

## Zastosowanie płynu Hoyer'a do diagnostyki i badań morfologicznych niektórych pasożytów

### Usage of the Hoyer's medium for diagnostics and morphological studies of some parasites

Danuta Cielecka<sup>1</sup>, Rusłan Salamatin<sup>1,2</sup>, Aleksandra Garbacewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

<sup>2</sup>Instytut Zoologii im. I. I. Schmalhausena, Narodowa Akademia Nauk Ukrainy, ul. Chmielnickiego 15, Kijów, 01601, Ukraina

Adres do korespondencji: Danuta Cielecka; E-mail: danuta.cielecka@wum.edu.pl

**ABSTRACT.** Various modification of the mixture of gum arabic with chloral hydrate can be used for mounting of small arthropods as well as some helminths. However, in diagnostic laboratories in Poland they seem to remain unknown. The authors of current work present examples of the Hoyer's medium application. The medium has been composed according to the initial, given by Hoyer, hundred-years-old recipe, which was the root of all other, later used recipes. Hoyer's medium is universal in action and very comfortable to use in slides for microscope investigation. It gives the immediate light-through effect, so it can be helpful in fast diagnostics. At the same time it allows to store the slides for a relatively long time e.g. with education purpose.

**Key words:** Arthropods, helminths, microscopy, diagnostic imaging, clinical laboratory technique

#### Wstęp

Zastosowanie gumy arabskiej połączonej z wodzianem chloralu, jako podstawowych składników medium używanego do zatapiania materiałów biologicznych i montowania preparatów mikroskopowych, ma długą historię, związaną z polskim lekarzem-uczonym H. F. Hoyerem<sup>1</sup>. Substancje te, roz-

puszczone w wodzie, od przeszło 100 lat używane są przede wszystkim przez entomologów i akarologów, chociaż oryginalnie Hoyer zastosował je do badań histologicznych.

Ponieważ oryginalna praca Hoyer'a [1] nie zawierała dokładnego ilościowego składu medium, do praktyki przeszedł przepis płynu Hoyer'a, podany przez Merceta [2]. Trochę wcześniej Faure [3] za-

<sup>1</sup> Hoyer Henryk Fryderyk (1834–1907), histolog, embriolog, lekarz, biolog. Urodził się w Inowrocławiu. Studiował medycynę we Wrocławiu, a następnie w Berlinie, gdzie uzyskał stopień doktora medycyny i chirurgii. W 1859 r. został adiunktem fizjologii i histologii w Akademii Medyko-Chirurgicznej w Warszawie, a następnie profesorem nadzwyczajnym. Od 1862 r. – profesor zwyczajny histologii i embriologii Wydziału Lekarskiego Szkoły Głównej (później Uniwersytet Warszawski). W roku 1871 przeprowadził przewód doktorski z medycyny na Uniwersytecie Kijowskim. W Uniwersytecie Warszawskim pracował jako profesor zwyczajny do 1894 r. Jego dorobek naukowy obejmuje ponad 100 tytułów z zakresu histologii, anatomii porównawczej, embriologii, fizjologii, mikrobiologii i filozofii przyrody. Był jednym z najwybitniejszych znawców techniki badań mikroskopowych, twórcą nowych metod barwienia. W 1873 r. miał przyznany medal srebrny przez Towarzystwo Miłośników Przyrodoznawstwa, Antropologii i Etnografii za wystawienie wzorowych preparatów histologicznych. Opracował pierwszy w literaturze polskiej oryginalny podręcznik akademicki *Histologia ciała ludzkiego* (1862). (na podstawie: Słownik biologów polskich. 1987. (Red. S. Feliksiak). PWN, Warszawa)

proponował swój przepis, ale z całkiem innymi proporcjami wyjściowych komponentów i ponadto, z dodatkowym składnikiem – kokainą. W ciągu następnych lat proponowane było wiele modyfikacji przepisu, różniących się proporcjami składników i uzupełniającymi substancjami, takimi jak: syrop glukozowy czy kwas octowy. Pojawienie się licznych przepisów spowodowało znaczne zamieszanie w nazewnictwie stosowanych mediów. Do dzisiaj używane są różne płyny o różnych nazwach (np. płyn Faure, de Faure, Berlese, Faure-Berlese, Swana, Hoyer, Puri'ego, Davidsona i inne), których skład nie zawsze jest możliwy do określenia, jeżeli sugerować się wyłącznie nazwą. W przeglądzie technik wykonywania oraz konserwacji preparatów mikroskopowych stosowanych w Muzeum Historii Naturalnej w Londynie, Brown w rozdziale „Gum chloral mountains” podaje przepisy ponad dwudziestu, bardziej lub mniej różniących się mediów [4]. Analizie różnych przepisów „gum-chloral medium” poświęcona jest osobna praca Uptona [5]. Niedawno zaproponowana została całkiem nowa modyfikacja płynu Hoyer z dodatkiem jodu i jodku potasu w roztworze wodnym, jako bardzo praktyczna metoda do badania drobnych roztoczy [6].

Do receptur opartych na gumie arabskiej sięgają również helmintolodzy, częściej w celu badania tasiemców, rzadziej przywr i nicieni. Na ogół używany przez siebie płyn nazywają płynem Faure lub Berlese, a nawet Faure-Berlese, rzadziej Hoyer.

Z doświadczeń własnych wiemy, że w laboratoriach zajmujących się rutynową diagnostyką w Polsce omawiane płyny praktycznie nie są stosowane. Ponieważ, przepisy na wykonanie tych płynów oraz gotowe (komercyjne) produkty nie wszystkim są znane, celem tej pracy jest przedstawienie doświadczeń naszej pracowni ze stosowania jednego z płynów – płynu Hoyer, do różnego typu badań pasożytów pochodzących z różnych grup systematycznych.

## Material i metody

Medium do montowania preparatów z pasożytów zostało wykonane wg składu i procedury opisanej przez Dubinią w metodycznej publikacji na temat parazytologicznego badania ptaków [7]. Podając przepis autorka użyła nazwy „mieszanina gumy arabskiej (płyn Faure-Berlese)”. Ponieważ struktura składników medium w przepisie Dubiniy jest niemalże identyczna ze składem płynu Hoyer wg Merceta [2], a za to różni się znacząco od innych

płynów, które również bazują na gumie arabskiej i wodzianie chloralu, przyjęliśmy, aby używać nazwy „płyn Hoyer”.

### Skład używanego przez nas płynu Hoyer wg recepty podanej przez Dubinią [7]

Wodzian chloralu (hydrat chloralu, ang. chloral hydrate,  $\text{Cl}_3\text{CCH}(\text{OH})_2$ ) – 160 g

Guma arabska (ang. gum arabic) – 24 g

Gliceryna – 16 ml

Woda destylowana – 40 ml

### Dla porównania, oryginalna receptura płynu Hoyer wg Merceta [2]

Wodzian chloralu – 200 g

Guma arabska – 30 g

Gliceryna – 20 ml

Woda destylowana – 50 ml

### Sposób przygotowania płynu Hoyer

Do szczelnej szklanej butelki nalać wodę, wsypać gumę arabską i zostawić w cieplarni na kilka godzin w temperaturze 50–60°C. Dodać glicerynę i wodzian chloralu, zostawić w cieplarni na 1–3 dni, do pełnego rozpuszczenia się gumy arabskiej. Zaleca się również przefiltrowanie otrzymanego płynu w cieplarni przez gazę. Płyn przechowywać w ciemnym miejscu; do bieżącej pracy można odlać niewielką ilość do mniejszego pojemnika z zakraplaczem.

### Sporządzanie preparatów

Na podstawowym szkiełku na badany materiał (zeskrobina skóry, rzęsa, włos lub sierść) nanieść kroplę płynu Hoyer, przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Preparat można oglądać pod mikroskopem natychmiast (rzęsa, włos), lub po kilku minutach (naskórek). Gdy jest wystarczająco prześwietlony, małe roztocza są łatwe do zaobserwowania.

Helminty, utrwalone lub nieutrwalone (małe okazy albo fragmenty), zalewa się kroplą płynu Hoyer i po przykryciu szkiełkiem nakrywkowym preparat szybko staje się przezierny i nadaje się do oglądania.

### Dokumentacja fotograficzna

Użyto kamery fotograficznej Olympus C-7070, zamontowanej na mikroskopie Olympus BX40. Do sterowania kamery przez komputer i archiwizacji zdjęć użyte zostało oprogramowanie Cam2Com (Wersja 4.1.2.43).

### Pasożyty zatopione w płynie Hoyer

Do oceny przydatności płynu Hoyer, jako medium do zatapiania materiałów biologicznych, użyliśmy preparatów, świeżo sporządzonych albo przechowywanych przez ponad 10 lat, z pasożytów należących do różnych grup systematycznych.

1. Samica świerzbowca (*Sarcoptes scabiei*) w wycinku naskórka pacjenta, preparat sporządzony bez jakiegokolwiek uprzedniego utrwalania w listopadzie 1998 r., na fotografii stan z czerwca 2009 r.
2. Nużeńiec (*Demodex* sp.) na rzęsach pobranych od pacjenta, również bez utrwalania, zdjęcie zrobiono po 1 godz. od zmontowania preparatu.
3. Skoleks tasiemca *Dilepis undula* z wieńcem haków ryjkowych, zatopiony po utrwaleniu w alkoholu.
4. Fragment strobili *Aploparaksis* sp., zatopiony po utrwaleniu w alkoholu.
5. Jajo *Toxocara canis* uzyskane metodą flotacji z gleby, bez utrwalenia, stan po 3 latach od zrobienia preparatu.
6. Furkocerkaria przywry (Schistosomatidae gen. sp.), utrwalona alkoholem, zabarwiona karminem, stan po 2 latach od zatopienia materiału.

## Wyniki i ich omówienie

### Wykrywanie małych roztoczy

Postępowanie diagnostyczne w kierunku świerzbu i nużycy wywołanych przez różne gatunki małych Acari, zarówno u zwierząt jak i u ludzi, opiera się na przeszukiwaniu pod mikroskopem preparatów sporządzonych z zeszkrobiny pobranej ze zmienionych miejsc skóry albo z depilowanych rzęs, brwi, włosów czy sierści. W ostatnich latach obserwujemy zwiększone zapotrzebowanie na wykonywanie badań laboratoryjnych w kierunku tych skórnych parazytów. Przykładowo, ludzka postać nużycy, w zasadzie uważana za niegroźną, w ostatnim okresie jest coraz częściej brana pod uwagę jako przyczyna, lub jako dodatkowy czynnik etiologiczny, w przewlekłych i nie poddających się leczeniu zapaleń skóry i brzegów powiek. A i przypadków świerzbu w Polsce wcale nie ubywa.

W różnych publikacjach przeznaczonych dla diagnostów, polecane są rozmaite i bardzo zróżnicowane metody badania tych materiałów. W laboratoriach dermatologicznych do wykrywania małych roztoczy z rodzaju *Sarcoptes* i *Demodex* najczęściej stosuje się macerację zeszkrobiny naskórka lub włosów położonych na szkiełku podstawowym w kropli 4–5% roztworu KOH lub NaOH przez 1 godz.; również polecane są różne płyny i rozpuszczalniki dobrze przenikające do tkanek i tym samym prześwietlające materiał, takie jak: gliceryna, kwas mlekowy, laktofenol, dimetylosulfotlenek (DMSO), a nawet ksylen. Do wykrywania świerzbowców *Sarcoptes* zalecane jest przez Centrum Zwalczenia

i Zapobiegania Chorób sporządzenie preparatów z użyciem laktofenolu i błękitu anilinowego [8]. Wszystkie te wymienione substancje zapewniają szybką diagnozę, ale bezpowrotnie uszkadzają materiał (szczególnie przez roztwory zasad) i w rezultacie nie dają efektu trwałego preparatu.

Najprostszą metodę ujawniania nużeńców, oglądanie usuniętego owłosienia i zeszkrobiny po położeniu ich między suchymi szkiełkami podstawowymi, stosują laboratoria o dużym doświadczeniu [9,10], ale dla osób początkujących może to być za trudne. Do montowania trwałych preparatów z drobnych stawonogów również mogą być używane takie media, jak glicero-żelatyna, PVA, *rhodoviol*, a także płyny zawierające gumę arabską [11,12]. Czasem można napotkać i bardzo skomplikowane metody, takie jak np. barwienie za pomocą błękitu Evansa, Sudanu III, czy barwników fluorescencyjnych, które są jednak drogie i trudne do wykonania w przeciętnym laboratorium.

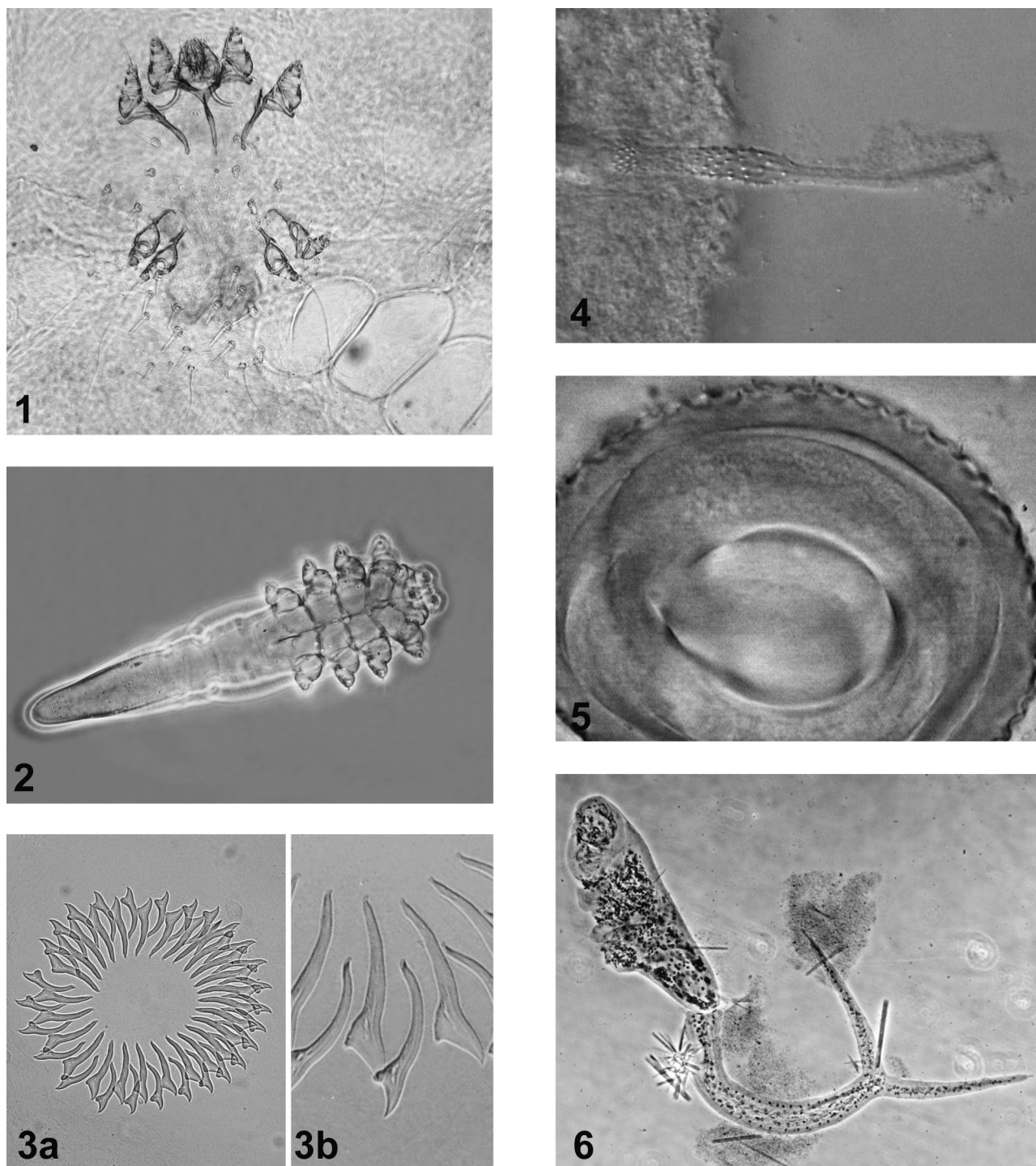
W preparatach, w których użyliśmy płynu Hoyera, w świerzbowcu (Fot. 1, preparat sporządzony 11 lat temu) i w nużeńcu (Fot. 2, materiał świeżo zatopiony w płynie), widoczne są wszystkie struktury związane z chitynowymi powłokami ciała. Ponieważ są to elementy różnie załamujące światło, szczególnie dobre efekty daje obserwacja w mikroskopie z kontrastem fazowym lub kontrastem Nomarskiego. Preparaty są zabezpieczone przed wysychaniem poprzez otoczenie brzegów szkiełka nakrywkowego lakierem i są używane jako szkoleniowe dla studentów.

### Uzupełniająca metoda do badań morfologicznych helmintów

Zastosowania mieszaniny gumy arabskiej i wodoru chloralu w badaniach pasożytniczych płazińców są rozmaite. Różni autorzy posługiwali się tym medium przy badaniu, na przykład, systemu nerwowego przywry [13], haków ryjkowych tasiemców ssaków owadożernych [14], skoleksów i jaj *Echinococcus multilocularis* [15].

W naszej praktyce płyn Hoyera wykorzystujemy do obserwacji takich detali, jak: skoleksy, haki, kolce, dojrzałe jaja, oderwane pojedyncze proglotydy, małe larwy typu cercarii, cysticercoidów, często wraz z żywicielami pośrednimi, np. małymi skorupiakami. Takie materiały nie wymagają poprzedzającego utrwalenia ani barwienia (ale te zabiegi mogą być również wykonane). Używany przez nas płyn Hoyera, daje bardzo dobry efekt prześwietlenia tkanek i uwidacznia, między innymi, takie struktury, jak haki ryjkowe (Fot. 3), przedsionki płciowe,





Fot. 1-6. Pasożyty zatopione w płynie Hoyer'a. 1. Świerzbowiec *Sarcoptes scabiei*, samica i jaja w naskórku; 2. Nużeniec *Demodex* sp., osobnik dorosły; 3. Tasiemiec *Dilepis undula*, wieniec haków ryjkowych (a), haki (b); 4. Tasiemiec *Aploparaksis* sp., cirrus, widoczne uzbrojenie na powierzchni części bazalnej; 5. Nicień *Toxocara canis*, jajo z larwą, na powierzchni widoczne urzeźbienie; 6. Furkocerkaria przywry z rodziny Schistosomatidae, widoczna krystalizacja medium.

Photos 1-6. Parasites mounted in Hoyer's medium. 1. Mite *Sarcoptes scabiei*, female and eggs in epidermis; 2. Mite *Demodex* sp., adult; 3. Tapeworm *Dilepis undula*, rostellar hooks (a), suckers (b); 4. Tapeworm *Aploparaksis* sp., armed cirrus; 5. Nematode *Toxocara canis*, egg with larva; 6. Cercaria of blood flukes (Schistosomatidae), note crystallization of medium.

przewody narządów płciowych, kolce na cirrusie (Fot. 4), urzeźbienie na powierzchni otoczek jaj, które pozwala na odróżnienie pokrewnych i bardzo podobnych gatunków (Fot. 5). W przeciwieństwie do preparatów sporządzonych z robaków barwionych, te powinny być oglądane w mikroskopie z ciemnym polem widzenia i przy użyciu kontrastu fazowego albo kontrastu Nomarskiego. Preparaty zamknięte w płynie Hoyerera są bardzo dobrym uzupełnieniem klasycznych preparatów barwionych karminem i zamykanych w balsamie kanadyjskim, szczególnie do śledzenia morfologii tasiemców. Jednocześnie, medium to dobrze sprawdza się podczas przechowywania preparatów, jak wynika z naszego doświadczenia, przez okres, co najmniej, kilkunastoletni, jeżeli są odpowiednio zabezpieczone.

#### Zalety i wady płynu Hoyerera

1. Jest to medium, w którym pasożyty jednocześnie są zabijane, konserwowane, prześwietlane i montowany jest preparat;
2. Daje dobry i natychmiastowy efekt prześwietlający, po kilku minutach obiekty stają się bardzo przejrzyste i struktury morfologiczne dobrze widoczne;
3. W przechowywanych preparatach, już po kilku dniach, płyn Hoyerera ulega zagęszczeniu, częściowo odparowuje i później twardnieje. W większości przypadków preparaty pozostają w dobrym stanie przez kilka-kilkanaście lat, jednakże, w niektórych dochodzi do krystalizacji medium (Fot. 6), prawdopodobnie w skutek absorpcji wody [16] albo nadmiernego podsuszenia. Dla uniknięcia lub opóźnienia tych niekorzystnych procesów, zaleca się otaczanie szkiełka przykrywkowego lakierem (my stosujemy emalię nitrocelulozową, można też użyć lakieru do paznokci).
4. Medium to pozwala na gromadzenie preparatów, ich przechowywanie i oglądanie w późniejszym, dogodnym terminie nawet po wielu latach. Tak przygotowane preparaty mogą posłużyć do badań morfologicznych, a są na tyle trwałe, że mogą być wykorzystane w celach szkoleniowych i dydaktycznych;
5. Jeżeli zaistniałaby konieczność rozmontowania preparatu i odzyskania materiału, jest to możliwe ze względu na łatwość rozpuszczania się w wodzie wysuszonego medium.

#### Wniosek

Płyn Hoyerera jest uniwersalnym w działaniu, wygodnym w użyciu środkiem do montowania trwałych preparatów ze świerzbowców, nużeńców

i z niektórych helmintów. Jego przydatność jest duża, szczególnie w szybkiej diagnostyce, ale również w pracach o charakterze badawczym oraz do wykorzystania na zajęciach ze studentami.

#### Literatura

- [1] Hoyer H. 1882. Beiträge zur histologischen Technik. *Biologisches Zentralblatt* 2: 17–24.
- [2] Mercet R. G. 1912. Los enemigos de los parásitos de las plantas. *Trabajos del Museo de Ciencias Naturales* 10: 1–306.
- [3] Faure G. 1910. Liquido conservatore per frammenti di organi e per piccoli organismi inerti. *Annali di Botanica* 8, fasc. 1: 63–64.
- [4] Brown P. A. 1997. A review of techniques used in the preparation, curation and conservation of microscope slides at the Natural History Museum, London. *The Biology Curator* 10 Suppl.: 1–33.
- [5] Upton M. S. 1993. Aqueous gum-chloral slide mounting media: an historical review. *Bulletin of Entomological Research* 83: 267–274.
- [6] Faraji F., Bakker F. 2008. A modified method for clearing, staining and mounting plant-inhabiting mites. *European Journal of Entomology* 105: 793–795.
- [7] Dubinina M. N. 1971. Parazitologičeskoe issledovanie ptic. Nauka, Leningrad.
- [8] Laboratory Identification of Parasites. <http://www.dpd.cdc.gov>
- [9] Humiczewska M. 1991. *Demodex folliculorum* oraz *Demodex brevis* (Acarida) jako czynniki przewlekłego zapalenia brzegów powiek. *Wiadomości Parazytologiczne* 37: 127–130.
- [10] Czepita D., Kuźna-Grygiel W., Kosik-Bogacka D. 2005. Nużeniec jako czynnik etiologiczny przewlekłego zapalenia brzegów powiek. *Klinika Oczna* 10/12: 722–724.
- [11] Skierska B. 1976. Zbiór, zabezpieczenie zebranych stawonogów, przygotowanie materiałów do dalszych opracowań, transport. W: *Arachno-entomologia lekarska*. (Red. Z. Żółtowski). PZWŁ, Warszawa: 341–360.
- [12] Garcia L. S., Bruckner D. A. 1997. *Diagnostic Medical Parasitology*. ASM Press, Washington.
- [13] Niewiadomska K., Moczoń T. 1987. The nervous system of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Trematoda, Diplostomatidae). *Parasitology Research* 73: 46–49.
- [14] Vasileva G. P., Tkach V. V., Genov T. 2005. Two new hymenolepidid species (Cestoda, Hymenolepididae) from water shrews *Neomys fodiens* Pennant (Insectivora, Soricidae) in Bulgaria. *Acta Parasitologica* 50: 56–64.
- [15] Kharchenko V. A., Korniyushin V. V., Varodi E. I., Malega O. M. 2008. Occurrence of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda, Taeniidae) in red foxes (*Vul-*

- pes vulpes*) from Western Ukraine. *Acta Parasitologica* 53: 36–40.
- [16] Famadas K. M., Serra-Freire N. M., Faccini J. L. H. 1996. A note on slide-mounting technique of unfed immature stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 139–140.
- Wpłynęło 15 czerwca 2009  
Zaakceptowano 12 lipca 2009