

И. С. ЗОРАБЯН

О ПОДСЧЕТЕ ЛЕПТОСПИР МЕТОДОМ КРОВЯНЫХ МАЗКОВ

При исследованиях по биологии лептоспир определенное значение придается числу лептоспир в крови, культуральной жидкости, однако по настоящее время еще нет метода точного подсчета их.

Недавно появилась работа А. Ю. Самострельского [1], в которой излагается метод количественной оценки лептоспир в определенном объеме культуральной жидкости путем прямого подсчета их после предварительного обездвижения в камере с известной и постоянной глубиной. Хотя данный метод позволяет определить количество лептоспир с точностью до 10—11%, тем не менее применение его несколько затруднительно, так как требуется специальная камера и расчетная табличка, предварительное обездвижение лептоспир и др.

В настоящей работе описывается метод количественного определения лептоспир в культуральной жидкости при помощи кровяных мазков; в основе его лежит метод Райта.

Техника подсчета такова: свежеполученная дефибринированная кровь после подсчета эритроцитов в камере Горяева смешивается с равным объемом культуральной жидкости; из смеси готовятся мазки, которые окрашиваются по Романовскому-Гимза. Затем под микроскопом проводится подсчет эритроцитов и лептоспир. Соотношение количества эритроцитов и лептоспир в 10 полях зрения должно соответствовать соотношению их количеств в исходных материалах, т. е. в крови и культуральной жидкости.

В зависимости от количества эритроцитов и лептоспир кровь и культурная жидкость могут быть разбавлены определенное число раз.

Подсчет лептоспир проводится по формуле:

$$X = \frac{A \cdot c \cdot v}{B \cdot a}$$

где X—количество лептоспир в миллилитре исследуемой жидкости,
A—количество лептоспир в поле зрения,
c—количество эритроцитов в мм³ крови,
a—разбавление крови,
v—разбавление культуральной жидкости,
B—количество эритроцитов в поле зрения.

Таблица 1

Количество эритроцитов (Э) и лептоспир (Л) в поле зрения (кровь разбавлена два раза)

Мазки	1		2		3		4		5		1		2		3		4		5	
Поле зрения	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л
1 с м е с ь											2 с м е с ь									
1	41	3	41	2	26	2	25	4	10	2	28	4	24	2	27	4	26	3	—	—
2	32	4	40	1	30	3	29	4	34	1	22	4	33	4	33	4	19	1	—	—
3	39	5	39	3	26	2	26	1	22	2	27	4	20	4	21	3	18	3	—	—
4	33	3	38	2	30	4	38	3	23	1	13	5	20	4	36	3	17	2	—	—
5	34	1	38	6	26	3	22	4	43	4	33	4	23	4	45	4	10	0	—	—
6	44	3	31	4	22	2	20	2	33	4	22	3	27	4	19	2	17	2	—	—
7	25	1	43	2	28	3	22	2	31	3	27	3	20	5	19	7	12	4	—	—
8	23	3	31	2	14	2	28	3	20	2	18	5	29	6	26	3	11	5	—	—
9	32	4	31	4	23	2	21	4	25	3	28	2	24	5	34	2	20	2	—	—
10	49	2	37	4	30	3	22	1	34	4	14	4	21	4	15	5	12	3	—	—
Средн.	35,2	2,9	36,9	3,0	25,5	2,6	25,3	2,8	27,5	2,6	22,2	3,8	24,1	4,2	27,5	3,7	16,2	2,5	—	—
3 с м е с ь											4 с м е с ь									
1	16	2	30	1	34	1	24	5	25	3	16	1	28	3	33	0	36	2	33	1
2	20	0	24	1	12	2	30	1	28	2	30	1	22	2	35	1	36	4	23	3
3	24	1	27	4	23	2	25	2	16	1	23	2	23	3	32	4	20	2	22	5
4	17	3	14	2	32	1	20	3	24	4	28	4	24	5	27	2	23	3	30	3
5	14	4	24	1	25	2	15	2	14	3	27	5	32	2	20	2	26	1	24	4
6	20	3	15	1	26	2	17	4	22	2	31	2	24	1	23	5	31	3	26	3
7	18	3	9	2	26	4	21	1	23	3	21	3	25	1	24	2	23	3	24	2
8	25	4	19	3	34	1	2	3	24	2	29	3	22	3	22	3	32	3	18	2
9	26	1	21	3	34	2	13	6	21	2	23	4	29	4	21	2	25	3	23	3
10	22	1	22	2	35	1	23	3	11	1	19	1	24	3	23	1	25	3	21	1
Средн.	20,2	2,2	20,5	2,0	28,1	1,8	20,8	3,0	20,8	2,3	24,7	2,6	25,3	2,7	26,0	2,2	27,7	2,7	24,4	2,7

Для наглядности приводится пример подсчета лептоспир в исследуемой культуральной жидкости. Культура лептоспир выращивалась в среде Терских. Кровь бралась непосредственно из сердца кролика, дефибрировалась в течение 10 мин. при помощи стеклянных бус. В камере Горяева подсчитывалось количество эритроцитов обычным способом: их оказалось 7820000 в мм³. Затем кровь разбавлялась два раза (такое разбавление в наших опытах оказалось наиболее удобным) и тщательно смешивалась с равным объемом культуральной жидкости.

Мазки готовились обычным способом. Равномерно распределялись и высушивались при комнатной температуре, фиксировались метаном в течение 5 мин. и окрашивались свежеприготовленной краской Романовского-Гимза в течение 8—24 ч., в зависимости от качества краски. Подсчет эритроцитов и лептоспир проводился при увеличении 7×90.

Из одной и той же смеси готовилось по пять мазков. Эритроциты и лептоспиры подсчитывались в 10 полях зрения каждого мазка. Величина ошибки в количестве лептоспир зависела от разбавления, техники приготовления смеси и мазков. Из одной и той же порции крови и культуральной жидкости готовились четыре параллельных смеси. Результаты определения количества лептоспир приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, количество эритроцитов и лептоспир в мазках, приготовленных из одной и той же смеси, колебалось в небольших пределах, что подтвердилось и статистической обработкой данных.

В табл. 2. приведены средние арифметические данные всех пяти мазков каждой смеси, на основании которых рассчитана средняя квадратичная ошибка средней арифметической, которая определялась по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

где n —число средних подсчетов, $\bar{x}$ —средняя арифметическая.

Таблица 2

Число лептоспир в мм³ культуральной жидкости
(среднее из 10 полей зрения)

Смеси, мазки	1	2	3	4
1	322100	425800	413300	528800
2	288600	381500	330900	475500
3	398700	250400	381100	426000
4	432700	564000	432600	529400
5	369700	434800	411600	416300
Средн.	362360	411300	393900	475200

Из полученных данных следует, что количество лептоспир в исследуемой нами культуральной жидкости равно 410690 ± 23760 .

Таким образом, данный метод позволяет подсчитать количество лептоспир в культуральной жидкости с ошибкой всего лишь в 5—6% (при подсчете 10 полей зрения каждого из 5 мазков).

Очевидно, что подобным же методом можно определить количество других микроорганизмов, подсчет которых в счетной камере затруднителен или невозможен.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 4/V 1968 г

Ի. Ս. ԶՈՀՐԱԹՅԱՆ

ԼԵՊՏՈՍՊԻՐՆԵՐԻ ՀԱՇՎՈՒՄԸ ԱՐՅԱՆ ՔՍՈՒԿԻ ՄԵԹՈԴՈՎ

Ա մ փ ն փ ն ի մ

Լեպտոսպիրների հաշվման նոր մեթոդիկան, համեմատած գոյություն ունեցող մեթոդների հետ, բավական դյուրին է և ընդամենը թույլ է տալիս 5—6% սխալ:

Հաշվման սկզբունքը թարմ, դեֆիրինացված արյան մեջ հաշվում են էրիտրոցիտների քանակը սովորական մեթոդով (Գորյակի կամերայով), որը խառնվում է նույն քանակի լեպտոսպիրային կուլտուրայի հետ:

Խառնուրդից պատրաստվում է քսուկ, որը ներկվում է ըստ Ռոմանովսկու Գիմզայի. այնուհետև միկրոսկոպի միջոցով հաշվում են էրիտրոցիտների և լեպտոսպիրների քանակը 10 տեսադաշտում:

Այդ քանակը պետք է համապատասխանի տվյալ կուլտուրայի լեպտոսպիրների քանակին:

Արյունը և կուլտուրալ հեղուկը կարելի է նոսրացնել որոշակի քանակով: Հաշվումը կատարել հետևյալ բանաձևով

$$X = \frac{A \cdot c \cdot b}{B \cdot a}$$

որտեղ՝ X — լեպտոսպիրների քանակն է 1 մլ հետազոտվող հեղուկի մեջ

A — լեպտոսպիրների քանակը տեսադաշտում

c — արյան էրիտրոցիտների քանակը մմ³-ում

a — արյան նոսրացումը

b — կուլտուրալ հեղուկի նոսրացումը

B — էրիտրոցիտների քանակը տեսադաշտում

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Самострельский А. Ю. Лабораторное дело, 1966, 2, стр. 105.