

**ОЦІНКА ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ ФАРБУВАННЯ
ООЦИСТ КРИПТОСПОРИДІЙ**¹Комунальна медична установа

«Дитяче територіальне медичне об'єднання» (м. Краматорськ)

²Державна установа «Інститут мікробіології та імунології

ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

Inmiz_imi@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дана робота є фрагментом НДР «Удосконалення методів лабораторної діагностики криптоспоридіозу», № державної реєстрації 0117U002283.

Вступ. Криптоспоридіоз людини (МКХ-10 А07.2 – криптоспоридіоз) – убіквітарна протозойна хвороба, яку спричинюють найпростіші роду *Cryptosporidium* (тип *Apicomplexa*), що володіють здатністю до інвазії, розмноження і паразитування в ентероцитах ворсинок слизової оболонки шлунково-кишкового тракту (переважно тонкого кишечнику), породжуючи специфічний інфекційний процес із характерним клінічним проявом у формі «водянистої діареї» та широкий спектр варіацій тяжкості перебігу хвороби – від гострих самообмежуваних субклінічних і легких (у імунокомпетентних осіб) до хронічних, тяжких захворювань із летальним наслідком (у осіб з імунними порушеннями).

На теперішній час криптоспоридіоз визнано глобальною біологічною загрозою, що вражає широкі верстви населення, завдає значні економічні збитки тваринницькій сфері виробництва і потребує цілеспрямованих скоординованих зусиль ВООЗ і МЕБ, національних систем охорони здоров'я та ветеринарної медицини для боротьби із цим паразитозом [1-3].

Ефективність профілактики та лікування криптоспоридіозу базується на своєчасній та якісній його діагностиці, що дозволяє активно виявляти випадки хвороби, запобігати розвитку її тяжких форм і обмежувати поширення паразитів при локалізації та санації джерел інфекції. Діагноз криптоспоридіозу у людей встановлюється з урахуванням епідеміологічних, клінічних даних та результатів спеціальних лабораторних досліджень [4,5]. Останні відіграють провідну роль при верифікації діагнозу криптоспоридіозу з огляду на поліетіологічність цієї хвороби та подібність її клінічного прояву до інших діарейних інфекцій вірусної, бактерійної, грибової чи паразитарної етіології.

Серед широкого спектру існуючих методів лабораторної діагностики криптоспоридіозу (мікроскопічних, гістологічних, імунологічних, молекулярно-генетичних тощо) найбільш доступним і практично вживаними залишаються мікроскопічні методи, які ґрунтуються на виявленні у спеціально забарвлених мазках досліджуваного матеріалу (переважно – у випорожненнях, рідше – у мокротинні, бронхіальному слизу тощо) ооцист паразиту [6-9]. При цьому, виявлення ооцист *Cryptosporidium* spp. у випорожненнях від пацієнта із діареєю (тривалістю 72 го-

дини і більше) та/або боєм у животі, блюванням, анорексією є «золотим стандартом» безсумнівної етіологічної верифікації криптоспоридіозу [10-12].

Ефективність мікроскопічного виявлення та ідентифікації ооцист *Cryptosporidium* spp. у зразках випорожнень залежить від багатьох чинників, але у першу чергу – від методу їх фарбування, що повинен забезпечити надійні критерії для диференціації ооцист від морфологічно подібних «контамінатів», що містяться у фекаліях: клітин дріжджів і дріжджоподібних грибів, мікрокрапель жиру, неперетравленого пилку, оболонок ядер чи іншого детриту клітин рослин тощо.

Мета дослідження – оцінити диференційну ефективність шести найбільш вживаних у світовій медичній практиці методів фарбування ооцист криптоспоридій: негативного фарбування (negative staining method – NSM), модифікованого (холодного) методу Циль-Нільсена (modified Ziehl-Neelsen staining method – mZN), модифікованого (холодного) швидкого кислотного методу Кіньюна (modified Kinyoun's acid-fast staining method – mKAF), модифікованого методу Кестера фарбування сафраніном (modified Köster's safranin staining method – mKSA), аурамін-фенольного (auramine-phenol staining method – APM) та аурамін-родамінового (auramine-rhodamine staining method – ARM) методів.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження слугували суспензії ооцист криптоспоридій (n=6), які було отримано методом відцентрової седиментації у формалін-етилацетатній суміші [13] із зразків фекалій від дітей (n=3) і телят (n=3) з гострою кишковою інфекцією з діарейним синдромом, що були надані фахівцями КМУ «Дитяче територіальне медичне об'єднання» м. Краматорськ та ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН» м. Харків.

Мазки (n=36) виготовляли із 5,0 мкл гомогенізованих суспензій ооцист криптоспоридій. Вказаний об'єм суспензії, відібраний за допомогою дозатору піпеткового з регульованим об'ємом від 1 до 10 мкл (виробництва ЗАТ «Термо Електрон», РФ) та одноразових пластикових наконечників об'єму 10 мкл, наносили на поверхню стандартних предметних скелець і рівномірно розподіляли у формі округлої плями діаметром близько 10 мм.

Після повного самовільного висихання при кімнатній температурі фіксацію мазків здійснювали шляхом рясного нанесення на їх поверхню 96 % етанолу, тривалість експозиції якого становила 20-30 хвилин (досягалось повне висихання фіксатору).

При відтворенні кожного методу фарбування фіксованих мазків суспензій ооцист криптоспоридій дотримувались рецептур розчинів основних барвників, фонових барвників, деколайзерної суміші, рідини для промивання препаратів, а також поетапних процедур фарбування, які детально викладено у відповідних публікаціях іноземних авторів та в інструкціях виробників діагностичних наборів барвників: NSM [14], mZN [13], mKAF [15], mKSA [16], APM [13] і ARM [17].

Препарати мазків суспензій забарвлені методами NSM, mZN, mKAF і mKSA підлягали світловій мікроскопії, а забарвлені методами APM та ARM – люмінесцентної мікроскопії. Усі мікроскопічні дослідження проведено із використанням мікроскопу для клінічної лабораторної діагностики «МИКМЕД-2» Ю-33.22.926 в умовах масляної імерсії при сумарному збільшенні $\times 1000$ та $\times 1500$ (компенсаційні окуляри із рівнем збільшенням $\times 10$ і $\times 15$, об'єктиви ахромат, мікрофлюар із лінійним збільшенням $\times 100$ та цифровою апертурою $\times 1,30$). При здійсненні люмінесцентної мікроскопії застосовували: світлорозподільну пластину з межами інтервалів відбивання від 450 до 480 та пропускання від 520 до 700 нм; системи світлофільтрів для препаратів забарвлених APM – збуджуючий 450-480, відрізаючий 515, а для препаратів забарвлених ARM – 546 і KC11-2, відповідно [18].

Диференційну ефективність апробованих методів фарбування ооцист криптоспоридій (NSM, mZN, mKAF, mKSA, APM і ARM) оцінювали за наступними критеріями, які рекомендовано зарубіжними фахівцями для їх мікроскопічної ідентифікації [11,13]:

1) загальна кількість ооцист (ЗКО), виявлену при повному перегляді забарвлених препаратів мазків їх суспензій. Значення критерію ЗКО встановлювали світловою і люмінесцентною мікроскопією при сумарному збільшенні мікроскопу $\times 1000$ (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 100$, масляна імерсія);

2) форма ооцист криптоспоридій. У найбільш клінічно-значущих у патології людини видів *S. hominis* і *S. parvum* [19,20] форма ооцист правильно-округла (ПОФ) із товстою стінкою (ТСО), яка візуалізується при світловій або люмінесцентній мікроскопії. У деяких інших видів криптоспоридій ооцисти мають форму відмінну від ПОФ, наприклад, ооцисти *S. muris* – яйцеподібні. Даний критерій оцінювали в 100 ооцист у кожному забарвленому препараті при сумарному збільшенні мікроскопу $\times 1000$ (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 100$, масляна імерсія);

3) розмір ооцист, тобто – їх діаметр (ДМО). У видів *S. hominis* і *S. parvum* ДМО становить від 4 до 6 мкм (найчастіше – $4,5 \times 5,5$ мкм). Визначення цього критерію є діагностично-важливим завданням, так як багато інших видів *Cryptosporidium* мають відмінні розміри ооцист (наприклад, у *S. muris* – $5,5 \times 7,5$ мкм, а у *S. galli* – $8,5 \times 6,4$ мкм). Морфометричні дослідження із визначенням ДМО в 20 ооцист у кожному препараті, забарвленому для світлової мікроскопії (NSM, mZN, mKAF, mKSA), проведено із використанням змінної окулярної шкали при сумарному збільшенні мікроскопу $\times 1500$ (окуляр $\times 15$,

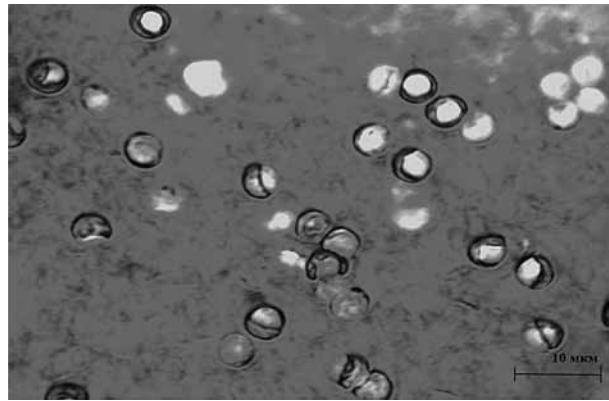


Рис. 1. Препарат мазку із негативно забарвленими NSM ооцистами криптоспоридій, що мають вигляд прозорих округлих плям («примар») на зеленому тлі фонового барвника малахітового зеленого (світлова мікроскопія, сумарне збільшення $\times 1000$, масляна імерсія).

об'єктив $\times 100$, масляна імерсія) як викладено в керівництві по його експлуатації [18];

4) наявність характерної внутрішньої структурованості ооцист (BCO) криптоспоридій, яка обумовлена присутністю чотирьох інтраооцистних спорозоїтів і є основною ідентифікаційною ознакою, що дозволяє диференціювати ооцисти від морфологічно подібних «контамінатів» фекалій. Наявність BCO оцінювали за допомогою світлової та люмінесцентної мікроскопії у 100 ооцист в кожному забарвленому препараті при сумарному збільшенні мікроскопу $\times 1000$ (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 100$, масляна імерсія).

Фотографування досліджуваних мікроскопічних об'єктів у забарвлених препаратах мазків суспензій ооцист криптоспоридій здійснено цифровим фотоапаратом «Olympus C7070 Wide Zoom» фірми «Olympus» (Японія).

Статистичну обробку експериментальних даних проведено у відповідності із правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики як викладено у посібнику [21].

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами виконаних експериментів встановлено, що використання усіх апробованих методів фарбування NSM, mZN, mKAF, mKSA, APM та ARM забезпечило мікроскопічне виявлення ооцист криптоспоридій ($r_{\phi} = 1$) в усіх досліджених препаратах мазків їх

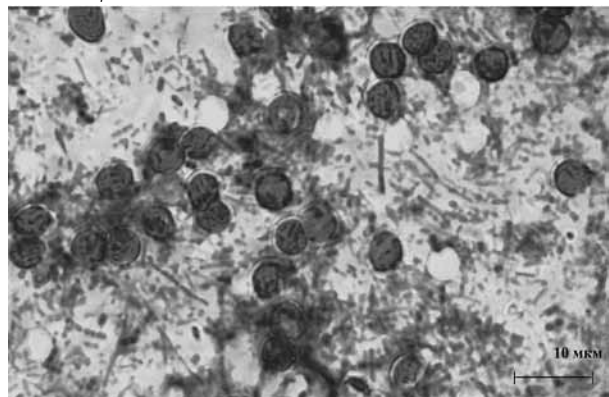


Рис. 2. Препарат мазку із забарвленими mZN у різні відтінки яскраво-червоного кольору ооцистами криптоспоридій на зеленому тлі фонового фарбника малахітового зеленого (світлова мікроскопія, сумарне збільшення $\times 1000$, масляна імерсія).

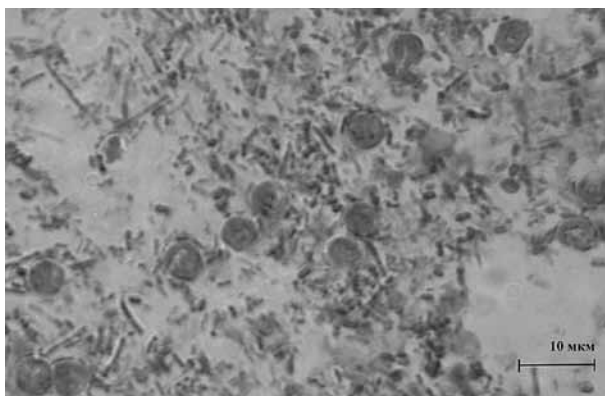


Рис. 3. Препарат мазку із забарвленими mKSA у рожевий і рожево-багряний колір ооцистами криптоспоридій на зеленому тлі фонового фарбника малахітового зеленого (світлова мікроскопія, сумарне збільшення $\times 1000$, масляна імерсія).

суспензій ($n=6$). При цьому, показник ЗКО не набув статистично значимої відмінності ($p>0,05$) за умови світлової мікроскопії препаратів мазків одних і тих самих суспензій ооцист забарвлених NSM, mZN, mKAF і mKSA. Варіювання показника ЗКО у різних препаратах цієї групи було у межах від 947 до 3952. Навпроти, при проведенні люмінесцентної мікроскопії забарвлених методами APM та ARM препаратів виявляли у 2,4-2,9 рази ($p<0,05$) більшу кількість ооцист криптоспоридій (показники ЗКО сягали від 2275 до 11458). У цілому, обидва методи фарбування препаратів флуорохромними барвниками для люмінесцентно-мікроскопічного виявлення ооцист паразитів за рівнем показника ЗКО є паритетними ($p>0,05$).

Усі апробовані методи фарбування (NSM, mZN, mKAF, mKSA, APM та ARM) забезпечили типове забарвлення ооцист криптоспоридій відповідно із особливостями конкретного методу та дозволили на цілком задовільному рівні (тобто, достатньому з точки зору мікроскопічної візуалізації) визначити такі діагностично-значимі критерії ооцист як ПОФ і наявність у них чітко окресленої ТСО, вимірювати ДМО, котрий за даними проведеної нами мікрометрії був у типових межах ($4,5 \times 5,5$ мкм) у переважній більшості ($> 90\%$) вимірених ооцист (рис. 1-4).

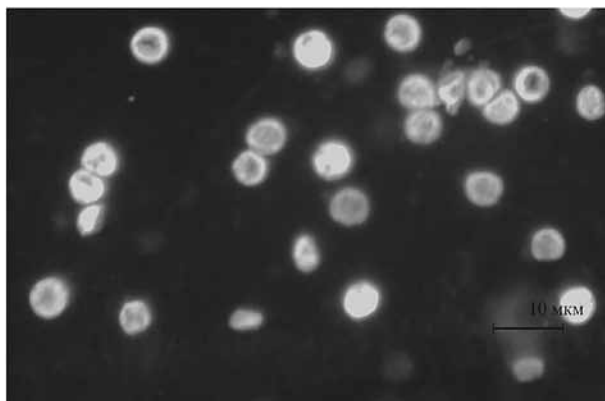


Рис. 4. Препарат мазку із забарвленими APM ооцистами криптоспоридій, які флуоресціюють у вигляді яскравих смарагдово-зелених дисків на темному тлі барвника для гасіння фонові флуоресценції перманганату калію (люмінесцентна мікроскопія, сумарне збільшення $\times 1000$, нефлуоресціююча масляна імерсія).

На противагу викладеному вище слід зазначити, що апробовані методи фарбування ооцист криптоспоридій характеризуються різною диференційною ефективністю щодо розрізнення ооцист і морфологічно схожих на них клітин дріжджів та дріжджоподібних грибів, неперетравленого пилку і оболонки ядер клітин рослин, мікрокрапель жиру чи інших «контамінатів», які часто бувають присутніми у зразках фекалій та у їх збагачених осадах.

Цілком зрозуміло, що використання NSM не дозволяє виявити у ооцист криптоспоридій ідентифікаційної ознаки ВСО (рис. 1). Крім того, застосування NSM супроводжувалось утворенням негативно забарвлених як ооцист, так й деяких інших морфологічно-подібних утворень. З метою усунення недоліків NSM іноземні науковці підвищують рівень контрастності ооцист шляхом використання фазово-контрастної мікроскопії, певної модифікації процедур підготовки препаратів мазків матеріалу для світлової мікроскопії (нанесення краплі імерсійного масла на мазок з послідуємим його накриванням покривним скельцем) або додатковим фарбуванням (попередньо уже забарвлених NSM) препаратів мазків mZN [22-24].

Технологічні принципи mZN і mKAF є подібними, тому обома цими методами ооцисти криптоспоридій забарвлювались в різні відтінки яскраво-червоного кольору на зеленому тлі фонового барвника малахітового зеленого, яким забарвлюється і супутня мікрофлора (рис. 2).

При використанні методів mZN і mKAF окрім ооцист криптоспоридій червоного кольору набувала певна частка клітин дріжджів і дріжджоподібних клітин, неперетравлених пилок рослин, залишкові мікроплями жиру. Їх диференціацію із ооцистами фахівці США пропонують проводити шляхом «постійного підтримання належного рівня технологічних знань у працівників лабораторій для забезпечення точної ідентифікації патогенних та непатогенних видів найпростіших, а також відрізнення артефактів», крім того рекомендується «розпочинати діагностичні дослідження з мікроскопічного перегляду завідомо позитивних препаратів мазків фекалій» (із наявними ооцистами криптоспоридій), якими повинні бути забезпечені лабораторії [11,13,25].

Метод mKSA вважається одним із кращих з точки зору досягнення диференційного забарвлення (у рожевий чи рожево-багряний колір) ооцист криптоспоридій з метою їх відрізнення від морфологічно-подібних «контамінатів», які, на думку ряду зарубіжних фахівців, не здатні забарвлюватись розчинами сафраніну або зберігати набуте забарвлення при обробці деколайзерами [10-12,16,26]. Насправді ж, результати наших експериментів із фарбуванням ооцист криптоспоридій mKSA висвітлює ряд суттєвих недоліків цього методу: нестабільність робочих розчинів барвника, які для використання досліджень необхідно готувати *ex tempore*; низьку валідність технологічних процедур фарбування (мимовільні незначні похибки «кислотної міцності» розчину деколайзера або тривалості його експозиції призводять до надмірного знебарвлення ооцист,

чи до недостатнього знебарвлення супутньої мікрофлори, що також набуває забарвлення внаслідок дії розчину сафраніну (рис. 3); препарати мазків ооцисти криптоспоридій забарвлені mKSA швидко вицвітають і без додаткової спеціальної обробки непридатні для тривалого мікроскопічного використання в якості завідомо позитивного контролю.

При люмінесцентно-мікроскопічному перегляді досліджених препаратів мазків, забарвлених APM і ARM, ооцисти криптоспоридій мали вигляд яскравих смарагдово-зелених флуоресціюючих дисків на темному тлі фону (рис. 4), а морфологічно-подібні до них контаміанти відрізнялись за мало вираженою тьмяно-зеленою флуоресценцією, що може слугувати додатковим (окрім ПОФ, ТСО та ДМО) диференційним критерієм. Виключенням із зазначеного положення є неперетравлені ядерні оболонки клітин рослин, котрим притаманний високий рівень яскраво-зеленої флуоресценції, проте їх досить легко диференціювати з ооцистами за значно більшим (у 2–5 разів) розміром та формою (як правило, еліпсоїдною чи прямокутною із заокругленими кутами).

Крім викладеного вище, за виключенням ARM, інші випробувані методи фарбування ооцист криптоспоридій (NSM, mZN, mKAF, mKSA та APM) не забезпечують бажану ефективність виявлення характерної BCO.

Попри візуалізацію у певної кількості ооцист утворень у формі півмісяців (останні найбільш виразно представлені на рис. 1), наявність яких ряд фахівців [11,13,27] пов'язують із присутністю спорозоїтів, методи фарбування NSM, mZN, mKAF, mKSA та APM у цілому не дозволили досягти достатньо чіткого результату виявлення ідентифікаційного критерію BCO. При проведенні світлової та люмінесцентної мікроскопії забарвлених цими методами препаратів мазків суспензій ооцист криптоспоридій, не візуалізувались інтраооцистні спорозоїти – грушоподібної форми утворення діаметром 2,6×2.8 мкм [27-29], а ознаками їх наявності слугувала своєрідна, різної інтенсивності забарвлення, смугастість і плямистість у певної кількості ооцист (рис. 2-4).

Для підвищення ефективності ідентифікації ооцист криптоспоридій з урахуванням критерію BCO зарубіжні науковці застосовують фенольні розчини комбінацій флуорохромних барвників (найчастіше аураміну з родаміном, ARM), що дозволяє одночасно забарвлювати як стінку ооцист, так й інтраооцистні спорозоїти [9,26,30]. При цьому, слід відмітити ряд недоліків, притаманних ARM: технологія його відтворення є багатостадійною та потребує значних затрат часу, що обумовлено тривалими процедурами виготовлення препарату мазку, його фіксації, дворазовим висушуванням і триразовим промиванням дистильованою або деіонізованою водою (після фарбування розчином біфлуорохромного барвника, знебарвлення деколайзером та після експозиції розчину барвника для гасіння фонові флуоресценції), а також необхідністю для виконання досліджень використовувати фенол. Останній, як добре відомо, має властивості протоплазматичної отрути і є небезпечним для будь-яких тканин ор-

ганізму (фенол за ступенем потенційної небезпеки впливу на організм відноситься до II класу – «речовини високонебезпечні»). При здійсненні фарбування препаратів мазків досліджуваного біоматеріалу фенол до організму працівників лабораторій може потрапляти шляхом вдихання його парів, а також – всмоктуванням крізь шкіру чи слизові оболонки очей, що викликає хімічні опіки (притаманна фенолу анестезуюча дія перешкоджає вчасному виявленню його негативного впливу). Використання фенолу в діагностичній практиці лабораторій вимагає обмеження тривалості робочого часу, застосування захисного одягу (зокрема, окулярів і гумових рукавиць), а також – додаткових засобів та виробничих умов для видалення парів фенолу із робочої зони та із уражених ділянок тіла [13].

Висновки. При випробуванні шести найбільш вживаних у світовій медичній практиці методів фарбування ооцист криптоспоридій (NSM, mZN, mKAF, mKSA, APM і ARM) для їх виявлення та ідентифікації за допомогою світлової та люмінесцентної мікроскопії встановлено, що люмінесцентна мікроскопія у забарвлених APM та ARM препаратах мазків суспензій ооцист дозволяє виявляти у 2,4-2,9 рази більшу ЗКО ($p < 0,05$), ніж світлова мікроскопія ідентичних препаратів мазків, забарвлених NSM, mZN, mKAF і mKSA. Усі випробувані методи забезпечують на задовільному рівні візуалізацію таких діагностичних ознак ооцист криптоспоридій як ПОФ, ТСО та ДМО. Проте, зазначені методи (за виключенням ARM) не забезпечують необхідного рівня візуалізації ідентифікаційного критерію BCO, що перешкоджає надійному диференціюванню ооцист паразитів від присутніх у фекаліях (або у збагачених їх осадах) морфологічно-подібних «контамінатів». Для ARM, який характеризується відносно вищим рівнем диференційної ефективності забарвлення ооцист криптоспоридій, теж притаманні істотні недоліки, котрі обумовлені багатостадійністю і тривалістю технології фарбування та необхідністю використання фенолу, що є високонебезпечною речовиною.

Перспективи подальших досліджень. Подальші наукові дослідження з метою розробки більш ефективного методу диференційного фарбування ооцист криптоспоридій для їх люмінесцентно-мікроскопічного виявлення спрямовані на вирішення таких завдань: виключення із рецептур розчинів флуорохромних барвників фенолу та його заміна більш безпечним інгредієнтом; поєднання декількох технологічних процедур підготовки препаратів мазків біоматеріалу для дослідження – одночасне виготовлення, фіксація і фарбування мазку завдяки використанню мультифункціональної суміші фіксатору з розчином біфлуорохромного барвника, а також одночасне знебарвлення мазків та усунення небажаної їх фонові флуоресценції шляхом використання комбінованої суміші розчинів деколайзера і барвника для гасіння фонові флуоресценції, що у цілому дозволить зменшити майже у 2 рази кількість обов'язкових етапів технології фарбування ооцист.

Література

- Putignani L, Menichella D. Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;2010:39. Available from: PMID: 20706669. DOI: 10.1155/2010/753512
- Peletz R, Mahin T, Elliott M, Montgomery M, Clasen T. Preventing cryptosporidiosis: the need for safe drinking water. *Bull World Health Organ*. 2013 Apr 1;91(4):238-8A. PMID: 23599543. DOI: 10.2471/BLT.13.119990
- Shrivastava AK, Kumar S, Smith WA, Sahu PS. Revisiting the global problem of cryptosporidiosis and recommendations. *Trop Parasitol*. 2017 Jan-Jun;7(1):8-17. DOI: 10.4103/2229-5070.202290
- Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* spp.) 2012 Case Definition. CDC. National Notifiable Diseases Surveillance System [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/nndss/conditions/cryptosporidiosis/case-definition/2012/>
- Nakaz MOZ Ukrainy vid 28.12.2015 r. № 905 «Pro zatverdzhennya kryteriyiv, za yakymy vyznachayut'sya vypadky infektsiynykh ta parazytarnykh zakhvoryuvan', yaki pidlyahayut' reyestratsiyi». Dostupno: http://old.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20151228_0905.html [in Ukrainian].
- Chalmers RM. *Cryptosporidium*: from laboratory diagnosis to surveillance and outbreaks. *Parasite*. 2008;15(3):372-8. PMID: 18814709. DOI: 10.1051/parasite/2008153372 Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2008153372>
- Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol*. 2013 May;29(5):237-51. DOI: 10.1016/j.pt.2013.03.001
- Ghazy AA, Abdel-Shafy S, Shaapan RM. Cryptosporidiosis in animals and man: 2. Diagnosis. *Asian J Epidemiol*. 2015;8(4):84-103. DOI: 10.3923/aje.2015.84.103
- Vohra P, Sharma M, Chaudary U. A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of *Cryptosporidium parvum* in stool samples. *J Pharm*. 2012;2(5):15-26.
- Basic laboratory methods in medical parasitology. Library catalog of publications WHO. World Health Organization. Geneva, 1994. 131 p. Available from: www.who.int/iris/bitstream/10665/141252/1/5225032508.pdf
- Garcia LS, Campbell JL, Fritsche TR, Hummert B, Johnston SP, Rachford FW, et al. Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from Intestinal Tract; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document M28-A2. 2005;25(16):111.
- Cryptosporidiosis. Laboratory Diagnosis [Internet]. CDC. DPDx (updated 2016 March 1) Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/dx.html>
- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Cryptosporidiosis. Chapter 2.9.4. World Organisation for Animal Health (OIE). 2008;2:1192-215. Available from: www.oie.int/doc/ged/D7709.pdf
- Elliot A, Morgan UM, Thompson RC. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 1999;45(3):139-42. Available from: <https://doi.org/10.2323/jgam.45.139>
- Modified Kinyoun's Acid-Fast Stain (cold) Protocol [Internet]. Medical Chemical Corporation. 2017. 6 p. Available from: www.med-chem.com/pages/.../modified_kinyoun_cold.pdf
- Kageruruka P, J. Brandt RA, Taelman H, Jonas C. Modified Köster staining method for the diagnosis of Cryptosporidiosis. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1984;64(2):171-5. PMID: 6207782
- Modified auramine-rhodamine stain kit [Internet]. Dalynn Biologicals Inc. 2014. 2 p. Available from: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/SA93.pdf
- ОАО «ЛОМО». Микроскоп для клинической лабораторной диагностики МИКМЭД-2. Руководство по эксплуатации YU-33.22.926-03 RE. ОАО «ЛОМО». 2006. 45 с [in Russian].
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*. 2010;124(1):80-9. PMID: 19358845. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.03.018
- Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitol*. 2014;141:1667-85.
- Lakin GF. Биометрия. Москва: ВС. 1990. 352 с. [in Russian].
- Potters I, Esbroeck MV. Negative staining technique of heine for the detection of *Cryptosporidium* spp.: a fast and simple screening technique. *J Parasitol*. 2010;4:1-4. DOI: 10.2174/1874421401004010001
- Rekha KMH, Puttalakshamma GC, D'Souza EP. Comparison of different diagnostic techniques for the detection of cryptosporidiosis in bovines. *Vet World*. 2016;9(2):211-5. PMID: 27051211. DOI: 10.14202/vetworld.2016.211-215
- Ignatius R, Klemm T, Zander S, Gahutu JB, Kimmig P, Mockenhaupt FP, et al. Highly specific detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in human stool samples by undemanding and inexpensive phase contrast microscopy. *Parasitol Res*. 2016;115(3):1229-34. PMID: 26646397. DOI: 10.1007/s00436-015-4859-3
- McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2014;52(3):712-20. PMID: 24197877. DOI: 10.1128/JCM.02877-13
- Tortora GT, Malowitz R, Mendelsohn B, Spitzer ED. Rhodamine-auramine O versus Kinyoun-carbol-fuchsin acid-fast stains for detection of *Cryptosporidium* oocysts. *Clin Lab Sci*. 1992;5(6):568-9. PMID: 10150976
- Petry F. Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microsc Microanal*. 2004;10(5):586-601. PMID: 15525433. DOI: 10.1017/S1431927604040929
- Lager DJ, Landas SK. Correlative Light and Scanning Electron Microscopy of Intestinal Giardiasis, Cryptosporidiosis, and Spirochetosis. *Ultrastruct Pathol*. 1991;15(6):585-91. PMID: 1799024
- Thompson RC, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS. Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. *Adv Parasitol*. 2005;59:77-158. PMID: 16182865. DOI: 10.1016/S0065-308X(05)59002-X
- Kang G, Mathan MM. A comparison of five staining methods for detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from the field. *Indian J Med Res*. 1996;103:264-6. PMID: 8707362

ОЦІНКА ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ ФАРБУВАННЯ ООЦИСТ КРИПТОСПОРИДІЙ

Яковенко Д. В., Похил С. І., Тимченко О. М., Чигиринська Н. А., Костиця І. А.

Резюме. За результатами випробування шести найбільш вживаних у світовій медичній практиці методів фарбування ооцист криптоспоридій встановлено, що аураміно-родаміновий метод (ARM) характеризується відносно вищою диференційною ефективністю. При проведенні люмінесцентної мікроскопії забарвлених ARM мазків суспензій ооцист на задовільному рівні візуалізуються усі диференційні ознаки ооцист, у тому числі притаманна їм внутрішня структурованість.

Ключові слова: ооцисти криптоспоридій, методи фарбування, диференційна ефективність.

ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ОКРАСКИ ООЦИСТ КРИПТОСПОРИДИЙ

Яковенко Д. В., Похил С. И., Тимченко Е. Н., Чигиринская Н. А., Костыря И. А.

Резюме. На основании результатов испытания шести наиболее употребляемых в мировой медицинской практике методов окрашивания ооцист криптоспоридий установлено, что аурамин-родаминовый метод (ARM) характеризуется относительно более высокой дифференциальной эффективностью. При проведении люминисцентной микроскопии окрашенных ARM мазков суспензий ооцист на удовлетворительном уровне визуализируются все дифференциальные признаки ооцист, в том числе, присущая им внутренняя структурированность.

Ключевые слова: ооцисты криптоспоридий, методы окраски, дифференциальная эффективность.

EVALUATION OF DIFFERENTIAL EFFICIENCY OF STAINING METHODS FOR CRYPTOSPORIDIUM OOCYSTS

Iakovenko D. V., Pokhil S. I., Tymchenko O. M., Chigirinskaya N. A., Kostyria I. A.

Abstract. Cryptosporidiosis (ICD-10-CM A07.2) is an ubiquitous parasitic disease («watery diarrhea») that is caused by the protozoans of the genus *Cryptosporidium* (type *Apicomplexa*) that are capable of invasion, reproduction and parasitism inside the enterocytes of the gut tract mucosal filli. Cryptosporidiosis as a diagnosis is established based on the epidemiological and clinical data, as well as results of laboratory tests. Among the large quantity methods of cryptosporidiosis laboratory diagnostics the light and luminescent microscopy remain the most popular in the regular laboratory practice and are based on the determination of the parasitic oocysts in the smears of the biomaterials (mainly fecal).

The aim of the study is to evaluate the differential efficiency of six the staining methods for *Cryptosporidium* oocysts that are most commonly used in the medical practice: negative stain – NSM; modified (cold) Ziehl-Neelsen stain – mZN; modified (cold) Kinyoun's acid-fast stain – mKAF; modified Köster's stain – mKSA; auramine-phenol stain – APM; auramine-rhodamine stain – ARM.

Object and methods. The object of this study were the suspensions of *C. parvum* oocysts (n = 6) that were obtained from samples fecal of children and calves by the centrifugal sedimentation in the formalin-ethyl-acetate mix. Smears (n=36) were prepared from 5.0 µl of homogenized suspensions of oocysts. They were dried, fixed and stained using NSM, mZN, mKAF, mKSA, APM, ARM as described in previously published papers. Slides of the smears stained with NSM, mZN, mKAF, mKSA were analyzed by light microscopy and those that were stained with APM, ARM by luminescent microscopy (total increase of objects ×1000-1500, oil-immersion). Microscopically examination to evaluate the differential efficiency of staining methods for *Cryptosporidium* oocysts included the definition: the total number of oocysts (TNO); a regularly rounded form of oocysts (RFO) and their thick wall (TWO); mean dimensions of the oocysts (i.e. their diameter – DIO); the internal structure inherent in oocysts (ISO).

Results and discussion. Obtained results show that luminescent microscopy can detect 2-5 times more *Cryptosporidium* oocysts (TNO) in the same smears of their suspensions than light microscopy. All proven staining methods (NSM, mZN, mKAF, mKSA, APM, ARM) allow microscopy to visualize such differential signs of *Cryptosporidium* oocysts as RFO, TWO, DIO. *C. parvum* oocysts had mean diameter 4,9-5,2 µm and the certain look, depending on the method used to stain them: NSM – look like as transparent round spots («ghosts») on a dark green background; mZN, mKAF – red discs on a pale green background; mKSA – pink and pink-purple on a pale green background; APM, ARM – rings or discs which characteristically bright green fluorescence against a dark background. Only the ARM has allowed the identification criterion ISO to be found at a satisfactory level (oocysts were light green, and internal sporozoite – yellow-green color).

Conclusions. Among the six tried out of staining methods for *Cryptosporidium* oocysts, which are most often used in medical practice, relatively higher differential efficiency is characterized by ARM. However, this method has such disadvantages as a multi-stage and long-term staining protocol and the need to use phenol, which is a highly dangerous substance. Further research should be aimed at creating easier-to-reproduce, safe and effective staining method for *Cryptosporidium* oocysts.

Key words: *Cryptosporidium* oocysts, staining methods, differential efficiency.

Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.

Стаття надійшла 29.08.2018 року