

Podstawowe metody bezpośrednich badań diagnostycznych stosowane w laboratoryjnej parazytologii medycznej

Basic direct testing methods used in laboratory medical parasitology

Beata Szostakowska¹ (ORCID: 0000-0003-2738-3753), **Hanna Żarnowska-Prymek**² (ORCID: 0009-0004-7937-7253), **Roland Wesołowski**³ (ORCID: 0000-0003-2673-8313)

¹Zakład Parazytologii Tropikalnej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Gdański Uniwersytet Medyczny, Polska

²Pracownia Parazytologii, Wojewódzki Szpital Zakaźny w Warszawie, Polska

³Katedra Biologii i Biochemii Medycznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska

Streszczenie

Podstawowym warunkiem dobrze przeprowadzonej mikroskopowej diagnostyki parazytologicznej jest prawidłowe przygotowanie preparatów przeznaczonych do oceny. Artykuł zawiera szczegółowe, przystępnie podane instrukcje dotyczące metod badań, w tym prawidłowego wykonania rozmazów krwi, szpiku kostnego oraz kału przeznaczonych do bezpośrednich badań parazytologicznych. Przedstawione są również, sprawdzone przez nas, najważniejsze metody barwienia tych materiałów oraz instrukcje wykonania podstawowych utrwalaczy stosowanych w badaniach parazytologicznych. Zaprezentowano także najczęściej stosowane metody hodowli *in vitro* larw nicieni jelitowych i pełzaków amfizoicznych. Ponadto opisano, w jaki sposób należy oglądać wykonane preparaty, a w uwagach i komentarzach znajdują się praktyczne porady i wyjaśnienia niektórych procedur. Zawarte w pracy informacje powinny być pomocne, zwłaszcza dla mniej doświadczonych diagnostów, w codziennej praktyce w parazytologicznych laboratoriach medycznych.

Słowa kluczowe: barwienie, diagnostyka mikroskopowa, hodowla, kał, krew, pasożyty

Abstract

The basic condition for well-conducted microscopic parasitological diagnostics is the correct preparation of preparations intended for evaluation. The article contains detailed, accessible instructions on examination methods, including the correct preparation of smears: blood, bone marrow, and stool intended for direct parasitological examinations. It also presents the most important methods of staining these materials, tested by us, and instructions for the preparation of basic fixatives used in parasitological

Received: 19.02.2025

Accepted: 24.02.2025

Published: 17.03.2025

DOI: 10.5604/01.3001.0055.0429

Corresponding author:

dr hab. Beata Szostakowska, Zakład Parazytologii Tropikalnej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Gdański Uniwersytet Medyczny, 81-519, Gdynia, ul. Powstania Styczniowego 9b, e-mail: beata.szostakowska@gumed.edu.pl

Cite the article as:

Szostakowska B, Żarnowska-Prymek H, Wesołowski R. Basic direct testing methods used in laboratory medical parasitology. *Diagn Lab.* 2025; 61(1): 43–63



Open access

The content of the journal is available in Open Access formula which means free access to scientific data for researchers and readers.



Copyright

This material is available under the Creative Commons – Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). The full terms of this license are available on: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Licence

Some right reserved: Polish Society of Laboratory Diagnostics. Published by Index Copernicus Sp. z o.o.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

examinations. It also describes the most commonly used methods of *in vitro* culture of intestinal nematode larvae and amphizoic amoebas. In addition, it describes how to view the prepared preparations, and the notes and comments contain practical advice and explanations of some procedures. The information contained in the work should be helpful, especially for less experienced diagnosticians, in their daily practice in parasitological medical laboratories.

Keywords: blood, cultivation, microscopic diagnostics, parasites, staining, stool

WSTĘP

W niniejszym opracowaniu przedstawione zostały szczegółowe, praktyczne instrukcje dotyczące metod parazytologicznego badania krwi i kału, w tym prawidłowego wykonania preparatów przeznaczonych do rutynowej diagnostyki mikroskopowej oraz najczęściej stosowane metody barwienia preparatów. Podano także podstawowe (najprostsze) metody hodowli pasożytów, które zwiększają szansę wykrycia i identyfikacji nicieni jelitowych z rodzajów *Strongyloides*, *Ancylostoma*, *Necator* i *Trichostrongylus* oraz pełzaków amfizoicznych z rodzaju *Acanthamoeba*.

W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć wiele przepisów na wykonanie barwienia, zwłaszcza rozmazów kału, które mogą nieznacznie różnić się między sobą, przede wszystkim czasem przetrzymywania preparatów w kolejnych odczynnikach szeregu barwiącego. Rozbieżności te mogą być spowodowane używaniem odczynników różnych producentów lub chociażby preferencji co do intensywności zabarwienia preparatów uzyskanych poszczególnymi metodami [1-7]. W niniejszym opracowaniu zawarto przepisy sprawdzone i stosowane w naszych laboratoriach. Diagnozy mogą je dostosować do możliwości swojego laboratorium lub własnych preferencji.

METODY PARAZYTOLOGICZNEGO BADANIA KRWI I SZPIKU KOSTNEGO

Mikroskopowa ocena barwionych rozmazów krwi (niekiedy też szpiku kostnego) jest często metodą z wyboru („złotym standardem”) w diagnostyce chorób pasożytniczych przenoszonych przez krwiopijne stonogi. Metoda ta umożliwia nie tylko wykrycie pasożytów, lecz także identyfikację poszczególnych form rozwojowych i określenie intensywności inwazji, co ma

kluczowe znaczenie dla podjęcia właściwych działań terapeutycznych. Warunkiem dobrze przeprowadzonego badania mikroskopowego rozmazów krwi jest ich właściwe wykonanie i zabarwienie. Poniżej podano dokładne instrukcje wykonania, barwienia i oceny preparatów mikroskopowych przeznaczonych do badań w kierunku poszczególnych parazytoz.

BADANIE MIKROSKOPOWE KRWI W KIERUNKU MALARII I BABESZJOZY

Do badania mikroskopowego w kierunku malarii i babeszjozy najlepiej pobrać krew włośniczkową, np. z opuszki palca. Preparaty można wykonać bezpośrednio przy łóżku pacjenta lub pobrać krew do probówki z EDTA. W tym drugim przypadku preparaty powinny być wykonane do godziny od pobrania krwi. Do pełnego badania potrzebne są dwa rodzaje preparatów, tzw. gruba kropla oraz cienki rozmaz. Zaleca się wykonać po 2 – 3 preparaty każdego rodzaju. Szczegółowy opis, jak poprawnie przygotować rozmazy przeznaczone do badania, podany jest w tabeli I. Właściwie wykonane rozmazy należy odpowiednio zabarwić. W tabeli II przedstawione zostały najczęściej stosowane w parazytologii metody barwienia preparatów krwi.

Ocena preparatów

Zabarwione preparaty ogląda się pod powiększeniem obiektywu 100x. Parazytemię w malarii i babeszjozie określa się jako procent zarażonych erytrocytów (bez względu na liczbę zawartych w nich pasożytów) do co najmniej 500 wszystkich krwinek policzonych. W diagnozowaniu malarii nie należy liczyć erytrocytów zawierających gametocyty, ponieważ są to formy inwazyjne dla komara, nie biorą dalej udziału w cyklu krwinkowym, a mogą być obecne w krwi ludzkiej nawet do dwóch tygodni po wyleczeniu pacjenta.

BADANIE MIKROSKOPOWE KRWI W KIERUNKU PASOŻYTÓW POZAKRWINKOWYCH (*TRYPANOSOM, FILARII*)

W celu wykrycia trypanosom, z krwi żyłnej pobranej na EDTA (4 ml), jeszcze przed oddzieleniem się krwinek od osocza, należy wykonać rozmazy i grube krople, podobnie jak w diagnostyce malarii. Po odwirowaniu krwi (przy $500 \times g$ przez 10 min) lub samoistnym opadnięciu krwinek należy wykonać takie same preparaty z próbki pobranej z warstwy krwinek przy granicy z osoczem. Najwięcej trypanosom znajduje się nad warstwą erytrocytów w cienkiej warstewce leukocytów. W obu przypadkach zaleca się dodatkowo wykonać po 2 rozmazy nieco grubsze, które mogą być pomocne w przypadku bardzo niskiej parazytemii. Z próbki pobranej z dolnej części osocza (na granicy z krwinkami) można wykonać preparat mokry, w którym będą widoczne żywo poruszające się pasożyty. Rozmazy i grube krople należy barwić podobnie jak w przypadku malarii, stosując metodę Giemsy lub Pappenheima. Preparaty barwione ogląda się pod powiększeniem obiektywu 100x, preparat mokry pod powiększeniem obiektywu 40x lub 60x. Przy większej parazytemii można również wykryć omawiane pierwotniaki w krwi włośniczkowej.

W przypadku filarioz bada się krew żylną pobraną na EDTA, a wykonane rozmazy powinny być grubsze niż do badań w kierunku malarii i babeszjozy, tzn. z większej ilości krwi (10 μ l). Preparaty utrwala się alkoholem metylowym absolutnym i barwi odczynnikami Giemsy. Po wykryciu larw (mikrofilarii) w preparatach barwionych odczynnikami Giemsy powinno się zastosować także bardziej złożone barwienie hematoksyliną, pomocne w odróżnianiu mikrofilarii osłonkowych od bezosłonkowych, ponieważ barwnik Giemsy nie zawsze wybarwia u tych pierwszych osłonkę.

Koncentracja mikrofilarii wg Knotta

Metoda ta jest szczególnie przydatna w diagnostyce filarioz u osób po krótkotrwałych pobytach w rejonach endemicznego występowania pasożytów, gdyż najczęściej parazytemia u tych osób jest niewielka i w preparatach grubej kropli można nie wykryć mikrofilarii. 1 lub 2 ml krwi żyłnej pobranej na EDTA należy zmieszać odpowiednio z 9 lub 18 ml 2% roztworu formaliny w wodzie destylo-

wanej. Można też zmieszać krew w wyżej podanej proporcji z wodą destylowaną. Zawiesinę po całkowitej hemolizie należy odwirować ($500 \times g$ przez 10 min) lub pozostawić do sedymentacji na około 6 godzin. Z osadu wykonuje się mokry preparat (nie przykrywać szkiełkiem nakrywkowym) i przegląda pod powiększeniem obiektywu 10 – 20x. W przypadku wyniku dodatniego preparat należy wysuszyć, utrwalić metanolem i zabarwić odczynnikami Giemsy, po czym oglądać pod powiększeniem obiektywu 10 – 20x, a dla zaobserwowania szczegółów pod powiększeniem obiektywu 100x. Wstępne badanie krwi, obejmujące preparaty mokre po hemolizie wodą, pozwala na zaobserwowanie żywych, poruszających się mikrofilarii, co ułatwia ich wykrycie. W preparatach mokrych, po hemolizie roztworem formaliny, martwe larwy są wyprostowane. Przed odwirowaniem lub sedymentacją materiał można podzielić na dwie części w celu zmniejszenia objętości osadu leukocytów. Próbkę hemolizowaną roztworem formaliny, w przeciwieństwie do próbki hemolizowanej wodą, nie wymaga oceniania od razu.

Rozcieńczenie odczynnika Giemsy w barwieniu pasożytów pozakrwinkowych jest takie samo jak w przypadku *Plasmodium* spp. Czas barwienia należy dostosować do konkretnego odczynnika stosowanego w laboratorium, przy czym najczęściej wystarczy barwić 30 minut.

BADANIE MIKROSKOPOWE SZPIKU KOSTNEGO W KIERUNKU LEISZMANIOZY¹⁾

Wykonane rozmazy szpiku kostnego, pobieranego do badań w kierunku obecności form amastigota *Leishmania* spp. w makrofagach, powinny być grubsze niż rozmazy krwi w przypadku diagnostyki malarii. Przebieg barwienia (metoda Giemsy) jest taki sam jak w badaniach krwi w kierunku pasożytów pozakrwinkowych. Zabarwione preparaty ogląda się pod powiększeniem obiektywu 100x.

¹⁾ W taki sam sposób barwi się badany w kierunku leishmaniozy wysięk pobrany ze zmiany skórnej (preparat odciskowy).

METODY PARAZYTOLOGICZNEGO BADANIA KAŁU

W rozpoznawaniu większości parazytoz jelitowych z wyboru stosowana jest diagnostyka koproskopowa,

obejmująca badanie rozmazów kału bezpośrednich i po zagęszczeniu. Bezpośredni rozmaz kału (w 0,9% NaCl) jest najprostszy w wykonaniu, pozwala wykryć obecność pasożytów i ich form dyspersyjnych. Metoda ta umożliwia wykrycie również trofozoitów pierwotniaków. Jej skuteczność jest jednak ograniczona w przypadku niskiej intensywności inwazji. W związku z tym równolegle z bezpośrednim rozmazem kału wykonuje się badania z zastosowaniem technik zagęszczających pasożyty: flotacji i sedymentacji. W technikach flotacyjnych formy pasożytnicze (lekkie jaja, cysty i oocysty) wypływają na powierzchnię roztworu o dużym ciężarze właściwym, a podczas sedymentacji w wodzie jaja, larwy, cysty i oocysty opadają na dno naczynia. Kolejną metodą, którą stosuje się do wykrywania jaj i larw helmintów oraz oocyst *Sarcocystis*, jest rozmaz gruby według Kato i Miura. Każda z metod ma pewne ograniczenia, dlatego badanie kału wykonuje się równolegle kilkoma metodami, co znacząco zwiększa czułość prowadzonej diagnostyki [1, 2, 4, 5]. Metody bezpośrednie i podstawowe metody zagęszczające stosowane w badaniach mikroskopowych kału przedstawione są w tabeli III. Istnieją również komercyjne zestawy przeznaczone do zagęszczania pasożytów. Są one modyfikacją metody formalinowo-octanowo-etylowej. Kał do badań parazytologicznych przy użyciu takich zestawów należy przygotowywać zgodnie z instrukcją producenta. Zestawy te wyposażone są w filtr przesiewowy, który zatrzymuje większe cząsteczki znajdujące się w kale (np. niestrawione resztki pokarmowe). Na rynku dostępne są różne produkty, również takie, które posiadają dodatkowo filtr tłuszczowy, dlatego w zestawach tych nie ma potrzeby stosowania octanu etylu. Roztwory wykorzystane w zestawach mają właściwości konserwujące i można przechowywać przygotowane w ten sposób próbki (np. do celów szkoleniowych). Podobnie jak w klasycznej metodzie formalinowo-octanowo-etylowej, stosowanie komercyjnych zestawów również wymaga korzystania z wirówki oraz wytrząsarki. Jednak ze względu na to, że ilość badanego kału przy użyciu minizestawów (najczęściej stosowanych) jest znacznie mniejsza niż w klasycznych metodach sedymentacyjnych, pasożyty mogą nie zostać wykryte w przypadku niskiej intensywności inwazji.

WYMAZ OKOŁO ODBYTNICZY W KIERUNKU OWSICY

Materiał do oceny mikroskopowej w kierunku owsicy

pobiera się ze skóry wokół odbytu, gdzie można wykryć jaja pasożyta złożone przez samice *Enterobius vermicularis*. Zestawy do wykonania wymazu można sporządzić w laboratorium i wraz z instrukcją przekazywać pacjentom (najczęściej rodzicom dzieci z podejrzeniem owsicy), aby samodzielnie wykonali wymaz w domu. Istnieją także komercyjne zestawy do pobierania materiału. Wymaz najlepiej zrobić wcześniej rano, koniecznie przed wypróżnieniem i podmyciem. W razie uzyskania wyniku ujemnego zaleca się powtórzenie badania jeszcze dwukrotnie w odstępach jednodniowych. W przypadku zestawów przygotowywanych przez laboratorium najczęściej wykonuje się wymaz, stosując metodę Grahama. Instrukcję przygotowania zestawu oraz sposób pobrania materiału przedstawiono w tabeli IV.

PODSTAWOWE UTRWALACZE, BARWNIKI I METODY BARWIENIA STOSOWANE W PARAZYTOLOGICZNYCH BADANIACH KAŁU

Formalina to stężony (nasycony 35 – 40%) wodny roztwór formaldehydu. Odpowiednio rozcieńczony służy jako utrwalacz do konserwacji różnych próbek biologicznych. W parazytologii odczynnik ten najczęściej jest stosowany do konserwacji cyst i oocyst pierwotniaków, jaj helmintów, a także larw (jednak tych ostatnich nie zawsze z dobrym efektem). Pasożyty w próbce kału zakonserwowanej w formalinie można barwić safraniną. Utrwalacz ten nie uniemożliwia barwienia organizmów kwasoopornych, nie jest jednak odpowiedni do konserwowania kału przeznaczonego do wykonania trwałych preparatów barwionych trichromem. Ponadto formalina, jako inhibitor reakcji PCR, ogranicza jej zastosowanie w przypadku próbek przeznaczonych do badań molekularnych. W takich przypadkach konieczne może być użycie innych metod utrwalania. Sposób sporządzenia roztworów formaldehydu, które najczęściej są stosowane w laboratorium parazytologicznym, przedstawiono w tabeli V.

Roztworem stosowanym rutynowo w badaniach mikroskopowych do podbarwiania mokrych preparatów kału jest płyn Lugola. Zastosowanie płynu Lugola umożliwia zaobserwowanie szczegółów morfologicznych głównie cyst i oocyst pierwotniaków oraz form *Blastocystis*. Stają się one lepiej uwidocznione niż przy użyciu soli

fizjologicznej. Wadą płynu Lugola jest to, że unieruchamia i zabija trofozoity pierwotniaków, dlatego uniemożliwia obserwowanie ich ruchu [4]. Cysty pierwotniaków barwione płynem Lugola powinny zawierać żółto-złotą cytoplazmę, glikogen wybarwiony na brązowo oraz jaśniejsze, wyraźne jądra komórkowe. Sposób przygotowania płynu Lugola przedstawia tabela VI.

W parazytologii niekiedy istnieje potrzeba przygotowania trwałych barwionych preparatów z rozmazów kału, w których wykryto pierwotniaki (trofozoity i/lub cysty). Najczęściej stosuje się barwienie hematoksyliną albo trichromem. Ich zaletą jest to, że jako preparaty trwałe mogą być przechowywane i dlatego nadają się do dokumentacji (co jest istotne) i w razie potrzeby przeszkolenia nowego pracownika, a wadą, że nie pozwalają na odróżnienie patogennego gatunku *Entamoeba histolytica* od niepatogennych gatunków z kompleksu *E. histolytica sensu lato*, np. *E. dispar*. Istnieje natomiast możliwość rozróżnienia tych gatunków metodą PCR. Barwione preparaty mogą być pomocne w rozróżnianiu innych gatunków pełzaków jelitowych (uznawanych za niepatogenne), a najbardziej w odróżnieniu *Endolimax nana* od podobnego wyglądem do pełzaków, wiciowca *Dientamoeba fragilis*. Jednak barwienia te są skomplikowane i pracochłonne, dlatego też rzadko stosuje się je w diagnostyce rutynowej, zwłaszcza że obecnie są gotowe testy PCR do wykrywania *D. fragilis*. Przed zabarwieniem rozmazy kału na szkiełkach mikroskopowych muszą być odpowiednio utrwalone (w zależności od tego, czy będą barwione bezpośrednio po przygotowaniu, czy w późniejszym terminie). Najczęściej stosowane odczynniki do utrwalania rozmazów kału przed zabarwieniem przedstawiono w tabeli VII. Prawidłowy sposób przygotowania rozmazów kału przedstawiono w tabeli VIII. Przepisy barwienia pierwotniaków jelitowych hematoksyliną żelazistą i trichromem przedstawiają odpowiednio tabele IX i X. Ponieważ barwienie z zastosowaniem powyższych metod jest złożone, wykonuje się je według Coplina, tj. przy użyciu szeregu naczynek żebekowanych wypełnionych kolejnymi odczynnikami, w których umieszcza się preparaty na odpowiedni czas, zgodnie z poszczególnymi przepisami barwienia. Utrwalanie w odczynniku Schaudinna oraz PVA przeprowadza się także w naczynku żebekowanym.

Hematoksylina i trichrom nie są odpowiednie do barwienia oocyst pierwotniaków z rodzajów *Cryptosporidium*, *Cystoisospora* i *Cyclospora*. W celu wykrycia tych paso-

żytów stosuje się barwienie metodą Ziehla-Neelsena. Metoda ta pozwala uwidocznić organizmy cechujące się kwasoopornością. Wykorzystuje się w niej barwnik karbolofuksynowy, odbarwiacz – wodny roztwór kwasu siarkowego (w niektórych przepisach kwasu solnego) lub kwaśny alkohol etylowy (roztwór kwasu w alkoholu etylowym). Następnie stosuje się barwnik kontrastowy, czyli zieleń malachitową lub błękit metylenowy. Po przeprowadzeniu procedury barwienia organizmy kwasooporne pozostają czerwone, podczas gdy tło preparatu (elementy niekwasooporne), które pod wpływem działania kwasu ulega odbarwieniu z fuksyny, jest zielone lub niebieskie (w zależności od tego, czy do kontrastu użyto zieleni malachitowej, czy błękitu metylenowego). W odróżnieniu od klasycznej metody Ziehla-Neelsena, wykorzystywanej w bakteriologii do barwienia prątków, w parazytologii stosuje się jej modyfikację (tzw. barwienie na zimno), polegającą na niepodgrzewaniu fuksyny w czasie barwienia (modyfikacja Kinyouna).

W piśmiennictwie spotyka się przepisy wykonania tego barwienia różniące się od siebie, np. długością czasu przetrzymywania preparatów w kolejnych odczynnikach szeregu barwiącego (głównie w fuksynie karbolowej) oraz temperaturą, w jakiej suszy się preparaty. W tabeli XI podany jest sprawdzony i jednocześnie jeden z prostszych przepisów z zastosowaniem zmodyfikowanej metody Ziehla-Neelsena (wg dr hab. n. med. Marii Wesołowskiej z Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, badania nieopublikowane). Preparaty należy oglądać pod powiększeniem obiektywu 40x lub 60x, a dla zaobserwowania szczegółów pod powiększeniem obiektywu 100x (immersyjnym). Obecnie dostępny jest też komercyjny zestaw do barwienia *Cryptosporidium* spp.

Wybrane metody hodowli pasożytów

Niekiedy w diagnostyce parazytologicznej pomocne lub niezbędne jest założenie hodowli *in vitro*, które zwiększa szansę wykrycia pasożytów, a także umożliwia odróżnienie gatunków w przypadkach, gdy formy dyspersyjne wykrywane w materiale klinicznym nie pozwalają na dokładną identyfikację.

HODOWLA LARW NICIENI Z RODZAJÓW *STRONGYLOIDES*, *ANCYLOSTOMA*, *NECATOR* I *TRICHOSTRONGYLUS*

Założenie hodowli larw zwiększa wykrywalność ni-

cieni z rodzajów: *Strongyloides*, *Ancylostoma*, *Necator* i *Trichostrongylus* przez wykorzystanie ich wilgociolubności. Jest to szczególnie pomocne w przypadku mało intensywnych inwazji, ponieważ larwy migrują z kału do wody, gdzie łatwiej je wykryć. Poza tym, prowadząc hodowlę, można uzyskać kolejne stadia larwalne, a na podstawie ich cech morfologicznych rozpoznać rodzaj lub gatunek nicienia. Identyfikacja ta jest istotna ze względów klinicznych. W przypadku wyżej wymienionych rodzajów nicieni jest szczególnie ważne odróżnienie larw węgorka jelitowego (*Strongyloides stercoralis*) od larw tęgoryjców (z rodzajów *Ancylostoma* i *Necator*) oraz *Trichostrongylus* spp. W inwazji węgorkiem jelitowym z kałem wydalone są larwy, w inwazji tęgoryjcami oraz *Trichostrongylus* spp. jaja, ale już po 24 godzinach larwy w kale wylęgają się z jaj. W przypadku *Ancylostoma duodenale* i *Necator americanus* jaja są identyczne. Różnice morfologiczne larw pierwszego i drugiego stadium (tzw. rabditopodobnych) pomiędzy rodzajami są nieznaczne. Mniej trudności sprawia rozróżnienie tzw. larw filariopodobnych, tj. trzeciego stadium larwalnego. Larwy te w przypadku węgorka jelitowego pojawiają się w hodowli na ogół po 2 – 3 dniach, w przypadku tęgoryjców zwykle po 5 – 7 dniach, a *Trichostrongylus* spp. po 3 – 5 dniach.

Istnieją różne techniki pozwalające na uzyskanie larw tych nicieni, niemniej najprostszą jest hodowla według Harady-Mori'ego (tab. XII). Kał, z którego zakłada się hodowlę, nie powinien być uprzednio schładzany ani zanieczyszczony wodą.

HODOWLA PIERWOTNIAKÓW AMFIZOICZNYCH NA PODŁOŻU STAŁYM

Hodowlę pełzaków amfizoicznych (pierwotnie wolnożyjących) stosuje się najczęściej w diagnostyce pełzakowego zapalenia rogówki w celu zwiększenia wykrywalności *Acanthamoeba* spp. w materiale pobranym z rogówki. Jeśli badań nie wykonuje się na miejscu, płytki z posianym materiałem należy transportować w temperaturze pokojowej do specjalistycznego laboratorium. Można zastosować podłoże transportowe NN lub agar nieodżywczy z posianym wzorcowym

szczepem *Escherichia coli* ATTC Nr 25922. Podłoże NN jest dostępne w sprzedaży, a agar nieodżywczy można przygotować samodzielnie. Instrukcja przygotowania agaru nieodżywczego oraz założenia hodowli pełzaków zawarta jest w tabeli XIII.

WYKRYWANIE LARW WŁOŚNI

Mikroskopowo włośnicę u ludzi rozpoznaje się poprzez wykrycie larw pasożyta w mięśniu naramiennym lub mięśniu brzuchatym łydki. W diagnostyce włośnicy człowieka stosuje się dwie metody – kompresorową i trawienia. Metoda trawienia jest czulsza, ale można nie wykryć nią larw jeszcze nieinwazyjnych, a tylko takie są obecne we wczesnej fazie mięśniowej (przed 17. dniem od zarażenia) [8]. W praktyce zaleca się najpierw zbadać biopłat mięśnia, stosując metodę kompresorową, a w przypadku wyniku ujemnego materiał z kompresora poddać trawieniu. Przed umieszczeniem w kompresorze wycinek powinien być pocięty na drobne skrawki. Larw nieotorbionych szuka się również w płynie, który powstanie dookoła skrawka po jego ściśnięciu. Instrukcja przygotowania sztucznego soku żołądkowego i przeprowadzenia trawienia mięśnia zawarta jest w tabeli XIV.

PODSUMOWANIE

Przedstawione w niniejszym artykule szczegółowe i, mamy nadzieję, klarowne opisy podstawowych metod parazytologicznego badania różnego rodzaju materiału klinicznego powinny być potraktowane jako uzupełnienie do „Wytycznych Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej i Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego w zakresie laboratoryjnych czynności w parazytologii medycznej. 2025”.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Pani dr n. biol. Annie Kłysz z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego, Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za informacje dotyczące hodowli pełzaków amfizoicznych.

Tabela I. Wykonanie preparatów grubego oraz cienkiego rozmazu krwi.

Gruby rozmaz krwi – tzw. gruba kropla	
1.	Kroplę krwi wielkości 10–15 µl umieścić na szkiełku podstawowym i rozprowadzić okrężnym ruchem (np. rożkiem drugiego szkiełka mikroskopowego lub końcówką pipety) na powierzchni o średnicy 1,5–2 cm. Czynność ta powinna trwać 20–30 sek., co zapewnia dobre przylgnięcie rozmazu do szkiełka.
2.	Pozostawić preparat do całkowitego wyschnięcia w temperaturze pokojowej (nie krócej niż 1 godz. w przypadku preparatu wykonanego bezpośrednio z pobranej krwi, a z krwi pobranej na EDTA co najmniej 2 godz.).
Cienki rozmaz krwi	
1.	Kroplę krwi (3–5 µl) nanieść na koniec szkiełka podstawowego.
2.	Drugie, pomocnicze szkiełko z oszlifowanym brzegiem ustawić pod kątem 30–40°, dotykając kropli.
3.	Po rozptynięciu kropli krwi wzdłuż brzegu szkiełka pomocniczego przesunąć je, rozprowadzając krew wzdłuż szkiełka podstawowego. Dobrze wykonany rozmaz jest z jednej strony grubszy, a z drugiej cieńszy, utworzony przez pojedynczą warstwę krwinek. Uzyskanie pojedynczej warstwy krwi w rozmazie ma kluczowe znaczenie w diagnostyce malarii i babeszjozy (w tej części rozmazu określa się parazytemię).
4.	Pozostawić preparat do całkowitego wyschnięcia w temperaturze pokojowej (zwykle około 1 godz.).

Uwaga: Do sporządzania rozmazów należy używać szkiełek podstawowych odtłuszczonych. Jeśli zakupione szkiełka nie spełniają tego warunku, należy bezwzględnie je odtłuścić za pomocą alkoholu, np. denaturatu i dokładnie wytrzeć.

Tabela II. Barwienie preparatów grubego oraz cienkiego rozmazu krwi.**Barwienie grubej kropli****Uwaga:** Nie utrwalać preparatu.

1. Zalać bezpośrednio rozmaz rozcieńczonym odczynnikiem Giemsy lub uprzednio kilka razy zanurzyć preparat w wodzie (w celu lepszego zhemolizowania). Rozcieńczenie barwnika dopracować zależnie od konkretnego odczynnika używanego w laboratorium, np. 1:10 lub mniejsze.
2. Pozostawić na 30 minut.
3. Spłukać ostrożnie preparat wodą bieżącą (nie lać wody bezpośrednio na rozmaz, woda ma spływać po rozmazie).
4. Pozostawić do wyschnięcia w pozycji pionowej lub skośnej.

Barwienie cienkiego rozmazu**Metoda Giemsy**

1. Utrwalić rozmaz: zalać metanolem absolutnym na 5 minut, zlać alkohol, odsączyć.
2. Pozostawić rozmaz do wyschnięcia.
3. Zalać rozmaz rozcieńczonym odczynnikiem Giemsy (rozcieńczenie patrz wyżej).
4. Pozostawić na 1 godz.
5. Spłukać preparat wodą bieżącą, dłużej niż grubą kroplę (nie lać wody bezpośrednio na rozmaz, woda ma spływać po rozmazie).
6. Pozostawić rozmaz do wyschnięcia w pozycji pionowej lub skośnej.

Metoda Pappenheima (May-Grünwald, Giemsa)

1. Utrwalić rozmaz: zalać nierozcieńczonym odczynnikiem Maya-Grünwalda na 3 – 5 minut.
2. Spłukać preparat wodą destylowaną (nie lać wody bezpośrednio na rozmaz, woda ma spływać po rozmazie).
3. Zalać rozcieńczonym odczynnikiem Giemsy (rozcieńczenie patrz wyżej).
4. Pozostawić na 1 godz.
5. Spłukać preparat (dłużej niż grubą kroplę) wodą bieżącą (nie lać wody bezpośrednio na rozmaz, woda ma spływać po rozmazie).
6. Pozostawić do wyschnięcia w pozycji pionowej lub skośnej.

Uwagi: Różnica między metodą Pappenheima a metodą Giemsy polega na sposobie utrwalania cienkich rozmazów. Rozmazy utrwalone alkoholem metylowym są delikatniej wybarwione niż utrwalone odczynnikiem Maya-Grünwalda, który jednocześnie utrzuwa i podbarwia rozmaz.

Barwienie odczynnikiem Giemsy można przeprowadzić poprzez zalanie poziomo leżących preparatów (jak opisano wyżej) lub w specjalnych naczynkach zeberkowanych przeznaczonych do barwienia preparatów mikroskopowych (metoda Coplina). Druga metoda wymaga sporządzenia jednorazowo 50 ml roztworu barwiącego, lecz można barwić jednocześnie 10 preparatów, a dodatkowo stosować ten sam odczynnik kilkakrotnie w ciągu dnia (nie można przechowywać dłużej).

Woda destylowana używana do rozcieńczania odczynnika Giemsy powinna mieć pH 7,0–7,2, co powoduje, że przy zarażeniach *Plasmodium vivax* i *P. ovale* lepiej wybarwiają się w krwinkach ziarnistości Schüffnera. Najprostsze sposoby doprowadzenia wody do wymaganego pH to gotowanie przez 10 minut i ostudzenie przed użyciem lub dodanie do każdego litra wody destylowanej 0,6 g bezwodnego KH_2PO_4 i 3,0 g bezwodnego Na_2HPO_4 lub 7,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$.

Metodą Giemsy można również barwić płyn mózgowo-rdzeniowy w podejrzeniu inwazji *Trypanosoma brucei* (postacie trypomastigota) i *Toxoplasma gondii* (tachyzoity).

Tabela III. Badania koproskopowe preparatów mokrych – metody bezpośrednie oraz metody zagęszczające pasożyty.

Uwaga: Jeżeli konsystencja pozwoli, kał przed nastawieniem metod wymieszać bagietką.

A. Metody bezpośrednie

Rozmaz kału w soli fizjologicznej

Podajemy do wyboru dwa sposoby wykonania rozmazu (równorzędne jakościowo pod względem uzyskanego wyniku).

1. Niewielką ilość kału (wielkości łebka szpilki) pobranego za pomocą ezy, bagietki lub drewnianej pałeczki należy dokładnie wymieszać z 1 lub kilkoma (w zależności od konsystencji kału) kroplami soli fizjologicznej na powierzchni szkiełka podstawowego i przykryć preparat szkiełkiem nakrywkowym 22 × 22 mm.
2. Próbkę kału wielkości około 1 ziarna grochu zmieszać w probówce¹⁾ z około 3 ml 0,9% NaCl. Z tej zawiesiny wykonać preparat bezpośredni w następujący sposób: na szkiełku mikroskopowym podstawowym umieścić kroplę soli fizjologicznej, następnie nanieść pipetą zawiesinę kału pobraną z probówki w takiej ilości, aby po zmieszaniu preparat nie był zbyt gęsty i przykryć szkiełkiem nakrywkowym 22 × 22 mm. Sposób ten umożliwia wykonanie z 1 próbki więcej niż jednego preparatu lub dłuższego rozmazu, który można przykryć dwoma szkiełkami nakrywkowymi.

Rozmaz należy oglądać pod powiększeniem obiektywu 40× lub 60×. Preparat w soli fizjologicznej umożliwia obserwację charakterystycznego ruchu trofozoitów pelzaków i wiciowców, co ma znaczenie diagnostyczne.

Uwaga: Prawidłowe sporządzenie preparatu wymaga nieco wprawy – w zbyt „gęstym” łatwo o przeoczenie poszukiwanego obiektu, natomiast w zbyt „rzadkim”, trudno cokolwiek znaleźć. Preparat o optymalnej gęstości powinien umożliwiać odczytanie drobnego druku na umieszczonej pod nim kartce.

¹⁾ Probówka okrągłodenna jest lepsza niż stożkowa.

Rozmaz kału w płynie Lugola

Sporządzić preparat jak wyżej, używając zamiast soli płynu Lugola. Płyn ten zabija pasożyty, a jednocześnie je podbarwia. Metoda ta zazwyczaj nie pozwala na identyfikację trofozoitów pelzaków, daje jednak cenne informacje o strukturze cyst i form *Blastocystis*. Rozmaz należy oglądać pod powiększeniem obiektywu 40× lub 60×.

Uwaga: Nie ma potrzeby wykonywania takiego preparatu w przypadku badania kału wyłącznie w kierunku jaj bądź larw helmintów.

Rozmaz gruby kału wg Kato i Miura

Celofan pociąć na skrawki np. 22 × 30 mm. Skrawki celofanu przed użyciem moczy się przez co najmniej 24 godziny w roztworze sporządzonym wg poniższego przepisu.

Woda destylowana	100,0 ml
Gliceryna	100,0 ml
2% zieleń malachitowa (roztwór wodny)	1,0 ml

Ilość kału wielkości pestki jabłka nałożyć na szkiełko podstawowe, przykryć celofanem i rozgnieść za pomocą korka gumowego. Preparaty ogląda się po 30–60 minutach przy silnym świetle. Preparaty ogląda się po 30–60 minutach przy silnym świetle, pod powiększeniem obiektywu 10–20×, a w przypadku podejrzenia sarkocystozy, także pod powiększeniem obiektywu 40× lub 60×.

Tabela III. cd. Badania koproskopowe preparatów mokrych – metody bezpośrednie oraz metody zagęszczające pasożyty.

B. Metody zagęszczające	
Metody flotacyjne	
Flotacja przy użyciu roztworu chlorku sodu (metoda Fülleborna w modyfikacji Willisa)	
Przygotować nasycony roztwór NaCl (ciężar właściwy $1,20 \text{ g/cm}^3$), najlepiej przez zagotowanie wody z dodatkiem soli kuchennej w nadmiarze (zwykle wystarcza 400 g NaCl na 1000 ml wody), wymieszać i pozostawić do następnego dnia. Dowodem nasycenia roztworu jest widoczna na dnie oraz na powierzchni cienka warstwa wykrystalizowanej soli. Następnie przelać sam płyn do butelki i roztwór jest gotowy do użycia. Sposób dalszego postępowania: próbkę o średnicy około 2 cm i wysokości 5–7 cm z płaskim dnem lub okrągłodenną wypełnić do wysokości $\frac{1}{4}$ powyższym roztworem soli, dokładnie zmieszać z próbką kału wielkość $1\frac{1}{2}$ ziarna grochu i dopełnić roztworem soli do brzegu próbki. Następnie szybko usunąć bagietką ewentualne większe elementy, które wypłynęły na powierzchnię i uzupełnić roztworem soli do utworzenia niewielkiego menisku wypukłego. Probówkę przykryć ostrożnie szkiełkiem nakrywkowym ($22 \times 22 \text{ mm}$ lub $24 \times 24 \text{ mm}$) tak, aby menisk dokładnie przylegał do szkiełka opierającego się o brzeg próbki. Po 20–30 minutach¹⁾ należy zdjąć szkiełko z wiszącą kroplą za pomocą pęsety i przenieść na szkiełko podstawowe, na którym uprzednio umieścić kroplę soli fizjologicznej. W tym przypadku możemy nie podbarwiać preparatu płynem Lugola, gdyż cysty pierwotniaków zazwyczaj nie wypływają na powierzchnię²⁾. Nie wypływają też ciężkie jaja: przywr i niezapłodnione jaja <i>Ascaris lumbricoides</i>. Preparat oglądać pod powiększeniem obiektywu 10–20×. ¹⁾ Zbyt długi czas powoduje opadanie elementów flotujących, czas zależy od wysokości próbki. ²⁾ Nasycony roztwór NaCl najczęściej niszczy cysty pierwotniaków.	
Flotacja przy użyciu roztworu siarczanu cynku (metoda Fausta)	
Przygotować (w ciepłej wodzie) 33,1% roztwór siarczanu cynku. Ciężar właściwy oziębionego roztworu, który należy kontrolować, powinien wynosić od $1,18 \text{ g/cm}^3$ do $1,20 \text{ g/cm}^3$. Ciężar właściwy $1,20 \text{ g/cm}^3$ jest ważny, jeśli kał jest utrwalony w formalinie. Dalej postępować podobnie jak w metodzie Fülleborna w modyfikacji Willisa, z tym, że szkiełko nakrywkowe zdejmuje się po upływie około 20 minut, a preparat należy podbarwić płynem Lugola, gdyż metoda pozwala wykryć także cysty pierwotniaków. Preparat oglądać pod powiększeniem obiektywu 10–20×, a następnie około $1/2$ pod powiększeniem 40× lub 60×.	
Metody sedymentacyjne	
Metoda sedymentacji w wodzie (dekantacja)	
1. Próbkę kału wielkości orzecha laskowego zmieszać w zlewce o pojemności 100 ml (można użyć pojemnika do moczu) z niewielką ilością wody. 2. Dolać wody do $3/4$ naczynia, wymieszać i pozostawić na 1 godz., przez ten czas lekkie elementy kałowe wypłyną na powierzchnię, natomiast formy pasożytnicze jako cięższe pozostaną w osadzie. 3. Zlać supernatant i ponownie zalać osad wodą na 1 godz. 4. Zlać supernatant znad osadu. 5. Pobrać¹⁾ osad pipetą, przenieść na szkiełko podstawowe z umieszczonym na nim płynem Lugola (1–2 krople), najlepiej wykonać dłuższy rozmaz i przykryć preparat szkiełkiem nakrywkowym. Preparat oglądać pod powiększeniem obiektywu 10–20×, a następnie około $1/3$ pod powiększeniem 40× lub 60×. W metodzie dekantacji w wodzie można wykryć cysty i oocysty pierwotniaków, jaja i larwy helmintów. ¹⁾ Można (dla wygody) przelać osad ze zlewki do próbki i z niej pobierać materiał na szkiełko.	

Uwaga: Jeśli kał jest świeży, a do dekantacji użyje się 0,9% NaCl zamiast wody, w osadzie można niekiedy wykryć żywe trofozoity pierwotniaków (nie należy podbarwiać preparatu płynem Lugola). W przypadku podejrzenia schistosomozy użycie soli fizjologicznej do dekantacji jest zawsze zalecane, ponieważ spowoduje opóźnienie wylęgania miracydiów z jaj.

Tabela III. cd. Badania koproskopowe preparatów mokrych – metody bezpośrednie oraz metody zagęszczające pasożyty.

Metoda formalinowo-octanowo etylowa
1. Zmieszać kał (wielkości orzecha laskowego) z około 3 ml 0,9% NaCl lub 10% formaliny. 2. Przecedzić przez gazę do probówki wirowniczej. 3. Odwirować przy 500 × g przez 10 minut. 4. Odrzucić supernatant, osad powinien mieć objętość około 0,5 ml dla kału formalinizowanego i 0,75 ml dla kału nieutrwalonego. 5. Dodać około 10 ml 10% formaliny (ewentualnie może być woda destylowana) i około 4 ml octanu etylu. 6. Probówkę zatkać korkiem i dobrze wytrząsnąć przez 30–60 sek. 7. Wirować przy 500 × g przez 10 minut. 8. Odrzucić trzy górne warstwy i badać osad na obecność pasożytów, podbarwiając płynem Lugola. Preparat oglądać pod powiększeniem obiektywu 10–20×, a następnie około 1/2 pod powiększeniem 40× lub 60×. W tej metodzie można wykryć cysty i oocysty pierwotniaków oraz jaja i larwy helmintów.

Tabela IV. Wykonanie wymazu okołodbytniczego w kierunku owsicy (metoda Grahama).

Elementy zestawu
Jałowa szpatułka laryngologiczna Szkiełko mikroskopowe podstawowe ze szlifowanymi krawędziami Przezroczysta taśma samoprzylepna o szerokości około 2 cm
Przygotowanie zestawu
Taśmę długości około 14 cm przykleić wzdłuż szkiełka podstawowego w taki sposób, aby z obu stron wystawał nadmiar taśmy. Jeden wystający koniec przykleić od spodu do szkiełka (w celu zabezpieczenia przed odklejeniem taśmy), a drugi koniec (około 2,5 cm) złożyć na pół i skleić ze sobą lepkimi stronami (będzie służyć jako uchwyt).
Wykonanie wymazu okołodbytniczego
1. Szkiełko podstawowe położyć na szpatułce laryngologicznej. 2. Przezroczystą taśmę, pociągając za uchwyt, odkleić od szkiełka prawie do końca jego długości i zagiąć na wysuniętym końcu szpatułki tak, aby wyeksponować stronę z klejem. Przy odpowiednim uchwyceniu szpatułki ze szkiełkiem pobrać wymaz. 3. Rozchylić pośladki i częścią lepką przylepca dotknąć fałdów okołodbytniczych (nie wkładać do otworu odbytowego). 4. Przykleić taśmę ponownie do szkiełka podstawowego w taki sposób, aby nie utworzyły się pęcherzyki powietrza. 5. Pobraną próbkę włożyć do koperty, kopertę zakleić i dostarczyć do laboratorium w dniu pobrania.

Tabela V. Roztwory formaldehydu stosowane rutynowo w badaniach parazytologicznych.

Roztwory formaldehydu stosowane rutynowo w badaniach parazytologicznych	
Formalina 10% (4% wodny roztwór formaldehydu)	
Formaldehyd (wodny roztwór formaldehydu 35–40%)	10,0 ml
Woda destylowana lub 0,9% NaCl	90,0 ml
Formalina 5% (2% wodny roztwór formaldehydu)	
Formaldehyd (jw.)	5,0 ml
Woda destylowana lub 0,9% NaCl	95,0 ml

Uwaga: Zastosowanie soli fizjologicznej zamiast wody zapobiega ewentualnemu pękaniu larw. Obecnie są dostępne gotowe do użycia 4% roztwory formaldehydu różnych producentów.

Tabela VI. Instrukcja przygotowania płynu Lugola do badań parazytologicznych.

Płyn Lugola ¹⁾	
Jodek potasu (KI)	2,0 g
Jod krystaliczny (I ₂)	1,0 g
Woda destylowana	100,0 ml

Uwaga: Przechowywać w ciemnej butelce.

Przygotowanie płynu Lugola

Rozpuścić jodek potasu i kryształy jodu w wodzie destylowanej (w kolbie lub butelce, używając mieszadła magnetycznego). Roztwór jodku potasu powinien być nasycony jodem, z pewnym nadmiarem kryształów pozostających na dnie butelki. Roztwór podstawowy jest gotowy do natychmiastowego użycia. Przechowywać w brązowej, szklanej butelce z korkiem, w temperaturze pokojowej i w ciemności tak długo, jak długo na dnie butelki pozostają nadmiarowe kryształy jodu (na ogół do roku). Roztwór roboczy płynu Lugola powinien mieć kolor koniaku.

¹⁾ Obecnie są dostępne gotowe roztwory płynu Lugola o różnej procentowości. Roztwory o większym stężeniu przed użyciem trzeba rozcieńczyć wodą do żądanej barwy (koniaku).

Tabela VII. Odczynniki stosowane do utrwalania rozmazów kału przeznaczonych do barwienia hematoksyliną oraz trichromem [3].

Utrwalacz Schaudinna	
A. Nasycony roztwór chlorku rtęciowego (HgCl₂)	
HgCl ₂	11 g
Woda destylowana	do 100 ml
B. Roztwór podstawowy	
Nasycony roztwór HgCl ₂ (A)	2 części / 100 ml
95% alkohol etylowy	1 część / 50 ml
C. Roztwór roboczy – wykonać bezpośrednio przed użyciem	
Roztwór podstawowy (B)	20 części / 50 ml ¹⁾
Kwas octowy lodowaty	1 część / 2,5 ml ¹⁾

Przygotowanie utrwalacza Schaudinna

Nasycony roztwór chlorku rtęci (A) wykonuje się przez podgrzewanie roztworu aż do rozpuszczenia chlorku. Podgrzewanie należy prowadzić pod wyciągiem, mając nałożoną maseczkę ochronną na nos i usta. Roztwór przechowywać w szczelnie zamkniętej butelce. Trwałość roztworu roboczego (C) do 1 tygodnia. Służy do utrwalania kału świeżego bezpośrednio przed barwieniem.

¹⁾ Ta objętość wystarcza do przygotowania roztworu w objętości 1 naczynia Coplina.

Uwaga: HgCl₂ jest odczynnikiem bardzo toksycznym; na rynku dostępny jest zmodyfikowany utrwalacz Schaudinna, który zamiast chlorku rtęci posiada w składzie nietoksyczny zamiennik – siarczan miedzi.

Utrwalacz poliwinylowy (PVA)	
Roztwór podstawowy utrwalacza Schaudinna (B)	93,5 ml
Glicerol	1,5 ml
Alkohol poliwinylowy	5,0 g
Kwas octowy lodowaty	5,0 ml

Przygotowanie utrwalacza poliwinylowego (PVA)

Do roztworu podstawowego utrwalacza Schaudinna dodać glicerol. Następnie wstawić roztwór do łaźni wodnej o temperaturze 75°C, dodawać powoli alkohol poliwinylowy (aż do całkowitego rozpuszczenia i wyklarowania zawiesiny). Na końcu dodać kwas octowy lodowaty.

Uwaga: Można przechowywać przez kilka miesięcy. Utrwalacz konserwuje materiał i ułatwia jego przytwierdzenie do szkiełka (ważne przy kale biegunkowym).

Tabela VIII. Wykonywanie rozmazów kału przeznaczonych do barwienia.

Preparaty przeznaczone do utrwalenia w utrwalaczu Schaudinna	
1.	Bagietkę zanurzyć w kale, najlepiej w kilku miejscach, szczególnie z widocznym śluzem lub krwią. Kał wodnisty należy odwirować i z osadu wykonać rozmazy, jak niżej.
2.	Nałożyć kał (duża kropla w przypadku kału rzadkiego, wielkości pestki jabłka w przypadku kału uformowanego) na szkiełko podstawowe. Wykonać rozmaz bagietką lub drugim szkiełkiem. Najlepiej, gdy z jednej strony rozmaz jest cieńszy, a z drugiej nieco grubszy.
3.	Preparat natychmiast umieścić w naczynku z utrwalaczem Schaudinna na 30 minut.
Preparaty przeznaczone do utrwalenia w utrwalaczu poliwinylowym (PVA)	
1.	Bagietkę zanurzyć w kale, najlepiej w kilku miejscach. Kał wodnisty należy odwirować i z osadu wykonać rozmazy, jak niżej.
2.	Nałożyć kał (np. wielkości główki zapalniczki) na środek szkiełka podstawowego, dodać 3 krople PVA.
3.	Dokładnie wymieszać, po czym rozmazać materiał w kształt prostokąta lub owalu. Po 30–60 sekundach rozmieszać ponownie.
4.	Pozostawić do całkowitego wysuszenia (co najmniej kilka godzin). Taki rozmaz można przechowywać do kilku miesięcy.

Uwaga: Preparaty utrwalone w roztworze Schaudinna należy barwić od razu, nie dopuszczając, aby wyschły. W celu wykonania większej liczby preparatów, np. do wysyłki lub dla celów dydaktycznych, stosuje się PVA: do małego zamykanego naczynka dać większą objętość kału (około 1 g lub więcej) oraz 3 lub więcej objętości PVA. Tak utrwalony materiał można przechowywać przez kilka miesięcy. Przed wykonaniem preparatów wskazane jest zmienić PVA (ale nie jest to konieczne) i po dokładnym wymieszaniu nanieść 1–2 krople materiału na szkiełko podstawowe, zrobić rozmaz i pozostawić do wyschnięcia na kilka godzin.

Tabela IX. Barwienie pierwotniaków jelitowych hematoksyliną żelazistą wg Spencera.

Odczynniki	
Roztwór hematoksyliny	
Hematoksylina	1,0 g
Alkohol etylowy 99,8%	100,0 ml
Uwaga: Pozostawić co najmniej na jeden tydzień na świetle, w jasnej butelce zamkniętej korkiem. Jeżeli do wody wodociągowej wleje się kilka kropli barwnika i powstanie fioletowe zabarwienie, oznacza to, że barwnik jest dobry. Roztwór można przechowywać przez wiele miesięcy.	
Ałun	
Amonu żelaza (II) siarczan 6 hydrat – $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
Amonu żelaza (III) siarczan 12 hydrat – $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
Kwas solny stężony	1,0 ml
Woda destylowana	100,0 ml
Roztwór można przechowywać do 6 miesięcy	
Roboczy roztwór barwnika	
Roztwór hematoksyliny	1 część (25 ml)
Ałun	1 część (25 ml)

Uwaga: Wykonać w dniu barwienia, można ewentualnie przetrzymać do 7 dni.

Przebieg barwienia	
1. Utrwalony preparat kału umieścić w naczynku z alkoholem 70% z jodem (płynem Lugola) – kolor roztworu powinien być barwy koniaku.	5 minut – po utrwalaczu Schaudinna, 15 minut – po PVA
2. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem 70% – I zmiana (barwienie preparatów utrwalonych w SAF zaczynać od tego punktu).	5 minut
3. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem 70% – II zmiana (w razie konieczności tu można przerwać barwienie i kontynuować następnego dnia, pozostawiając preparat zanurzony w alkoholu).	5 minut
4. Przenieść preparat do naczynka z wodą.	10 minut
5. Przenieść preparat do naczynka z roztworem roboczym hematoksyliny.	3–5 minut – po utrwalaczu Schaudinna, 10 minut – po PVA
6. Ewentualnie przenieść preparat do naczynka z kwasem pikrynowym półnasyconym (w takim przypadku zarówno tło preparatu, jak i cytoplazma pierwotniaków są jaśniejsze, co ułatwia wykrycie i różnicowanie pasożytów).	10 minut
7. Przenieść preparat do naczynka z wodą bieżącą.	10 minut
8. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem 70%.	5 minut
9. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem 80%.	5 minut
10. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem 90%.	5 minut

Tabela IX. cd. Barwienie pierwotniaków jelitowych hematoksyliną żelazistą wg Spencera.

Przebieg barwienia – c.d.	
11. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem 95%.	5 minut
12. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem absolutnym – I zmiana.	5 minut
13. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem absolutnym – II zmiana.	5 minut
14. Przenieść preparat do naczynka z ksylenem – I zmiana.	5 minut
15. Przenieść preparat do naczynka z ksylenem – II zmiana.	5 minut
16. Zatopić preparat w balsamie naturalnym lub syntetycznym medium montującym (Histofluid, DPX lub inny) i przykryć szkiełkiem nakrywkowym.	

Uwaga: Etapy opisane w punktach 8. – 13. mają na celu odwodnienie preparatu. Alkohol absolutny jest silnie higroskopijny, więc należy używać świeżego do każdej serii barwienia. Przenosząc preparat z naczynka do następnego naczynka, należy usunąć nadmiar płynu poprzez dotknięcie dolną krawędzią szkiełka do ligniny (nie pozwolić na wyschnięcie preparatu).

Metodą tą można również barwić materiał z ropni (np. wątroby, płuc) w podejrzeniu inwazji *Entamoeba histolytica*, a także materiał do badań w kierunku inwazji pełzaków amfizoicznych.

Tabela X. Barwienie pierwotniaków jelitowych trichromem.

Odczynniki	
Alkohol etylowy 70% z jodem	
Do 70% alkoholu etylowego dodaje się płyn Lugola w takiej ilości, aby roztwór miał kolor ciemno-czerwony lub ciemnej herbaty.	
Alkohol etylowy 70%	
Trichrom (dostępny komercyjnie) lub:	
Chromotrop 2R	0,6 g
Light Green SF	0,3 g (0,15 g)
(Fast Green FCF)	(0,15 g)
Uwaga: Można użyć tylko 0,3 g Light Green SF bądź mieszaniny dwóch zieleni: 0,15 g Light Green SF i 0,15 g Fast Green FCF.	
Kwas fosforowolframowy	0,7 g
Kwas octowy lodowaty	1,00 ml
Składniki dobrze wymieszać, pozostawić na 15–30 minut, a następnie uzupełnić wodą destylowaną do 100,00 ml.	
Uwaga: Barwnik można przechowywać przez kilka miesięcy lub dłużej.	
Kwaśny alkohol etylowy	
Alkohol etylowy 90%	99,0 ml
Kwas octowy lodowaty	1,0 ml
Alkohol etylowy absolutny	
Ksylene	
Przebieg barwienia	
1. Utrwalony preparat kału umieścić w naczynku z alkoholem etylowym 70% z jodem (płynem Lugola).	5 minut – po utrwalaczu Schaudinna, 15 minut – po PVA
2. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem etylowym 70% – I zmiana.	5 minut
3. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem etylowym 70% – II zmiana.	5 minut
4. Przenieść preparat do naczynka z trichromem.	8–10 minut
5. Przenieść preparat do naczynka z kwaśnym alkoholem etylowym.	10–30 sekund lub do momentu aż tło będzie zielone
6. Zanurzyć kilka razy w naczynku z alkoholem absolutnym – I zmiana.	
7. Przenieść preparat do naczynka z alkoholem absolutnym – II zmiana.	30–60 sekund
8. Zanurzyć kilka razy w naczynku z alkoholem absolutnym – III zmiana (gdy barwi się dużo preparatów).	
9. Przenieść preparat do naczynka z ksylene – I zmiana.	5 minut

Tabela X. cd. Barwienie pierwotniaków jelitowych trichromem.

Przebieg barwienia – c.d.	
10. Przenieść preparat do naczynka z ksylenelem – II zmiana.	5 minut
11. Osuszyć szkiełko i zamknąć preparat, używając medium montującego (np. Cytoseal 60, Histofluid, DPX, Permount lub inne).	

Uwaga: Im dłużej preparat trzyma się w barwniku i alkoholach po barwniku, zwłaszcza w 90%, tym bardziej cytoplazma pasożyta barwi się na zielono, a im krócej, barwi się bardziej na kolor różowy (czerwony). Preparaty oglądać po wysuszeniu balsamu, pod powiększeniem obiektywu 100×.

Etapy opisane w punktach 6.–8. mają na celu odwodnienie preparatu. Alkohol absolutny jest silnie higroskopijny, więc należy używać świeżego do każdej serii barwienia. Przenosząc preparat z naczynka do następnego naczynka, należy usunąć nadmiar płynu poprzez dotknięcie dolnej części szkiełka do ligniny (nie pozwolić na wyschnięcie preparatu). Barwienie tą metodą stosuje się dla świeżego kału (utrwalonego w utrwalczu Schaudinna bezpośrednio przed barwieniem) lub kału utrwalonego w PVA. Można również użyć kału utrwalonego w SAF. Metodą tą można również barwić materiał z ropni (np. wątroby, płuc) w podejrzeniu inwazji *Entamoeba histolytica*, a także materiał do badań w kierunku inwazji pełzaków amfizoicznych.

Tabela XI. Barwienie z zastosowaniem zmodyfikowanej metody Ziehla-Neelsena (wg Wesołowskiej).

Odczynniki
Metanol absolutny
Fuksyna karbolowa
5% kwas siarkowy (VI)
5% wodny roztwór zieleni malachitowej
Przebieg barwienia
1. Na podstawowym szkiełku mikroskopowym wykonać rozmaz z pobranych 1–2 kropli próbki (np. kału biegunkowego). Rozmaz nie może być za gruby.
2. Suszyć w temperaturze 37°C przez 1 godz. lub w temperaturze pokojowej przez 2–3 godz.
3. Utrwalić metanolem absolutnym przez 3 minuty.
4. Barwić fuksyną karbolową przez 20 minut.
5. Spłukać pod bieżącą wodą barwnik, który się nie związał z preparatem.
6. Odbarwić w 5% kwasie siarkowym przez 1 minutę.
7. Spłukać pod bieżącą wodą.
8. Barwić w 5% wodnym roztworze zieleni malachitowej przez 2 minuty.
9. Spłukać pod bieżącą wodą.
10. Suszyć w temperaturze pokojowej.

Tabela XII. Hodowla larw nicieni (metoda Harady-Mori'ego).

Sposób postępowania	
1.	Przygotować paski z bibuły filtracyjnej, szerokości 2–2,5 cm i długości nieco mniejszej niż probówka.
2.	Na dno 10–15 ml ¹⁾ probówki dać około 2–3 ml wody destylowanej.
3.	Paski z bibuły zgiąć wzdłużnie i na około $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{3}$ długości rozetrzeć kał wielkości ziarna fasoli.
4.	Paski z roztartym kałem włożyć do probówki. Kał nie powinien dotykać wody (około 2 cm powyżej). Probówkę można przykryć korkiem z ligniny.
5.	Inkubować w temperaturze 24–28°C przez 7–10 dni ²⁾ . W tym czasie należy uzupełniać wyparowującą wodę. Co drugi dzień pobierać pipetą kroplę wody i oglądać pod małym powiększeniem mikroskopu (obiektyw 10×). W razie wykrycia larw oglądać je pod powiększeniem obiektywu 40×. W celu uzyskania większej liczby larw oraz umożliwienia ich dłuższej obserwacji można założyć hodowlę równolegle w dwóch probówkach i co drugi dzień pobierać materiał naprzemiennie z probówek.

Uwaga: Larwy filariopodobne pojawiające się w hodowli są inwazyjne dla człowieka (zarażenie przez skórę), dlatego należy zachować dużą ostrożność przy wykonywaniu badania. W hodowli *in vitro* larw węgorza jelitowego można niekiedy uzyskać pokolenie wolnożyjące samców i samic produkujących larwy, w takim przypadku liczba larw w hodowli może być znacznie większa od liczby larw wprowadzonych z kałem.

¹⁾ Do hodowli wygodnie jest użyć 50 ml probówki typu Falcon, co pozwala na zastosowanie szerszych pasków bibuły. Probówek nie zamykać szczelnie zakrętką.

²⁾ Po 4 dniach pasek bibuły z roztartym kałem można usunąć.

Tabela XIII. Hodowla pierwotniaków amfizoicznych.

Skład podłoża	
Agar	10 g
Woda destylowana	500 ml
Nystatyna	200 mg
Przygotowanie podłoża	
Po rozpuszczeniu agaru i nystatyny w wodzie i wysterylizowaniu w autoklawie, około 20 ml płynnego agaru wylać na płytki Petriego o średnicy 100 mm, pozostawić do stężenia, po czym wstawić na 2 godz. do ciepłarki (37°C).	
Wykonanie posiewu bakterii	
1. Pobrać jałową, bawełnianą wymazówkę kilka kolonii bakteryjnych <i>Escherichia coli</i> i zawiesić w jałowym roztworze 0,9% NaCl. Zawiesina powinna być homogenna, najlepiej zmierzyć gęstość za pomocą densytometru, powinna ona wynosić 0,5 w skali McFarlanda. 2. Następnie na środek płytki dodać 3–4 krople tej zawiesiny i równomiernie rozprowadzić na całej powierzchni (obracając płytkę w różnych kierunkach, a najlepiej za pomocą gładzeczki laboratoryjnej). 3. Płytki z posianym szczepem bakteryjnym należy przygotować odpowiednio wcześniej (minimum 2 dni), tak aby w chwili otrzymania materiału na badanie mieć już podłoża z równomiernym wzrostem wzorcowego szczepu <i>E. coli</i>.	
Zakładanie hodowli pełzaków	
1. Materiał przeznaczony do badania (np. zeszkrobiny z rogówki, płyn konserwujący do soczewek) posiać na środku płytki lub rozprowadzić równikowo w formie paska. 2. Płytkę z posiewem inkubować w 37°C. 3. Hodowlę przeglądać codziennie (do 10 dni) pod powiększeniem obiektywu 10× w celu obserwowania wzrostu pełzaków, które migrują z miejsca posiewu. Wędrowka pełzaków w podłożu hodowlanym jest widoczna jako podłużne ślady świadczące o fagocytozie bakterii przez ameby (doświadczona osoba może je zaobserwować także okiem nieuzbrojonym).	

Uwaga: W przypadku braku wzrostu pełzaków w czasie do 10 dni, posiew można uznać za ujemny.

Tabela XIV. Wykrywanie larw włośni (*Trichinella* spp.) metodą trawienia sztucznym sokiem żołądkowym.

Skład sztucznego soku żołądkowego	
Roztwór pepsyny	
Woda destylowana	50 ml
Pepsyna	1 g
Roztwór kwasu solnego	
Woda destylowana	50 ml
Kwas solny stężony cz. d. a (36–38%)	0,83 ml
Przygotowanie roztworu roboczego	
Przed użyciem należy zmieszać roztwory pepsyny oraz kwasu solnego.	
Procedura trawienia mięśni	
0,5 g mięśnia wstępnie rozdrobnić, umieścić w kolbce (najlepiej okrągłodennej) z 50 ml sztucznego soku żołądkowego i pozostawić w cieplarni w temp. 37°C na około 18 godz. (w praktyce do następnego dnia). - Po tym czasie zawartość kolby miesza się (w celu rozbicia niestrawionych włókien), a po sedymencie z osadu wykonuje preparat i ogląda pod lupą binokularną lub małym powiększeniem mikroskopu (powiększenie obiektywu 5×).	

PIŚMIENNICTWO

- Kozar Z, Kozar M. Diagnostyka chorób pasożytniczych człowieka. PZWL, Warszawa. 1972.
- Dymowska Z. Zarys parazytologii lekarskiej dla techników analityki medycznej. PZWL, Warszawa. 1985.
- Buczek A. Choroby pasożytnicze: epidemiologia, diagnostyka, objawy. Koliber – Oficyna Wydawnicza Fundacji na Rzecz Zwalczenia Kleszczy i Profilaktyki w Chorobach Odkleszczowych. Lublin, 2010.
- Sastry AS, Bhat S. Laboratory diagnosis of parasitic diseases. In: Bhat S, Sastry AS, (eds.). Essentials of medical parasitology. 2nd ed. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi. 2019: 233–257.
- Basic laboratory methods in medical parasitology [Internet]. World Health Organization; 1991 [cited 2024 Oct 29]. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/40793>.
- Stool Specimens – Staining Procedures [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); [cited 2024 Oct 29]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/staining.html>.
- Clinical laboratory procedures. In: Leventhal R, Cheadle RF, (eds.). Medical parasitology a self-instructional text. 7th ed. F. A. Davis, Philadelphia. 2020.
- Kocięcka W. Włosień kręty i włośnica. Wydawnictwo Volumed, Wrocław. 1996.