

ПРАКТИЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ НОВОГО МЕТОДУ ФАРБУВАННЯ ВОЛОГИХ МАЗКІВ КАЛУ ДЛЯ МІКРОСКОПІЧНОГО ВИЯВЛЕННЯ ПРОТОЗОЙНИХ ПАРАЗИТІВ

Кириченко¹ І.І., Похил² С.І.,
Тимченко² О.М., Крестецька² С.Л.

¹Військово-медичний клінічний центр Північного
регіону МО України

²ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.
Мечникова НАМН України»

Вступ

Дотепер протозойні кишкові хвороби (ПКХ) зумовлюють значний соціально-економічний тягар і є визнаною проблемою для охорони здоров'я в усіх країнах світу [1-3]. Регіони світу істотно різняться як за рівнем інвазованості населення кишковими паразитами, так і за видовим спектром домінуючих збудників ПКХ. У економічно розвинутих країнах Європи і в Україні основними етіологічними чинниками ПКХ є *Blastocystis* sp. (раніше *Blastocystis hominis*, збудник бластоцистозу), *Dientamoeba fragilis* (збудник діентамебіазу), *Giardia lamblia* (синоніми назви - *G. intestinalis*, *G. duodenalis*, збудник лямбліозу) і *Cryptosporidium* spp. (найчастіше видів *C. parvum* і *C. hominis*, збудник криптоспоридіозу), тоді як протозойні кишкові інвазії іншої етіології виявляються відносно рідко [1,4-7].

Діагноз ПКХ у людей встановлюється з урахуванням епідеміологічних, клінічних даних та результатів спеціальних лабораторних досліджень. Останні відіграють провідну роль при верифікації етіології ПКХ з огляду на їх поліетіологічність та загальну подібність клінічних проявів кишкових інфекцій різної етіології (вірусних, бактеріальних, грибкових, паразитарних) [1, 8, 9]. Виявлення у біологічному матеріалі (калі, жовчі, вмісті або біоптаті кишечника) хвороботворних кишкових найпростіших (*Blastocystis* sp., *D. fragilis*, *G. lamblia* та *Cryptosporidium* spp.) є обов'язковим елементом діагностики спричинюваних ними захворювань і може здійснюватись різними методами: мікроскопічними (виявлення клітин паразитів), імунологічними (виявлення антигенів паразитів), молекулярно-генетичними (виявлення нуклеїнових кислот паразитів), культуральними (виявлення росту культур паразитів у посівах матеріалу на живильних середовищах) та іншими [7, 9-11].

Донині методи мікроскопії калу (нативного, консервованого або збагаченого методами флотації чи седиментації) завдяки технічній доступності та відносній дешевизні, залишаються найбільш вживаними в більшості країн світу при проведенні лабораторної діагностики ПКХ у людей [1, 9-14]. Принцип цих методів полягає у візуальному (наочному) виявленні та ідентифікації за допомогою світлової мікроскопії у мазках калу «діагностичних форм» кишкових протозойних паразитів (трофозоїтів, прецист, цист та ооцист), що здійснюється з

урахуванням притаманних конкретному виду найпростіших морфологічних особливостей (форми, розміру, зовнішньо- і внутрішньоклітинних елементів структури) та їх тинкторіальних властивостей (сприйнятливості до фарбування різними барвниками) [9, 11-14]. Мікроскопічне дослідження зразків калу (ЗК) для виявлення *Blastocystis* sp., *D. fragilis*, *G. lamblia* та *Cryptosporidium* spp. включає послідовне виконання трьох груп процедур: виготовлення мазків, фарбування мазків (так як використання незабарвлених мазків свіжовідбраного калу із фізіологічним розчином є неефективним для виявлення зазначених паразитів за виключенням рухливих трофозоїтів *G. lamblia*) та мікроскопію забарвлених мазків [12-15]. Ефективність мікроскопічного виявлення/ідентифікації у ЗК хвороботворних найпростіших залежить від багатьох факторів, але у першу чергу - від методу фарбування мазку, який повинен забезпечувати надійну візуалізацію характерних ознак у забарвлених клітинах паразитів для їх ідентифікації та диференціації від морфологічно подібних «артефактів», що часто бувають присутні у ЗК: клітин дріжджеподібних грибів, лейкоцитів, макрофагів, еритроцитів, мікрокрапель жиру, неперетравленого пилку, спор, зерен крохмалю, оболонки ядер та іншого детриту рослин тощо.

Звичайний метод фарбування йодними розчинами вологих мазків ЗК, незважаючи на його практичну популярність (завдяки простоті і швидкості відтворення), не дозволяє в умовах мікроскопії низького та високого збільшення (суха імерсія, об'єктиви $\times 10$ і $\times 40$ відповідно), які застосовуються при перегляді такого типу вологих, тимчасово забарвлених мазків (ВТЗМ), надійно візуалізувати важливі особливості структури протозойних паразитів, що у цілому знижує ефективність їх ідентифікації у досліджуваному матеріалі. Метод фарбування мазків калу йодними розчинами є абсолютно непридатним для виявлення *D. fragilis*, а результати виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp., *G. lamblia* та *Cryptosporidium* spp. при його використанні вважаються попередніми. За таких умов виявлені об'єкти позначають як «подібні» на певні паразити, наприклад: виявлено *Blastocystis*-подібні об'єкти (англ. detected of *Blastocystis*-like objects) [9, 11-15]. Остаточні ж результати виявлення/ідентифікації у ЗК *Blastocystis* sp., *D. fragilis*, *G. lamblia* та *Cryptosporidium* spp. ґрунтуються на даних мікроскопічного дослідження фіксованих (сухих) перманентно (постійно) забарвлених мазків (ФПЗМ) [1, 6, 7, 9, 11-15]. Загальновизнані переваги останніх (у порівнянні із ВТЗМ) включають: вищу чіткість і контрастність забарвлення клітин кишкових протозойних паразитів, що дозволяє їх надійно ідентифікувати та диференціювати від присутніх у матеріалі артефактів; придатність для мікроскопічного перегляду в умовах надвисокого збільшення (синонім: в умовах високої роздільної здатності, тобто - з масляною імерсією і об'єктивом $\times 100$), що забезпечує візуалізацію дрібних деталей будови найпростіших; практично необмежену тривалість збереження препаратів мазків та

стабільність вихідної мікроскопічної картини у них, що уможливило їх повторний перегляд та використання таких препаратів у якості навчальних. Проте на сьогодні не існує універсального (єдиного) методу перманентного фарбування мазків калу, який би забезпечував достатньо якісне забарвлення усіх хвороботворних кишкових найпростіших. Для мікроскопічного виявлення *Blastocystis* sp., *D. fragilis* і *G. lamblia* найчастіше застосовуються методи перманентного фарбування трихромом за модифікацією Вітлі (англ. Wheatley's modification trichrome stain) та залізним гематоксилином за Гейденгайном (англ. Heidenhain's iron-hematoxylin stain) [7, 9, 11-15]. Кожен із цих двох методів перманентного фарбування мазків калу має свої переваги і обмеження в аспекті ефективності мікроскопічного виявлення зазначених паразитів, що детально розглянуто у публікаціях [16, 17]. Але жоден з них у класичній технології відтворення непридатний для мікроскопічного виявлення ооцист *Cryptosporidium* spp., так як останні не забарвлюються трихромовим барвником та розчином залізного гематоксилину і виглядають як сферичної форми прозорі плями, котрі називають «клітинами-привидами». Для контрастного забарвлення ооцист *Cryptosporidium* spp. (які є кислотостійкими морфотипами паразитів) використовують кислотні методи перманентного фарбування на кшталт модифікованого (холодного – без процедури нагрівання) методу за Циль-Нільсеном (англ. modified (cold) Ziehl-Neelsen staining method) [6, 9, 11-15]. У свою чергу цей метод фарбування є непридатним для диференційного забарвлення клітин *Blastocystis* sp., *D. fragilis* і *G. lamblia*. Отже, з урахуванням вище викладеного традиційний алгоритм повноцінного мікроскопічного аналізу ЗК для виявлення *Blastocystis* sp., *D. fragilis*, *G. lamblia* та *Cryptosporidium* spp. передбачає: одночасне (паралельне) виготовлення із одного і того ж самого ЗК трьох препаратів мазків: одного ВТЗМ, обробленого водним йодним барвником (1 % розчином Люголя, Д'Антоні, Добелла тощо) і двох ФПЗМ, з яких один повинен бути фарбованим трихромом за модифікацією Вітлі (або залізним гематоксилином за Гейденгайном), а інший – модифікованим методом за Циль-Нільсеном; виконання мікроскопічного перегляду трьох зазначених препаратів мазків за умов різної роздільної здатності, тобто – ВТЗМ при низькому і високому збільшенні (суха імерсія, об'єктиви $\times 10$ і $\times 40$), а ФПЗМ при надвисокому збільшенні (масляна імерсія, об'єктив $\times 100$) [9, 11-15]. Очевидними є технічна обтяжливість, висока ресурсо-, праце- і часозатратність виявлення кишкових протозойних паразитів у ЗК з дотриманням традиційного алгоритму мікроскопічного дослідження. Для оптимізації останнього науковці різних країн світу активно розробляють такі методи фарбування мазків калу та потрібних для цього нових барвників, використання яких одночасно поєднувало б переваги простої і швидкої техніки виготовлення ВТЗМ із надійністю мікроскопічного виявлення/ідентифікації

хвороботворних кишкових найпростіших у ФПЗМ [18-22]. Препарати мазків, виготовлені за допомогою цих нових методів фарбування, отримали назву «вологих напівпостійно забарвлених мазків» (ВНПЗМ; англ. semi-permanent stain of wet mount).

Метою роботи було встановлення практичної ефективності (діагностичної результативності, ресурсо-, праце- і часозатратності) нового методу фарбування (барвником бетайод-швидкий зелений-гліцерин) вологих мазків калу для мікроскопічного виявлення кишкових протозойних паразитів у порівнянні з групою традиційних методів фарбування аналогічного призначення.

Матеріали та методи. Сто шістдесят консервованих (10% розчином формаліну) ЗК (кожен з яких є сумішшю трьох порції калу, відібраних через добу) було отримано від військовослужбовців під час надання їм стаціонарної медичної допомоги (лютий-липень 2023 р.) у інфекційному відділенні Військово-медичного клінічного центру Північного регіону Міністерства оборони України (військова частина А-3306). Усі військовослужбовці були чоловічої статі, віком від 19 до 59 років і мали різні симптоми ураження шлунково-кишкового тракту (ШКТ): діарею, нестійкість випорожнень, біль у животі, метеоризм, блювання, нудоту, відрижку тощо (далі в/сл.). У день госпіталізації в/сл. домінували первинні діагнози: «гострий ентероколіт» та «харчова токсикоінфекція».

ЗК від в/сл. були збагачені методом формалін-етилацетатної седиментації [12]. Із кожного збагаченого ЗК було паралельно виготовлено чотири типи препаратів: ВНПЗМ, забарвлений новим комбінованим рідким барвником «бетайод-швидкий зелений-гліцерин» (БЙ-ШЗ-ГЛ); ВТЗМ, забарвлений 1% розчином Люголя; два варіанти ФПЗМ, один з яких забарвлений залізним гематоксилином за Гейденгайном (або трихромом за Вітлі), а інший - модифікованим кислотним за Циль-Нільсеном.

БЙ-ШЗ-ГЛ є сумішшю рівних об'ємів Бетайоду (ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна), 1% водного (підкисленого) розчину швидкого зеленого (Sigma-Aldrich Co., США) та гліцерину (ТОВ «БіохімІнвест», Україна) із кінцевою концентрацією кожного компоненту близько 33,3 об. %. Бетайод і гліцерин є готовими для використання комерційними продуктами, а технологія виготовлення 1% водного (підкисленого) розчину швидкого зеленого була такою: у скляну колбу вносили 1 г порошку швидкого зеленого, додавали 1 мл крижаної оцтової кислоти і витримали 30 хв для повного зволоження барвника (це забезпечує його якісне розчинення без утворення грудочок та виключає необхідність послідуочого фільтрування розчину), далі додавали 98 мл дистильованої води та ретельно перемішати. Готовий 1% водний (підкислений) розчин швидкого зеленого має насичений бірюзовий колір.

Техніка виготовлення ВНПЗМ із використанням БЙ-ШЗ-ГЛ у цілому є такою ж

простою та швидкою, як і виготовлення ВТЗМ із йодними розчинами [12-14]. Коротко: на предметному скельці ретельно змішували невелику порцію збагаченого ЗК (~ 2 мг твердої/пухкої консистенції або ~ 50 мкл рідкої консистенції) із краплею (~ 50 мк) БЙ-ШЗ-ГЛ; утворену суспензію накривають покривним скельцем (24×24 мм або 22×32 мм); покривне скельце (посередині) злегка притискали до предметного скельця для утворення між ними однорідного тонкого шару суспензії, видалення бульбашок повітря і виходу невеликої кількості рідини за краї покривного скельця; виготовлений ВНПЗМ для «дозрівання» витримують близько 10-15 хв при кімнатній температурі або близько 5 хв у термостаті (при температурі 35-37 °С), за цей час відбувається: повне знезараження мазка (дезінфікуючий ефект уже досягається впродовж перших 30 с), якісне забарвлення присутніх у ньому мікроскопічних об'єктів, достатнє просвітлення темнопігментованого матеріалу, припинення руху суспензії під покривним скельцем та поступове підсихання видавленої за його краї рідини, остаточне висихання якої (звершується впродовж 1 год) герметизує препарат мазку.

Препарати мазків калу забарвлені 1% розчином Люголя, залізним гематоксилином за Гейденгайном, трихромом за Вітлі та модифікованим кислотним методом за Циль-Нільсеном були виготовлені з дотриманням традиційних процедур [9, 12-14].

Мікроскопію виготовлених препаратів мазків калу виконано на мікроскопі «MICROmed Evolution ES-4130». ВТЗМ переглядали в умовах низького (суха імерсія, об'єктив ×10) і високого збільшення (суха імерсія, об'єктив ×40), ФПЗМ – надвисокого збільшення (масляна імерсія, об'єктив ×100), а ВНПЗМ – за усіх зазначених умов мікроскопічного збільшення. Висновок щодо виявлення у мазках калу протозойних паразитів ґрунтувався на результатах візуалізації притаманних їм морфологічних ознак (форми, розміру, елементів структури) і тинкторіальних властивостей [9, 11-14].

Практичну ефективність нового методу фарбування вологих мазків калу для мікроскопічного виявлення/ідентифікації протозойних паразитів і групи традиційних методів фарбування аналогічного призначення оцінено за критеріями: діагностичної результативності – частоти мікроскопічного виявлення та надійності ідентифікації хвороботворних кишкових найпростіших; ресурсозатратності - вартості реагентів, потрібних для виготовлення витратної кількості робочих розчинів барвників; працезатратності - кількості обов'язково виконуваних процедур від початку виготовлення мазка до закінчення його мікроскопічного перегляду; часозатратності - сумарної тривалості виконання обов'язкових процедур від початку виготовлення мазка до закінчення його мікроскопічного перегляду. Показники діагностичної результативності є фактичними величинами мікроскопічного виявлення/ідентифікації кишкових протозойних паразитів у 160 ЗК від в/сл., визначеними при паралельному використанні нового і традиційних

методів фарбування їх мазків, а показники ресурсо-, праце- і часозатратності отримано методом аналітичного розрахунку мікроскопічного дослідження одного ЗК для виявлення кишкових протозойних паразитів при застосуванні порівнюваних методів фарбування.

Статистичну обробку даних проведено за допомогою програмного забезпечення IBM SPSS Statistics v.19.0. Відмінність середніх величин ($M \pm m$) вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Мікроскопічне дослідження калу (нативного, консервованого або збагаченого) з метою виявлення хвороботворних найпростіших вважається класичним методом лабораторної діагностики ПКХ у людей, який дотепер активно застосовується у світовій медичній практиці [1, 9-15, 23].

Традиційний алгоритм повноцінного мікроскопічного аналізу калу для виявлення найбільш клінічно значимих у країнах ЄС і в Україні збудників ПКХ (*Blastocystis* sp., *D. fragilis*, *G. lamblia* та *Cryptosporidium* spp.) є технологічно складним, ресурсо-, праце- і часозатратним [12-14, 19]. З метою корекції вказаних недоліків ряд закордонних науковців запропонували нові підходи до паразитологічної мікроскопії калу [18-22]. Базова методична ідея цих нових підходів полягає у виготовленні для мікроскопічного перегляду ВНПЗМ калу, де комбінованими барвниками слугують суміші: фенол-молочна кислота-гліцерин-бавовняна синька [18, 19], йод-йодид калію-гліцерин [20, 21] та метиленовий синій-гліцерин [22]. Основні переваги застосування ВНПЗМ полягають у: простій і швидкій техніці їх виготовлення (процедурно ідентичній до виготовлення ВТЗМ); тривалій їх придатності (не менше доби) для мікроскопічного перегляду із збереженням характерної морфології кишкових паразитів та набутого ними забарвлення (ВТЗМ висихають протягом 10 хв, що робить мазки такого типу нечитабельними для виявлення пошукових паразитів, а отже вимагає невідкладного перегляду ВТЗМ після виготовлення); більш контрастному забарвленні клітин кишкових найпростіших, що поліпшує чіткість візуалізації морфологічних ознак останніх (за критерієм якості забарвлення мікроскопічних об'єктів ВНПЗМ істотно переважають ВТЗМ і певною мірою є подібними до ФПЗМ). Проте, усі методи мікроскопічного дослідження калу, описані у роботах [18-22], мають суттєві тотожні недоліки: запропоновані комбіновані барвники продемонстрували недостатню здатність чітко і контрастно забарвлювати елементи структури клітин найбільш поширених хвороботворних кишкових протозойних паразитів - *Blastocystis* sp., *D. fragilis*, та *Cryptosporidium* spp., а також – непридатність ВНПЗМ, забарвлених цими барвниками, для мікроскопічного перегляду в умовах надвисокого збільшення, що у цілому не дозволяє виявляти та ідентифікувати зазначені найпростіші у ЗК.

Для усунення зазначених недоліків нами був розроблений метод фарбування вологих мазків калу для мікроскопічного виявлення кишкових протозойних паразитів, при відтворенні якого застосовується новий комбінований рідкий барвник БЙ-ШЗ-ГЛ, що являє собою суміш рівних об'ємів Бетайоду, 1 % водного (підкисленого) розчину швидкого зеленого та гліцерину (із кінцевою концентрацією кожного компоненту близько 33,3 об. %). Властивості нового барвника забезпечують придатність виготовлених на його основі ВНПЗМ для мікроскопічного перегляду в умовах високої роздільної здатності та чітке, контрастне і поліхромне забарвлення клітин *Blastocystis* sp., *D. fragilis*, *G. lamblia* та *Cryptosporidium* spp., що у цілому дозволяє виявляти/ідентифікувати ці паразити за притаманними їм ознаками (формою, розміром, елементами структури, тинкторіальними характеристиками), а також надійно їх відрізнити від артефактів (заявка на корисну модель № у 2023 03768, дата подання 07.08.2023 р. URL: <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1753442/#!>).

У цій статті вперше представлено результати вивчення практичної ефективності (діагностичної результативності, ресурсо-, праце- і часозатратності) нового методу фарбування вологих мазків калу барвником БЙ-ШЗ-ГЛ для мікроскопічного виявлення кишкових протозойних паразитів, яку оцінено у порівнянні з групою традиційних методів фарбування аналогічного призначення за результатами мікроскопічного тестування 160 ЗК від в/сл. Північного регіону України. Зауважимо, що в/сл. усіх країн світу як у мирний, так і у воєнний час відносяться до групи високого ризику виникнення кишкових інфекційних хвороб (у тому числі ПКХ), якщо виконання їх службових обов'язків пов'язано із перебуванням у польових умовах, особливо за обставин ведення наземного бою, коли дотримання звичних правил санітарії та гігієни для профілактики зараження збудниками кишкових інфекцій не є безпосереднім пріоритетом [24-30]. Результати

тематичних досліджень зарубіжних авторів показали, що частота кишкових протозойних інвазій у в/сл. різних країн світу варіює в широких межах від 2,5 % - у Німеччині [28] до більше 60 % - у Перу [29]. Спектр збудників ПКХ у в/сл. включає види хвороботворних паразитів, які притаманні як країні походження в/сл., так і населенню країн/регіонів де в/сл. виконують поставлені їм завдання [1, 25-30].

До теперішнього часу в Україні рівень інвазованості кишковими протозойними паразитами і спектр збудників ПКХ у в/сл. залишалися нез'ясованими. За результатами мікроскопічних досліджень 160 ЗФ від в/сл. Північного регіону України нами встановлено, що загальний рівень зараженості в/сл. кишковими найпростішими сягає 11,3 %, серед яких питома вага протозойних моноінвазій (з одним видом паразита) становить 72,2 %, а мікстних (з декількома видами паразитів) – 27,8 %. Спектр виявлених/ідентифікованих у в/сл. кишкових протозойних паразитів включає хвороботворні (*Blastocystis* sp., *D. fragilis*, *G. lamblia*) і коменсальні (*Chilomastix mesnili*, *Iodamoeba butschlii*) види. У 75 % в/сл., інвазованих хвороботворними найпростішими, діагностовано ПКХ із легким та середньої тяжкості клінічним перебігом. У обстежених в/сл. гельмінтних інвазій не виявлено.

Новий метод фарбування вологих мазків калу барвником БЙ-ШЗ-ГЛ показав універсальну придатність для мікроскопічного виявлення усього спектру кишкових протозойних паразитів, присутніх у ЗК. Використання БЙ-ШЗ-ГЛ при виготовленні ВНПЗМ забезпечує достатньо чітке, контрастне і поліхромне забарвлення клітини хвороботворних найпростіших - *Blastocystis* sp., *D. fragilis* та *G. lamblia*., що дозволяє мікроскопічно їх надійно виявляти/ідентифікувати у ЗК за формою, розміром, елементами структури і тинкторіальними характеристиками (рис.).

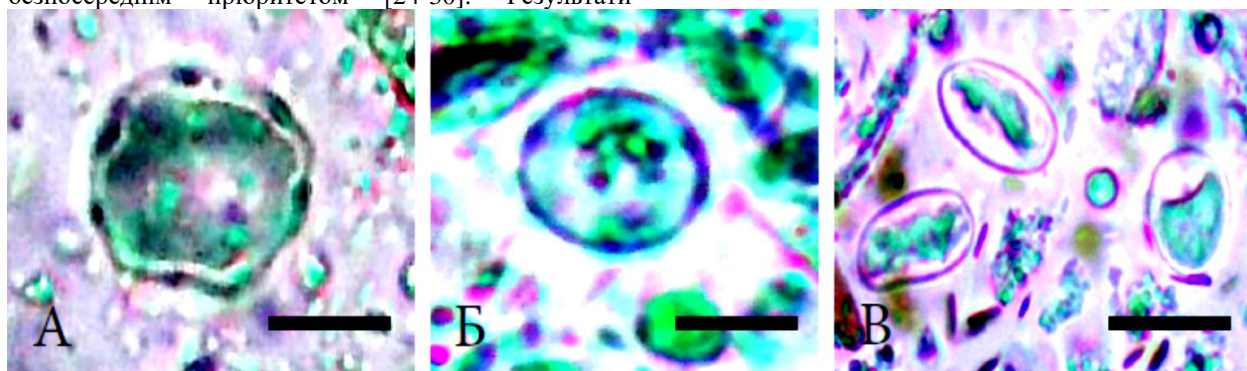


Рис. Мікрофотографії клітин хвороботворних кишкових протозойних паразитів у ВНПЗМ, забарвлених БЙ-ШЗ-ГЛ: трофозоїт (морфоформи центрального тіла) *Blastocystis* sp. (А); трофозоїт (двоядерний) *D. fragilis* (Б); цисти *G. lamblia* (В) (гліцеринова імерсія, сумарне збільшення мікроскопу $\times 1000$, реперна мітка 10 мкм)

Результати мікроскопічного виявлення хвороботворних кишкових найпростіших у 160 ЗК від в/сл. при використанні різних методів фарбування мазків наведено у табл.1. Аналіз представлених у ній даних дозволив обґрунтувати висновок про те, що за показниками результативності мікроскопічного виявлення хвороботворних кишкових найпростіших у ЗК новий метод фарбування вологих мазків у цілому не поступається трьом методам традиційного алгоритму їх фарбування.

Ще менш практично доцільним, в аспекті потенційної результативності мікроскопічного виявлення у досліджуваному матеріалі *Cryptosporidium* spp., виявився принцип традиційного алгоритму щодо обов'язковості виготовлення мазків, перманентно забарвлених модифікованим методом за Циль-Нільсеном. При використанні нового методу фарбування вологих мазків для мікроскопічного виявлення у 160 ЗК від в/сл кишкових протозойних

паразитів лише у 7 (4,4 %) випадках результат ідентифікації візуалізованих Protozoa-подібних об'єктів був сумнівним насамперед через їх малу кількість у ВНПЗМ і подібність до морфології *D. fragilis* (n=4) або *Cryptosporidium* spp. (n=3). У таких випадках слід вважати доцільним додаткове виготовлення ФПЗМ із тим типом забарвлення мазку, який призначений для остаточної мікроскопічної ідентифікації підозрюваного паразита (залізним гематоксиліном за Гейденгайном для - *D. fragilis*; модифікованим кислотним за Циль-Нільсеном для - *Cryptosporidium* spp.). Хоча у ФПЗМ із 7 зазначених ЗК не було ідентифіковано підозрювані кишкові найпростіші, методичний принцип вибіркового застосування перманентного фарбування мазків усуває сумніви стосовно достовірності результатів мікроскопічної детекції кишкових найпростіших у калі і не є суттєво обтяжливим.

Таблиця 1 - Результативність мікроскопічного виявлення хвороботворних кишкових протозойних паразитів у ЗК від в/сл. при використанні різних методів фарбування мазків

Хвороботворні кишкові протозойні паразити	Кількість позитивних результатів мікроскопічного виявлення хвороботворних кишкових протозойних паразитів у ЗК від в/сл. (n=160) за умов фарбування мазків барвниками				
	БЙ-ШЗ-ГЛ, абс. ч. (%)	1 % розчином Люголя, абс. ч. (%)	залізним гематоксиліном за Гейденгайном, або трихромом за Вітлі, абс. ч. (%)	модифікованим кислотним за Циль-Нільсеном, абс. ч. (%)	трьома барвниками за традиційним алгоритмом фарбування, абс. ч. (%)
<i>Blastocystis</i> sp.	8 (5,0)	6 (3,8)*	8 (5,0)	0	8 (5,0)
<i>D. fragilis</i>	2 (1,3)	0	2 (1,3)	0	2 (1,3)
<i>G. lamblia</i>	2 (1,3)	2 (1,3)	2 (1,3)	0	2 (1,3)
<i>Blastocystis</i> sp. + <i>D. fragilis</i>	4 (2,5)	3 (1,9)*	4 (2,5)	0	4 (2,5)
Усього	16 (10,0)	11 (6,9)*	16 (10,0)	0	16 (10,0)

Примітка. *- виявлено *Blastocystis*-подібні об'єкти, які потребували додаткової ідентифікації.

Навпроти, рутинне невибірконе виготовлення ФПЗМ калу пов'язано із рядом чинників, що негативно впливають на ефективність їх практичного використання у вітчизняних діагностичних лабораторіях, насамперед: висока вартість засобів (переважно імпортих барвників), потрібних для проведення процедур перманентного фарбування мазків; необхідність підбору консервантів калу та фіксаторів мазків із дотримання правила їх сумісності з конкретним методом перманентного фарбування; висока праце- і часозатратність відтворення останніх; неможливість виконання певних технологічних процедур для одночасного фарбування групи мазків; короткий термін придатності і необхідність регулярного контролю якості та заміни розчинів, які використовуються для проведення перманентного фарбування мазків; загальна технологічна складність (багатоетапність) виготовлення ФПЗМ і висока залежність результатів мікроскопічної візуалізації кишкових протозойних паразитів та інших об'єктів у мазках від можливих відхилень виконання процедур

фарбування; труднощі очистки стійко забарвлених предметних та покривних скелець для їх повторного використання [12, 14-17].

За даними тестування 160 ЗК від в/сл. виконано аналітичний розрахунок ресурсо-, праце- і часозатратності мікроскопічного дослідження одного ЗК для виявлення кишкових протозойних паразитів за умов використання нового методу фарбування вологих мазків і групи традиційних методів фарбування аналогічного призначення (табл. 2). Результати цього розрахунку показали, що новий метод напівпостійного фарбування вологих мазків калу барвником БЙ-ШЗ-ГЛ, у порівнянні із традиційним алгоритмом фарбуванням мазків калу 1% розчином Люголя, залізним гематоксиліном за Гейденгайном (або трихромом за Вітлі) та модифікованим кислотним методом за Циль-Нільсеном, характеризується меншою ресурсозатратністю у 7,4 рази, працезатратністю у 4,8 рази і часозатратністю у 7,6 рази ($p < 0,05$).

Таблиця 2 - Ресурсо-, праце- і часозатратність мікроскопічного дослідження одного зразку калу для виявлення протозойних паразитів при використанні різних методів фарбування мазків

Критерії оцінки	Методи фарбування мазків калу	
	новим барвником БЙ-ШЗ-ГЛ	трьома барвниками за традиційним алгоритмом *
Ресурсозатратність (вартість реагентів, потрібних для виготовлення витратної кількості робочих розчинів барвників у грн.)	2,5	18,5
Працевитратність (кількість обов'язково виконуваних процедур від початку виготовлення мазка до закінчення його мікроскопічного перегляду у абс. ч.)	6	29
Часозатратність (сумарна тривалість виконання обов'язкових процедур від початку виготовлення мазка до закінчення його мікроскопічного перегляду у хв)	25	190

Примітка. *- традиційний алгоритм фарбування мазків калу для мікроскопічного виявлення протозойних паразитів передбачає одночасне виготовлення трьох препаратів мазків: одного ВТЗМ, забарвленого 1 % розчином Люголя, і двох ФПЗМ, з яких один повинен бути забарвлений залізним гематоксином за Гейденгайном (або трихромом за Вітлі), а інший – модифікованим кислотним методом за Циль-Нільсеном.

Висновки

1. За результатами мікроскопічного дослідження 160 ЗК від в/сл. Північного регіону України встановлено, що загальний рівень зараженості в/сл. кишковими найпростішими сягає 11,3 %. Серед хвороботворних протозойних паразитів найчастіше виявляються *Blastocystis* sp. і *D. fragilis* (8,8 %), рідше - *G. lamblia* (1,3 %).
2. Новий метод фарбування вологих мазків калу барвником БЙ-ШЗ-ГЛ забезпечує достатньо чітке, контрастне і поліхромне забарвлення клітини *Blastocystis* sp., *D. fragilis* та *G. lamblia*, що дозволяє мікроскопічно їх надійно виявляти/ідентифікувати у досліджуваному калі за формою, розміром, елементами структури і тинкторіальними характеристиками.
3. Практична ефективність випробуваного нового методу фарбування мазків за критерієм діагностичної результативності виявлення/ідентифікації у калі хвороботворних протозойних паразитів не поступається традиційним методам фарбування аналогічного призначення та відносно останніх характеризується меншою ресурсозатратністю (у 7,4 рази), працевитратністю (у 4,8 рази) і часозатратністю (у 7,6 рази).

Practical efficiency the new method of staining wet stool smears for the microscopic detection of intestinal protozoan parasites

Kyrychenko I.I., Pokhil S.I., Tymchenko O.M., Krestetska S.L.

Introduction. Until now, intestinal protozoan infections (IPIs) cause a significant socio-economic burden and are a recognized problem for health care in all countries of the world. In the economically developed countries of Europe and Ukraine, IPIs are most often caused by *Blastocystis* sp. (formerly *Blastocystis hominis*, the causative agent of blastocystosis), *Dientamoeba fragilis* (the causative agent

of dientamoebiasis), *Giardia lamblia* (synonymous names - *G. intestinalis*, *G. duodenalis*, the causative agent of giardiasis) and *Cryptosporidium* spp. (most often species *C. parvum* and *C. hominis*, the causative agent of cryptosporidiosis), while protozoan intestinal invasions of other etiology are relatively rare. Stool microscopy methods, due to technical availability and relative cheapness, remain the most widely used in the laboratory diagnosis of IPIs in all countries of the world. The effectiveness of microscopic detection of disease-causing protozoan parasites in stool depends primarily on the smear staining method, which should provide reliable visualization of the characteristic features in stained parasite cells for their identification and differentiation from morphologically detailed "artifacts" that are often present in feces (such as: yeast-like fungi, leukocytes, macrophages, erythrocytes, fat droplets, spores, kernel shells and other plant detritus). The traditional algorithm of microscopic analysis of feces (native, preserved and concentrated by flotation or sedimentation) for detection of *Blastocystis* sp., *D. fragilis*, *G. lamblia* and *Cryptosporidium* spp. is technically burdensome, resource-, labor- and time-consuming. This algorithm provides for simultaneous (parallel) preparation of three smears from the same stool sample. Namely: one wet smear temporarily stained with iodine dye (1% solution Lugol's, D'Antoni's, Dobell's, etc.) and two smears fixed, permanently stained, one of which Wheatley's modification trichrome (or Heidenhain's iron-hematoxylin) method, and the other by the modified (cold) Ziehl-Neelsen method. The goal of this study was to determine the practical effectiveness (diagnostic performance, resource-, labor- and time-consuming) of the new method of semi-permanently staining (with dye betaioid-fast green-glycerol) wet fecal smears for the microscopic detection of intestinal protozoan parasites in comparison with a group of traditional methods staining which are used for the same purpose. **Materials and**

Methods. Microscopic examination of 160 preserved (10% formalin solution) stool samples (each of which was a triple-faeces-test) of military personnel with gastrointestinal symptoms was performed (hereafter referred to as MILPERS). Stool samples were taken during the period of inpatient medical care for MILPERS (February-July 2023) in the infectious diseases department of the Military Medical Clinical Center of the Northern Region of the Ministry of Defense of Ukraine. The algorithm for microscopic examination of stool samples included the following procedures: concentration of samples by formalin-ethyl acetate sedimentation; preparation of four types of smears from each concentrated pellet, namely - wet smear semi-permanently stained with the new betaiod-fast green-glycerol dye, wet smear temporarily stained with 1% solution Lugol's, two smears permanently stained, one of which Heidenhain's iron-hematoxylin (or Wheatley's trichrome), and the other by the modified Ziehl-Neelsen method; microscopic examination of stained smears under conditions of appropriate magnification and visual identification of detected intestinal protozoan parasites by their inherent morphological features and tinctorial properties. The practical efficiency of the new method of semi-permanently staining wet fecal smears for the microscopic detection/identification of protozoan parasites and a group of traditional staining methods of a similar purpose was evaluated according to the criteria diagnostic performance, resource-, labor- and time-consuming. Indicators of diagnostic performance are the actual values of microscopic detection/identification of intestinal protozoa in 160 stool samples of MILPERS, determined by the parallel use of the new method and traditional methods of staining their smears, while indicators of resource-, labor- and time-consuming were obtained by the method of analytical calculation of microscopic examination of one stool sample for intestinal protozoan parasites using comparable staining methods. **Results and Discussion.** According to the results of a microscopic study of 160 stool samples from MILPERS of the Northern Region of Ukraine, we found that the general level of infestation of these MILPERS with intestinal protozoa reaches 11.3%, among which the specific weight of protozoan monoinvasions (with one type of parasite) is 72.2%, and mix-invasions (with several types of parasites) is 27.8% . The spectrum of intestinal protozoan parasites detected at MILPERS includes pathogenic (*Blastocystis* sp., *D. fragilis*, *G. lamblia*) and commensally (*Chilomastix mesnili*, *Iodamoeba butschlii*) species. In 75% of MILPERS infected with pathogenic protozoan, IPIs were diagnosed with mild to moderate clinical severity. Worm infestations were not detected in the examined MILPERS. The new method of semi-permanently staining wet fecal smears with betaiod-fast green-glycerol dye showed universal suitability for the microscopic detection of the entire spectrum of intestinal protozoan parasites present in the examined stool samples. The use of betaiod-fast green-glycerol dye provides a sufficiently clear, contrasting and polychrome staining of the cells of pathogenic protozoa - *Blastocystis* sp., *D. fragilis* and *G. lamblia*, which allows them to be

reliably detected/identified by their shape, size, structural elements and tinctorial properties during the microscopy of fecal smears. For indicators of the microscopic performance detection of intestinal diseases in stool, the new method of semi-permanently staining wet fecal smears in general is not compromised by the three methods of the traditional algorithm of their preparation (with staining 1% solution Lugol's, Heidenhain's iron-hematoxylin or Wheatley's trichrome and modified Ziehl-Neelsen method). Fechner's correlation coefficient (Kf) between groups of positive results of microscopic detection/identification of intestinal protozoa in stool samples from MILPERS, obtained using the new and traditional smear staining methods was +1. At the same time, the new method of semi-permanent staining of wet fecal smears reliably outperforms the usual method of staining them with 1% Lugol's solution ($p < 0.05$) in terms of the ability to visually identify the dominant pathogens of IPIs - *Blastocystis* sp. and *D. fragilis*, whose specific share in the etiological spectrum of protozoan pathogens in MILPERS totaled 87.5%. Based on the results of the analytical calculation, the values of the indicators of the practical effectiveness of the microscopic examination of one stool sample using a new method of smear staining were determined, which are: resource consumption (the cost of reagents needed to produce a consumable amount of working dye solutions in UAH) - 2.5; labor intensity (absolute quantity of necessarily performed procedures from the beginning of smear production to the end of its microscopic view) - 6; time-consumption (total duration of mandatory procedures from the beginning of the preparation of the smear to the end of its microscopic view in mins) - 25. **Conclusion.** The new method of staining wet stool smears with betaiod-fast green-glycerol dye provides sufficiently clear, contrasting and polychrome staining of *Blastocystis* sp., *D. fragilis* and *G. lamblia*, which allows microscopically to reliably detect/identify them in the examined feces. The practical effectiveness of the new method of smear staining according to the criterion of diagnostic performance of detection/identification of pathogenic protozoan parasites in stool is not inferior to traditional staining methods of a similar purpose and, compared to the latter, is characterized by lower resource consumption (by 7.4 times), labor intensity (by 4.8 times) and time-consumption (in 7.6 times).

Keywords: new staining of fecal smears, microscopic detection, intestinal protozoa, military personnel

References

1. Fletcher S.M., Stark D., Harkness J., Ellis J. Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012; 25(3): 420-449. DOI: 10.1128/CMR.05038-11.
2. Ma J.Y., Li M.Y., Qi Z.Z. et al. Waterborne protozoan outbreaks: An update on the global, regional, and national prevalence from 2017 to 2020 and sources of contamination. *Sci. Total Environ.* 2022; 806 (Pt 2): 150562. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150562.
3. Torgerson P.R., Devleeschauwer B., Praet N. et al. World Health Organization Estimates of the Global and

- Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med.* 2015; 12(12): e1001920. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001920.
4. Kantzanou M., Karalexi M., Vriani G., Tsakris A. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections among Children in Europe over the Last Five Years. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2021; 6(3): 160. DOI: 10.3390/tropicalmed6030160
5. Calderaro A., Buttrini M., Montecchini S. et al. Prevalence of Intestinal Parasitoses in a Non-Endemic Setting during a 10-Year Period (2011-2020): A Focus on *Dientamoeba fragilis*. *Microorganisms*. 2022; 10(2): 426. DOI: 10.3390/microorganisms10020426.
6. Yakovenko D.V., Pokhil S.I., Tymchenko O.M. et al. The prevalence of cryptosporidiosis in children with diarrhea in Donetsk region, Ukraine. 2019 Actual Infectology. 2019; (4): 204-210. DOI: 10.22141/2312-413x.7.4.2019.178881.
7. Pokhil S.I., Tymchenko O.M., Chigirinskaya N.A. et al. Detection rate of *Blastocystis* sp. by microscopy and culture methods in symptomatic and asymptomatic persons in Kharkiv city, Ukraine. *Annals of Mechnikov Institute*. 2022; 2: 76-81. DOI: 10.5281/zenodo.6634866.
8. Despommier D.D., Gwadz R.W., Hotez P.J. (ed). *Parasitic diseases*, 5th ed. Springer-Verlag, New York, NY. 2005. 602 p.
URL:
http://web.natur.cuni.cz/parasitology/vyuka/Zaklady/Parasitic_Diseases_6th_Edition.pdf.
9. Garcia L.S., Arrowood M., Kokoskin E. et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31(1): e00025-17. DOI: 10.1128/CMR.00025-17.
10. Fitri L.E., Candradikusuma D., Setia Y.D. et al. Diagnostic Methods of Common Intestinal Protozoa: Current and Future Immunological and Molecular Methods. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2022; 7(10): 253. DOI: 10.3390/tropicalmed7100253.
11. McHardy I.H., Wu M., Shimizu-Cohen R. et al. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(3): 712-720. DOI: 10.1128/JCM.02877-13.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from Intestinal Tract; Approved Guideline - Second Edition*. CLSI document M28-A2. 2005; 25(16). URL: https://clsi.org/media/1460/m28a2_sample.pdf.
13. CDC: DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Centers for Disease Control and Prevention. Website accessed 30 June 2023. URL: <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/index.html>.
14. Library catalog of publications WHO: Basic laboratory methods in medical parasitology. World Health Organization, Geneva, 1994. 131 p. URL: who.int/iris/bitstream/10665/141252/1/5225032508.pdf.
15. Ögren J., Dienus O., Matussek A. Optimization of routine microscopic and molecular detection of parasitic protozoa in SAF-fixed faecal samples in Sweden. *Infect Dis (Lond)*. 2020; 52(2): 87-96. DOI: 10.1080/23744235.2019.1682188.
16. Amin O.M. Evaluation of a new system for the fixation, concentration, and staining of intestinal parasites in fecal specimens, with critical observations on the trichrome stain. *J Microbiol Methods*. 2000; 39(2):127-132. DOI: 10.1016/S0167-7012(99)00108-6.
17. Ferreira C.S. Staining of intestinal protozoa with Heidenhain's iron hematoxylin. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2003; 45(1): 43-44. DOI:10.1590/S0036-46652003000100009.
18. Parija S.C., Prabhakar P.K. Evaluation of lacto-phenol cotton blue for wet mount preparation of feces. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(4): 1019-1021. DOI: 10.1128/jcm.33.4.1019-1021.1995.
19. Parija S.C., Shivaprakash M.R., Jayakeerthi S.R. Evaluation of lacto-phenol cotton blue (LPCB) for detection of *Cryptosporidium*, *Cyclospora* and *Isospora* in the wet mount preparation of stool. *Acta Trop.* 2003; 85:349-354. DOI: 10.1016/S0001-706X(02)00265-6.
20. Afroz H., Alam R., Hossain M. et al. Evaluation of iodine-glycerol for wet mount preparation of feces. *Int. J. Biol. Med.* 2013; 4(4): 3615-3618. URL: https://www.researchgate.net/publication/262010682_Evaluation_of_iodine-glycerol_for_wet-mount_preparation_of_feces_for_detection_of_intestinal_parasites.
21. Vignesh R., Sekar R., Shankar E.M. et al. Wet mounting using iodine-glycerol provides a semi-permanent preparation for microscopic observation of faecal parasites. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57 (Pt 5): 679-680. DOI: 10.1099/jmm.0.47851-0.
22. Khanna V., Tilak K., Rasheed S., Mukhopadhyay C. Identification and Preservation of Intestinal Parasites Using Methylene Blue-Glycerol Mount: A New Approach to Stool Microscopy. *J. Parasitol. Res.* 2014; 2014:672018. DOI: 10.1155/2014/672018.
23. van Lieshout L., Roestenberg M. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21(6): 520-528. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.03.015.
24. Connor P., Gutierrez R.L. Update on military diarrhoea: current status and future plans. *J. R. Army Med. Corps*. 2013; 159 (3): 136-140. DOI: 10.1136/jramc-2013-000091.
25. Downs J.W., Putnam S.D., Rockabrand D.M. et al. A cross-sectional analysis of clinical presentations of and risk factors for enteric protozoan infections in an Active Duty Population during Operation Iraqi Freedom. *Trop. Dis. Travel. Med. Vaccines*. 2015; 1:2. DOI: 10.1186/s40794-015-0005-6.
26. Duda A., Kosik-Bogacka D., Lanocha-Arendarczyk N. et al. The Prevalence of *Blastocystis hominis* and Other Protozoan Parasites in Soldiers Returning from Peacekeeping Missions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 92 (4): 805-806. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0344.
27. Korzeniewski K. Elimination of Intestinal Parasites among Polish Soldiers Deployed to Afghanistan, 2010-2014. *Intern. Rev. Armed Forces Medic. Services*. 2015; 89 (2): 42-50.

URL:

<https://medycynatropikalna.pl/media/publications/113.pdf>.

28. Frickmann H., Schwarz N.G., Wiemer D.F. et al. Food and drinking water hygiene and intestinal protozoa in deployed German soldiers. *Europ. J. Microbiol. Immunol.* 2013. Vol. 3, No. 1. P 53-60. URL : DOI : 10.1556/EuJMI.3.2013.1.8.

29. Gallardo M.S., Cornejo M., Vasquez G. et al. High prevalence of intestinal parasites among soldiers in Peru: another population at risk. *Peru J. Parasitol.* 2011; 19(2): e60- e67. DOI:10.13140/RG.2.1.4836.0169.

30. Fasil K.D., Tesfaye D., Bethisrael M.A. et al. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections and Associated Risk Factors among Ethiopian Army Students, Health Sciences College, Bishoftu, Ethiopia, 2019. *Adv Biotech & Micro.* 2020; 15(2): 555908. DOI: 10.19080/AIBM.2020.15.555908.