoarelor, de tipul parazitului Blastocystis, în produsul biologic (materii fecale), cu fixare și clarificare, pentru evidențierea la microscop a structurii celulare, **caracterizat prin aceea că** într-o primă fază premergătoare colorării, se utilizează fixatorul Shaudin (soluție de lucru) ca fixator pentru protozoare care prezervă forma vacuolară (de diagnostic), compusă din soluția stoc: clorură de mercur de 600 ml soluție saturată, la care se adaugă alcool etilic (95%) 300 ml; la 95 ml soluție stoc se adaugă 5 ml acid acetic glacial, ca apoi să se prepare frotiuri de fecale, fără a permite frotiurilor să se usuce, uscare ce ar modifica parazitul dar și afinitatea structurilor lui pentru coloranții, cu plasarea imediată în fixatorul Shaudin (8min), și spălare soft cu apă distilată (10 sec), urmată apoi de: faza 1-Imersare în băi de alcool câte 7 sec. în 3 bai de alcool metilic în concentrații descrescătoare (80%, 70%, 50%), faza 2 - Imersare în apa distilată 7 sec., faza 3 - Imersie în baia de **Hematoxilina-eozina Harris** – 5-8min, faza 4 - Imersie în baie de apă distilată 10 sec., faza 5 - Imersie în baie de HCL 0.05%, 3 sec., faza 6- Imersie în apa de robinet 8 min., faza 7 -Imersii succesive în 4 bai de alcool metilic de concentrații crescătoare (prima baie alcool metilic 50%, a doua 70% , a treia 80% , a patra 95% timp de 7-8 secunde în fiecare baie, faza 8- imersie în baia cu **Orange G**, pentru 5 min., faza 9 - imersie în 2 bai succesive de alcool metilic 95% timp de 7 sec., faza 10- imersie în baia de **Eozin azure 50**, pentru 2 min., faza 11- imersie în baie de alcool metilic 95%, 3 min. urmată de imersia în alte 2 bai de alcool metilic 95%, câte 8 sec., faza 12 - imersie în 2 bai succesive de alcool metilic absolut câte 8 sec. în fiecare, faza 13 - imersie în baie de xilen diluat 1:9 , pentru 8 sec., faza 14 - imersie în 2 bai de xilen succesive pentru 8 sec. fiecare, preparatul astfel colorat se montează în balsam și se acoperă cu o lamelă histologică, remarcându-se la microscop nucleele cu colorația- roșu –violet, citoplasma - bleu până la roz,- vacuola în nuanțe de verde caramiziu, cu granulații de diverse culori în funcție de compoziția vacuolei.

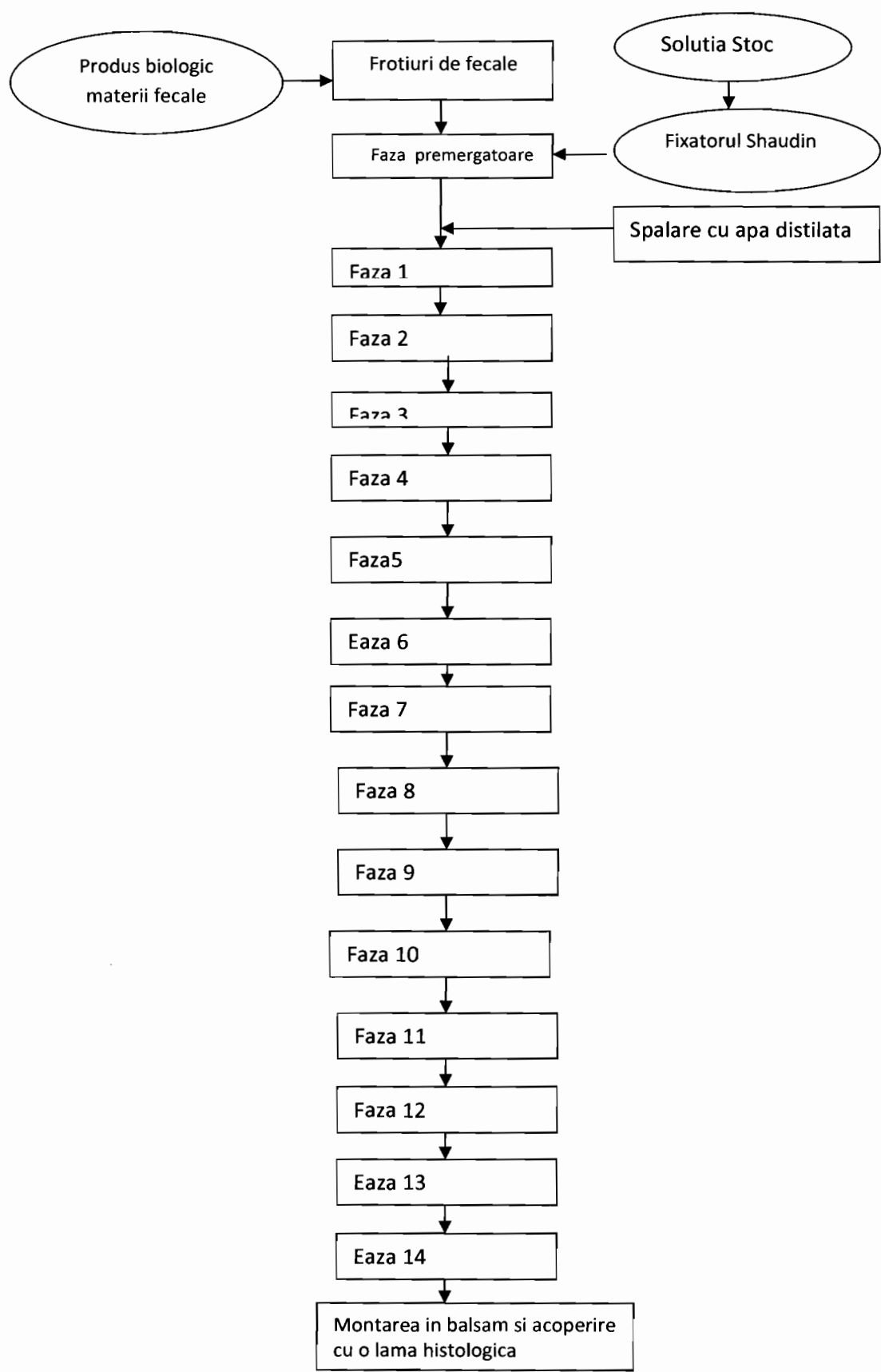


Fig 1

CA

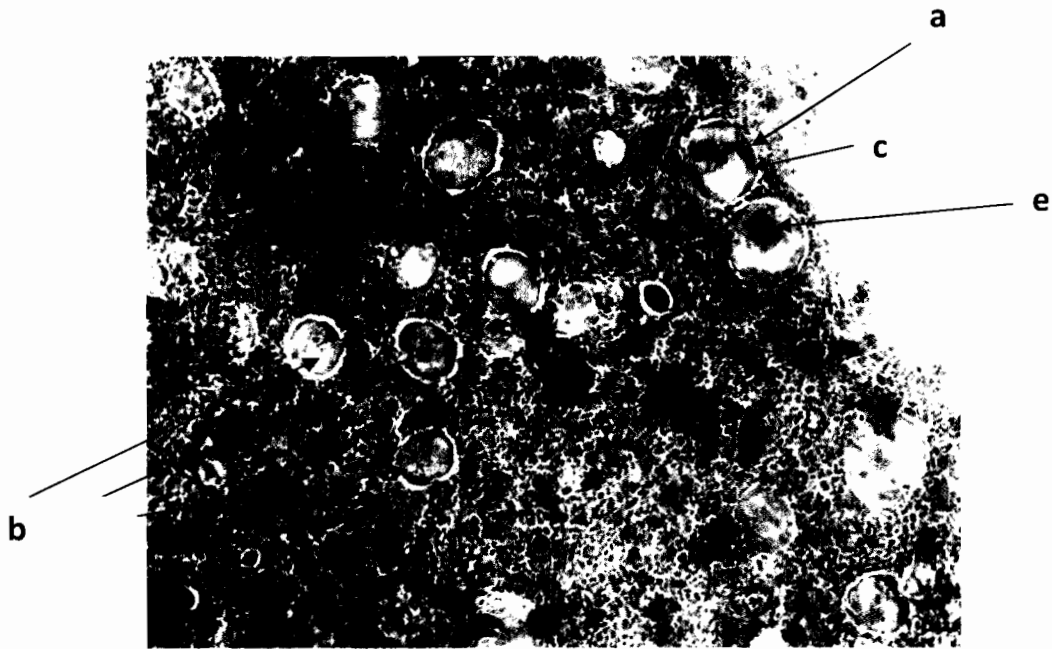


Fig 2



Fig 3

[Handwritten signature]