



<https://doi.org/10.15407/cryo35.01.033>

УДК 616.993.1: 616-093/-098:579.61

І.І. Кириченко^{1*}, М.С. Бірюков¹, С.І. Похил², О.М. Тимченко²

¹Військово-медичний клінічний центр Північного регіону Міністерства оборони України, м. Харків, Україна

²Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», м. Харків, Україна

* kiricheigor@gmail.com

ВИРОЩУВАННЯ ТА КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КСЕНІЧНИХ КУЛЬТУР *DIENTAMOEBA FRAGILIS* В СЕРЕДОВИЩІ RPMI

Dientamoeba fragilis — один з найпоширеніших кишкових найпростіших паразитів людини і багатьох тварин, здатний викликати гострі та хронічні ураження шлунково-кишкового тракту. Вирощування та збереження культур *D. fragilis* *in vitro* дозволяє вивчити особливості життєвого циклу цих паразитів, їх патогенний потенціал, чутливість до антимікробних препаратів тощо. У роботі вперше вивчено придатність живильного середовища RPMI для вирощування *in vitro* та кріоконсервування ксенічних культур *D. fragilis*. За результатами посіву в RPMI (з 10% термоінактивованої сироватки коня, без антибіотиків) свіжих зразків фекалій від українських військовослужбовців (з підтверженою моноінвазією *D. fragilis*) встановлено, що RPMI є цілком придатним для вирощування як короткострокових, так довгострокових ксенічних культур *D. fragilis*. Профілі росту на RPMI (при 37 оС в мікроаерофільних умовах) різних ізолятів *D. fragilis* є подібними. Культури *D. fragilis*, вирощені на RPMI, є високопридатними для вивчення морфологічної структури клітин цих найпростіших, процесів їх поділу, утворення псевдоподій, формування пре-цист і цист. Найефективніше кріоконсервування трофозоїтів *D. fragilis* досягається в композиції на основі RPMI, що містить ДМСО в кінцевій концентрації 7,0 %. Трофозоїти найменшого розміру (12–15 мкм) є найбільш стійкими до замороження і забезпечують відновлення росту культур *D. fragilis* після їх кріоконсервування.

Ключові слова: *Dientamoeba fragilis*, ксенічні культури, вирощування, кріоконсервування, середовище RPMI.

Термін «*Dientamoeba fragilis*» об'єднує групу кишкових анаеробних одноклітинних найпростіших, ультраструктурно і філогенетично споріднених з трихомонадами та здатними паразитувати у товстому кишківнику людини, ряду диких і свійських тварин [7, 15, 17, 38]. *D. fragilis* — космополітичний паразит, який з частотою від 0,4 до 82,9 % виявляють у калі людей в усьому світі [9, 15, 17, 30]. Повідомляється про інвазії *D. fragilis* як у клінічно здорових осіб, так і у пацієнтів з симптомами ураження шлунково-кишкового тракту [3, 6, 9, 15, 20, 30]. Найчастішими проявами маніфестних *D. fragilis*-інвазій у людей є абдомінальний біль та діарея,

інші симптоми включають нудоту, анорексію, метеоризм, нездужання, втому, втрату ваги, периферичну еозинофілію незрозумілого походження [3, 15, 17, 33]. Більшість дослідників сходяться на думці, що «знехтувану» *D. fragilis* слід розглядати як етіологічний чинник розладів шлунково-кишкового тракту, а симптоматичних пацієнтів необхідно лікувати антимікробними препаратами для зменшення їх страждань та ерадикації паразитів [3, 15, 30, 28, 34]. Однак на сьогодні ще залишаються нез'ясованими багато аспектів життєвого циклу, морфологічної структури, фізіології, генома, протеому, патогенного потенціалу і віру-

Цитування: І.І. Кириченко, М.С. Бірюков, С.І. Похил, О.М. Тимченко. Вирощування та кріоконсервування ксенічних культур *Dientamoeba fragilis* в середовищі RPMI. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2025; (1): 33–45. <https://doi.org/10.15407/cryo35.01.033>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2024. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

лентності *D. fragilis* [5, 13, 17, 18, 30]. Крім того, потребують нагального удосконалення методи лабораторної діагностики та етіотропної терапії дієнтамебіазу [15, 21, 30, 34]. Для вирішення зазначених наукових завдань активно використовуються вирощені *in vitro* культури *D. fragilis* [3, 8, 13, 16, 18, 19, 22, 26, 27, 31].

Основні методичні принципи вирощування *D. fragilis in vitro* полягають в імітації умов організму хазяїна паразитів, а саме: поточні системи культивування *D. fragilis* є ксенічними, диксеновими та рідко моноксеновими (паразитів вирощують сумісно з облигатно-необхідними симбіотичними бактеріями); умови анаеробіозу, які потрібні для життєдіяльності цих кишкових найпростіших, підтримують на усіх етапах їх культивування (посів досліджуваного матеріалу, первинних культур і субкультур паразитів здійснюють у відновлене середовище, а їх інкубування проводять у мікроаерофільній або анаеробній атмосфері з концентрацією O_2 6 % і нижче); температура інкубування 37–42 °C забезпечує високі показники росту трофозоїтів *D. fragilis* у культурах (в умовах більш високої температури розмноження паразитів є інтенсивнішим ніж за нижчої, а при 30 °C і нижче їх ріст не відбувається); застосовувані для культивування *D. fragilis* живильні середовища (ЖС) повинні одночасно задовольняти фізіологічні (пластичні та енергетичні) потреби як самих паразитів, так і бактерій-симбіонтів (це досягається введенням до складу ЖС сироваток з факторами росту, мінералів, амінокислот, вітамінів, мікроелементів, енергетичних вуглеводів, буферних систем тощо) [2, 4, 11, 16, 25, 30]. Для тривалого підтримання вирощених культур *D. fragilis* застосовуються методи їх повторного субкультивування або заморожування за температур від –20 до –196 °C з використанням кріопротекторів, таких як гліцерин, диметилсульфоксид (ДМСО), сахароза, глюкоза [4, 24, 29]. Основою композиції для кріоконсервування *D. fragilis* зазвичай слугують фосфатно-сольовий буфер та рідкі ЖС, у яких вирощувалися культури паразитів. Зрозуміло, що відмінність властивостей використовуваних ЖС потребує адаптації методу кріоконсервування: підбору типу і концентрації кріопротектора, оптимізації процедур урівноваження, охолодження, розморожування тощо.

За майже 100-річний досвід вирощування *D. fragilis* було використано широкий спектр методів та засобів культивування, які включали ЖС Боека та Дрбоглава, Робінсона, Добелла і Лейдлоу, Леффлера, Баламута, М 199, ТУГМ-9, а також середовища для вирощування трихомонад (Trichosel Broth і Tritrichomonas fetus medium) та інші [2, 3, 8, 11, 13, 16, 18, 22, 30]. З метою вирощування культур *D. fragilis* науковці відносно частіше віддають перевагу середовищу Леффлера і його модифікаціям за Барратта чи Мунасінгхе [4, 11, 16, 18, 19, 25–27, 30, 31]. Через неналагодженість промислового виробництва ці типи ЖС виготовляються у лабораторіях самими дослідниками. Технологія виготовлення таких ЖС є складною та працевитратною, а їх склад багатокomпонентним і варіативним залежно від конкретної авторської модифікації, що зумовлює суттєві відмінності ростових якостей середовищ, використовуваних під час культивування *D. fragilis* у різних лабораторіях. Крім того, зазначені ЖС не є універсально придатними для вирощування інших видів кишкових протозойних паразитів [2, 11]. Широкодоступне комерційне рідке живильне середовище RPMI (аббревіатура повної назви «Roswell Park Memorial Institute medium 1640») нещодавно було з успіхом використане для культивування глобально поширених збудників бластоцистозу (*Blastocystis sp.*) і лямбліозу (*Giardia spp.*) [14, 39]. Це показало потенційну можливість культивування в живильному середовищі RPMI інших видів кишкових протозойних паразитів, зокрема *D. fragilis*.

Метою дослідження було вивчення придатності середовища RPMI для вирощування *in vitro* та кріоконсервування ксенічних культур *D. fragilis*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для виявлення кишкових паразитів було виконано (з лютого по листопад 2023 р.) мікроскопічні дослідження 302 зразків фекалій від військовослужбовців, які отримували стаціонарну медичну допомогу у Військово-медичному клінічному центрі Північного регіону Міністерства оборони України. Кожен зразок був сумішшю в контейнері трьох порції калу, відібраних через добу і фіксованих 10%-м розчином формаліну. Зразки фекалій були збагачені методом

формалін-етилацетатної седиментації (з режимом центрифугування 500 g тривалістю 5 хв) і досліджені шляхом мікроскопії вологих мазків, забарвлених йодним розчином Д'Антоні (DAIS), та фіксованих мазків, перманентно забарвлених трихромом за модифікацією Вітлі, (mWT) або залізним гематоксилином за Гейденгайном (НІН), а також модифікованим кислотним методом за Цілем-Нільсеном (mZN) [10, 12].

Матеріалом для вирощування культур *D. fragilis* слугували повторно відібрані свіжі зразки фекалій від тих військовослужбовців, у яких за результатом попереднього мікроскопічного дослідження було виявлено моноінвазію *D. fragilis*. Для встановлення здатності *D. fragilis* до первинного росту на живильне середовище RPMI 1640 (Biosera Inc., Франція) з доданою (10 % об./об.) термоінактивованою (при 56 оС впродовж 30 хв) сироваткою коня (Biosera Inc., Франція) без антибіотиків (далі — RPMI) 100 мкл гомогенату фекалій у фосфатно-сольовому буфері з рН = 7,2 (1:1 об./об.) висівали у пробірці для культивування тканин 16 × 120 мм з вентиляційною гвинтовою кришкою (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцарія), що містили 3,0 мл зазначеного середовища. Культивування посівів проводили упродовж 5 діб при 37 °С у мікроаерофільних умовах в анаеростаті лабораторному “ANS1” (1-CUBE Ltd., Чехія; залишковий тиск повітря 50,7 кПа, парціальний тиск O₂ близько 10,6 кПа). Стабілізовані (довгострокові) ксенічні культури *D. fragilis* були отримані з первинних культур паразитів після десяти послідовних пересівів (200 мкл інокулята) у новій порції RPMI. Крім того, з суспензій первинних культур *D. fragilis* загальноприйнятими бактеріологічними методами було отримано автентичні для кожного ізоляту найпростіших штами *Escherichia coli*. Одно- або дводобові культури останніх у м'ясо-пептонному бульйоні слугували донором грамнегативних симбіонтних бактерій для підтримання росту *D. fragilis* у випадках, коли це було потрібно (пояснено нижче).

Закономірності росту на RPMI вивчено на п'яти довільно відібраних клінічних ізолятах *D. fragilis* (які означено порядковими номерами від 1 до 5 відповідно) і охарактеризовано за показниками: часу генерації клітин паразитів (Tg) у годинах; максимальної концентрації їх життєздатних клітин (MCVC) у мілілітрі (мл) середовища; пікової доби (тобто часу у днях) досяг-

нення MCVC у культурах паразитів (PTD); придатності вирощених культур для вивчення морфологічної структури клітин найпростіших (SSCM); придатності ЖС для удосконалення (спрощення) техніки вирощування культур *D. fragilis* (STGC). Визначення показників Tg, MCVC і PTD ґрунтувалось на результатах підрахунку кількості життєздатних клітин *D. fragilis* у мікрооб'ємах суспензії їх культур. Фактичні значення MCVC і PTD є емпіричними даними, а значення Tg вираховували за формулою:

$$Tg = (T_2 - T_1) / (\log_2(n/n_1)),$$

де n_1 — концентрація клітин на попередньому етапі культивування паразитів (на час T_1), а n_2 — концентрація клітин на наступному етапі їх культивування (на час T_2).

У наших дослідженнях для кожної культури *D. fragilis* ($T_2 - T_1$) = 24 години. Кількість життєздатних клітин *D. fragilis* в усіх пробірках визначали відразу після висіву та щодобово упродовж п'яти діб (24, 48, 72, 96 та 120 годин), що пов'язано з виразним зниженням на четвертій добі концентрації паразитів під час їх вирощування в середовищі RPMI (власні спостереження). Підрахунок клітин *D. fragilis* проводили в гемоцитометрі з застосуванням тесту на виключення барвника трипанового синього, який відтворювали за основним протоколом [32] з тією відмінністю, що відмивання клітин від сироватки ЖС здійснювали методом центрифугування при 500 g протягом 5 хв. Використано такі техніки підрахунку клітин *D. fragilis* та критерії оцінки їх життєздатності: кожену процедуру підрахунку паралельно виконано у двох гемоцитометрах двома різними фахівцями при світловій мікроскопії із сумарним збільшенням ×200; клітини забарвлені у синій колір вважали нежиттєздатним, а незабарвлені (інтактні) — життєздатними; клітини з невизначеним статусом за критерієм забарвлення підлягали мікроскопії при збільшенні ×400 для встановлення ознак їх деструкції (руйнування клітинної стінки та внутрішньої структури), клітини без ознак деструкції відносили до життєздатних (рис. 1). Якісний показник SSCM оцінено за придатністю вирощених на RPMI культур *D. fragilis* для візуалізації в умовах світлової мікроскопії (при збільшенні ×400) морфологічної структури клітин найпростіших на різних стадіях росту, процесів їх поділу, утворення псевдоподій, пре-цист, цист тощо. Оцінку якісного

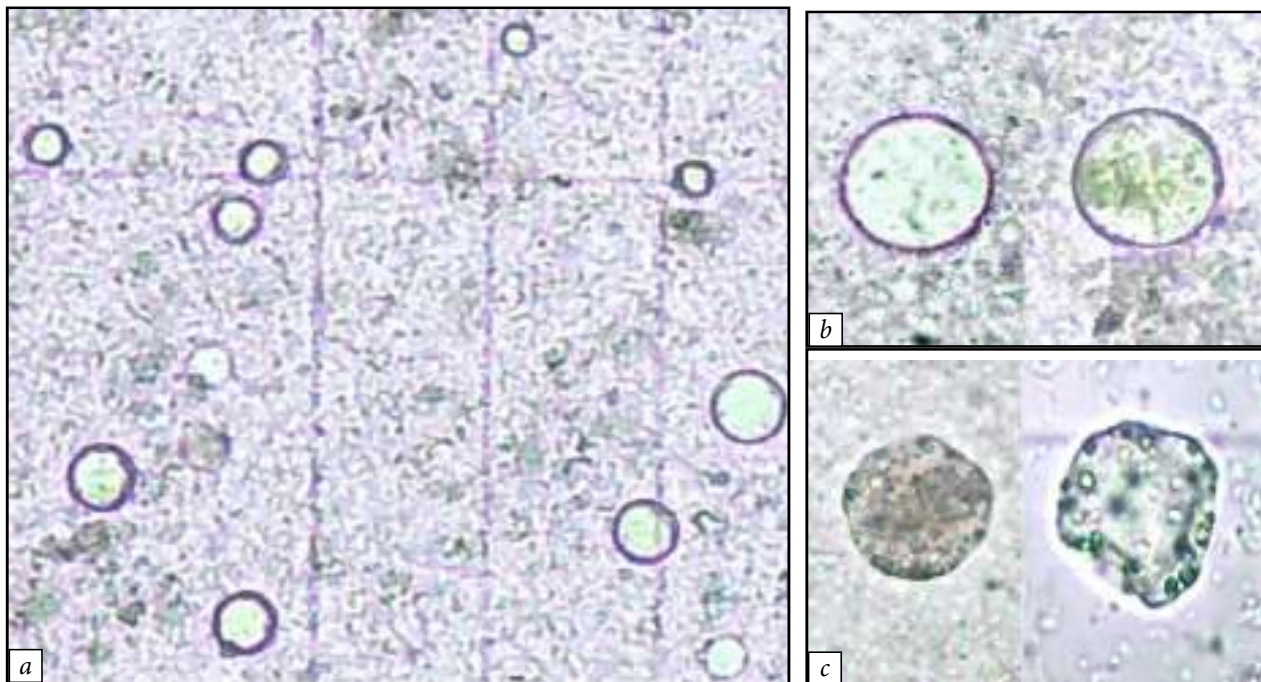


Рис. 1. Підрахунок клітин *D. fragilis* у гемоцитометрі з застосуванням тесту на виключення барвника трипанового синього: *a* — приклад визначення загальної концентрації клітин у суспензії; *b* — приклад візуалізації живих клітин; *c* — приклад візуалізації мертвих клітин

показника STGC проведено на основі результатів експериментів вирощування (у RPMI) первинних і стабілізованих культур *D. fragilis* у звичайних бактеріологічних пробірках (15,3 × 120 мм, ватно-марлева пробка) під шаром стерильного вазелінового масла (ПрАТ Фармацевтична фабрика «Віола», Україна) (висотою 5–7 мм), а також у пробірках «Eppendorf» (F. L. Medical, Італія) об'ємом 1,5 мл (особливість посіву: загальний об'єм суспензії у пробірці близько 1,6 мл; під герметично закритою кришкою шар повітря 3–4 мм; під час інкубування пробірки з посівами не перевертали, щоб уникнути насичення культур паразитів залишковим повітрям).

Під час розробки методу криоконсервування в RPMI використано три ізоляти *D. fragilis* (з номерами 1, 2 і 3). Кожний ізолят у шести пробірках з 5 мл RPMI було вирощено до досягнення MCVC. Культури одного і того ж ізоляту переносили у конічні центрифужні пробірки об'ємом 50 мл (SPL Life Sciences Co., Ltd., Корея) та перемішували (шляхом перевертання пробірок) для отримання однорідної клітинної суспензії. У об'єднаних суспензіях проводили підрахунок клітин *D. fragilis*, як описано раніше. У суспензіях ізолятів *D. fragilis* 1, 2 і 3 концентра-

ція становила $5,7 \times 10^5$ трофозоїтів / мл, $3,8 \times 10^5$ трофозоїтів / мл та $4,4 \times 10^5$ трофозоїтів / мл. Після повторного перемішування по 5 мл суспензії переносили у ті ж самі 6 пробірок, у яких вирощувались ізоляти паразитів. Пробірки центрифугували при 500 g протягом 5 хв. Супернатант відкидали, а до осаду в п'яти пробірках додавали по 5 мл одного з п'яти варіантів композицій для криоконсервування (від «compositions for cryopreservation», CC), попередньо виготовлених на основі RPMI. До складу усіх CC входила D-глюкоза (Sigma-Aldrich Co., Німеччина) в кінцевій концентрації 2,5 % (мас. / об.). Варіанти CC1-4 відрізнялись вмістом ДМСО (Labscan Ltd., Ірландія) з кінцевою концентрацією цього інгредієнта 1,0, 3,0, 5,0 і 7,0 % (об. / об.) відповідно. Склад CC5 поряд з 2,5 % D-глюкози і 3,0 % ДМСО включав альгінат натрію (BOC Sciences, США) у формі гелю з кінцевою концентрацією 1,0 % (мас. / об.). Шості пробірки з осадом клітин кожного ізоляту *D. fragilis*, в які було додано 5 мл RPMI без інших домішок, слугували контролем. Після ретельного перемішування осаду з внесеним CC/RPMI (шляхом декількаразового набирання і випускання матеріалу піпеткою), по 500 мкл однорідної суспензії розливали у криопробірки об'ємом

1,5 мл (Simport Scientific Co., Канада). Для кріоконсервування кожного ізоляту *D. fragilis* було виготовлено 55 зразків: по 10 — для кожного варіанту СС1-5 та 5 — контрольних з RPMI.

У переважній більшості експериментів врівноваження проведено за температури 37 °C впродовж 15–20 хв, вибіркові дослідження виконано без процедури врівноваження.

Автори дослідження не мали обладнання для заморожування з контрольованою швидкістю охолодження, тому при виконанні досліджень було апробовано шість варіантів одно-, дво- і триетапного охолодження зразків (кріопробірок з ізолятами *D. fragilis*). Варіанти одноетапного охолодження зразків включали: швидке охолодження до –196 °C шляхом занурення в рідкий азот у посудині Дьюара «Х-34 БМ» (ТОВ «Харківський завод транспортного устаткування», Україна), нерегульоване охолодження до –70 °C в низькотемпературній камері «МЕДТЕРМ КНТ-50-85» (ТОВ «ФІРМА «МЕДТЕРМ», Україна) та до –20 °C у морозильній камері холодильника «LIEBHERR CP 4003 210» (LIEBHERR Company Ltd., Німеччина). У двоетапних варіантах охолодження зразки заморожені до –70°C через 12 годин занурювали у рідкий азот, а зразки заморожені до –20°C — переносили в умови температури –70 °C. Триетапне охолодження зразків полягало у послідовному через 12 годин зниженні температури їх зберігання: –20, –70 і –196 °C відповідно. Вживаність *D. fragilis* перевіряли через 10 діб для усіх варіантів кріоконсервування, а також через 1 і 3 місяці для зразків, що зберігались при –20 та –70 °C.

Відігрівання заморожених зразків проведено на водяній бані при 37°C впродовж 3–4 хв. Розморожені суспензії *D. fragilis* один раз відмивали від СС. Для цього до суспензій додавали 1,0 мл RPMI, перемішували (шляхом перевертання закритих кріопробірок) до їх рівномірності, далі центрифугували при 500 g протягом 5 хв. Супернатант видаляли, а відмитий осад ретельно розбавляли 500 мкл RPMI. Краплю (50 мкл) гомогенної суспензії використовували для підрахунку в гемоцитометрі життєздатних клітин *D. fragilis*, а залишок (близько 450 мкл) висівали у 3,0 мл RPMI. Вирощування в RPMI культур паразитів після кріоконсервування проводили як описано раніше. Наявність росту ізолятів *D. fragilis* у посівах оцінювали через 24 і 48 годин, критеріями росту слугувало

збільшення загальної кількості клітин найпростіших, візуалізація стадій їх поділу та рухливих трофозоїтів з псевдоподіями.

Усі мікроскопічні дослідження проведено на світловому мікроскопі «МІКРОмед» Evolution ES-4130 з комплектом компенсаційних окулярів, планових хроматичних об'єктів та універсальної відеокамери «MDC-500» для обробки зображень на комп'ютері (ТОВ «ТД «Мікромед», Україна).

Статистичну обробку отриманих даних виконано за допомогою ліцензійного програмного пакету «StatSoft STATISTICA 10.0» (StatSoft Inc., США), серійний номер AGFR205F354521FA-5. Обрахунку і статистичному порівнянню (з використанням парного t-критерію підлягали абсолютні (абс. ч.) та відносні значення (%) числових показників, а також середні величини (χ) з стандартним відхиленням (σ) для груп однотипних даних. Відмінність порівнюваних величин вважали статистично значущою за умови $p < 0,05$. Ід час аналізу якісних показників використовували описовий метод.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

За результатами мікроскопічних досліджень 302 зразків фекалій від військовослужбовців Північного регіону України встановлено, що рівень поширеності серед них кишкових паразитів сягає 10,6 %. Усі 39 паразитів, які було виявлено у 32 військовослужбовців, є відомими одноклітинними найпростішими інтестинального тракту людей і тварин. Загалом *D. fragilis* було ідентифіковано у 14 (4,6%) військовослужбовців, а у формі моноінвазії у 8 (2,6%) осіб. Спектр інших видів паразитів і частоту спричинених ними інвазій серед українських військовослужбовців представлено у роботі І.І. Кугученко та співавт. [23].

Наскільки авторам відомо, це перше дослідження придатності середовища RPMI для вирощування *in vitro* та кріоконсервування ксенічних культур *D. fragilis*.

Після висіву у RPMI восьми свіжих зразків фекалій від військовослужбовців з моноінвазією *D. fragilis* пишній ріст первинних культур паразитів спостерігали у 100% випадків. Первинні культури *D. fragilis* не були контамовані іншими найпростішими. При дотриманні належних умов вирощування субкультури

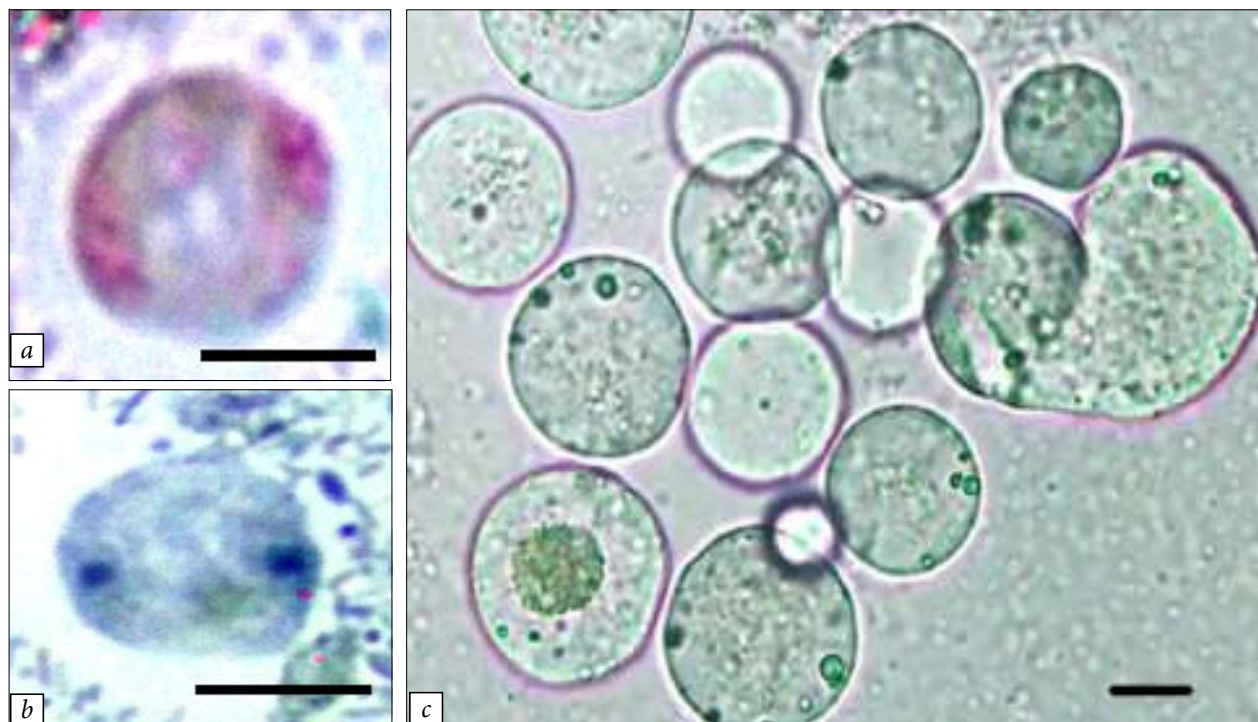


Рис. 2. Мікрофотографії трофозоїтів *D. fragilis*: а та б — у мазках калу, забарвлених mWT та НІН відповідно; в — у роздавленій краплі стабілізованої культури, вирощеної на RPMI; референтна мітка 10 мкм

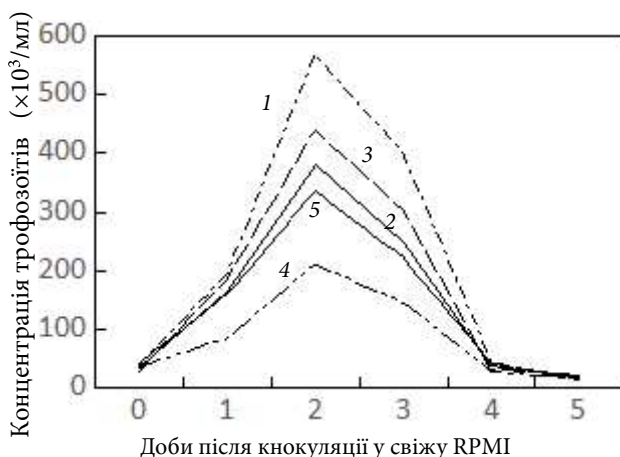


Рис. 3 Профілі росту п'яти ізолятів *D. fragilis* на RPMI: 1 — ізолят 1, 2 — ізолят 2, 3 — ізолят 3, 4 — ізолят 4, 5 — ізолят 5

D. fragilis зберігали цілком задовільну пермисивність, що дозволяло легко отримувати стабілізовані ксенічні культури для усіх ізолятів *D. fragilis* (рис. 2).

Профілі росту на RPMI у вивчених ізолятів 1–5 *D. fragilis* були подібними, а певна відмінність між ізолятами паразитів в однакові терміни росту стосувалась лише концентрацій трофозоїтів (рис. 3). Така відмінність концентрацій трофозоїтів у вирощених культурах *D. fragilis*

може сягати статистичної значущості, що встановлено для ізолятів 1 і 4 ($p < 0,05$).

Закономірність зміни показника Tg на етапах росту ізолятів 1–5 *D. fragilis* у RPMI були однаковими і не залежали від вихідної концентрації трофозоїтів у використаних інокулятах. За цих обставин урівноважене значення Tg становило $11,5 \pm 1,2$, $8,1 \pm 0,6$, $9,3 \pm 0,7$ та $21,1 \pm 2,9$ годин на першій, другій, третій та четвертій добі культивування ізолятів паразитів відповідно. Величина MCVC у стабілізованих культурах *D. fragilis* коливалась у межах від $5,7 \times 10^5$ трофозоїтів / мл (ізолят 1) до $2,1 \times 10^5$ трофозоїтів / мл (ізолят 4), а урівноважене значення цього показника (розрахованого для усіх вивчених ізолятів) сягало $(3,9 \pm 1,8) \times 10^5$ трофозоїтів / мл. Фактичним значенням РТД (з досягненням MCVC) для усіх ізолятів *D. fragilis* є друга доба їх культивування. Таким чином, враховуючи дані профілів росту і показників Tg, MCVC, РТД, можна констатувати, що під час вирощування культур *D. fragilis* на RPMI перша доба є фазою адаптації і початку росту паразитів, друга — фазою їх експоненційного розмноження, третя — фазою стаціонарного росту і початку загибелі трофозоїтів, а четверта — фазою їх експоненційного відмирання.

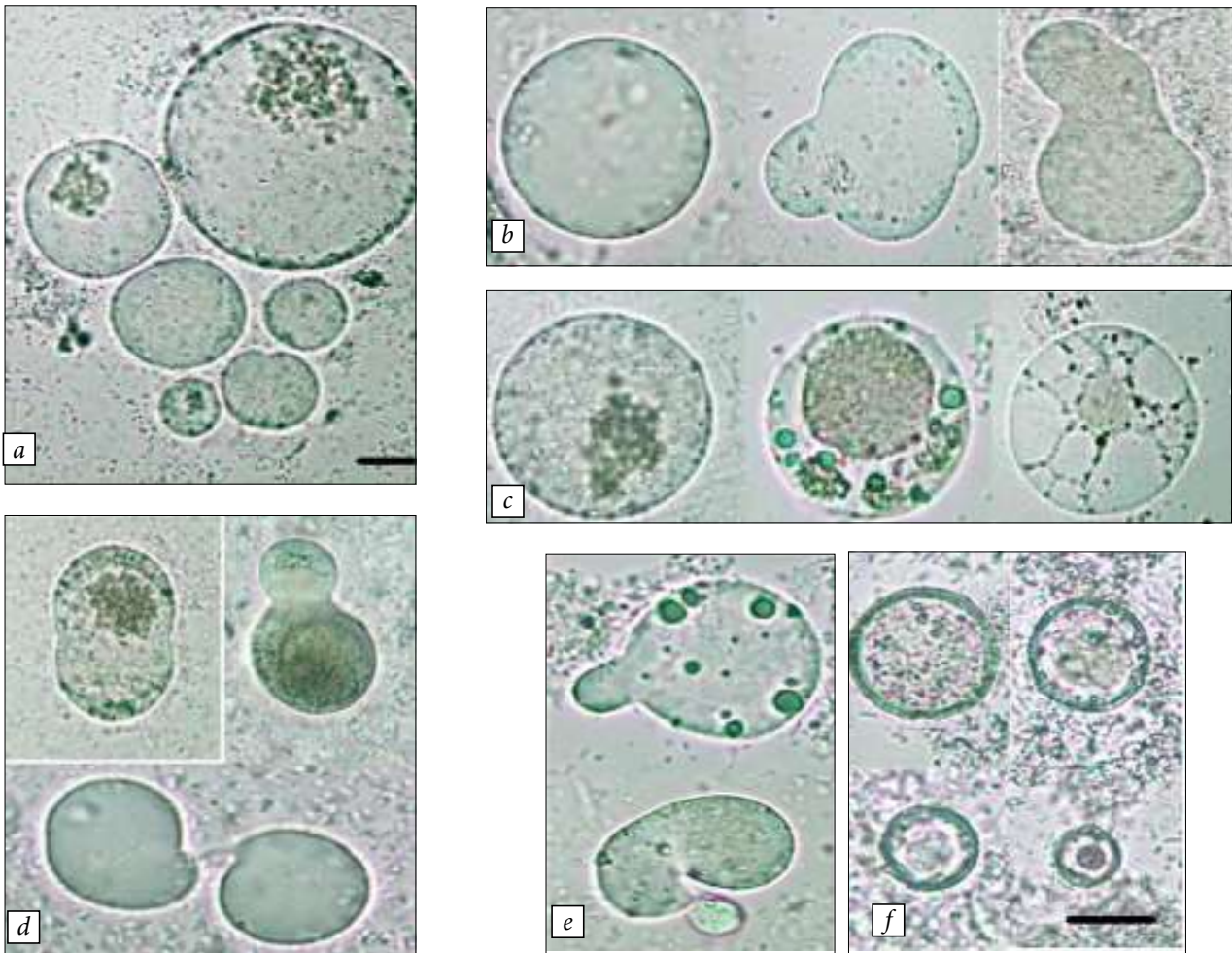


Рис. 4. Мікрофотографії клітин *D. fragilis* у роздавленій краплі культур, вирощених на RPMI, з прикладами: розміру трофозоїтів (а); форми трофозоїтів (б); структури трофозоїтів (в); стадій поділу трофозоїтів (г); утворення псевдоподій у трофозоїтів (д); етапів формування цист (е); референтна мітка 10 мкм

Встановлені авторами закономірності росту культур *D. fragilis* у RPMI є подібними до динаміки росту цих найпростіших на модифікованих ЖС Боека і Дрбоглава, Леффлера, Робінсона та TYGM-9 [4, 25]. Проте, на думку авторів, використання RPMI для культивування *D. fragilis* має ряд переваг порівняно з зазначеними ЖС. Насамперед, виготовлення RPMI для такої мети є технічно простим і швидким, а ростові якості середовища є більш валідними з огляду на комерційне виробництво потрібних компонентів. Крім того, в RPMI досягається пишний ріст трофозоїтів *D. fragilis* без рисового крохмалю, який зазвичай додають до складу середовищ (2–25 мкг для однієї культури паразитів) як енергетичні вуглеводи [4, 11, 22, 26, 29]. Трофозоїти з проковтнутими зернами крохмалю слугують додатковою ідентифікаційною ознакою *D. fragilis*, але в той самий

час зерна крохмалю спричиняють мутність середовища та екранують елементи внутрішньої структури клітин паразитів. На противагу прозорість RPMI забезпечує їй високий рейтинг за показником SSCM. У культурах *D. fragilis*, вирощених на RPMI, чітко візуалізується розмір (12–65 мкм), форма (сферична, амeboїдна, неправильна) та структура трофозоїтів (оболонка клітин, периферична і центральна цитоплазма, внутрішні гранули, вакуолі, філаменти тощо), а також стадії їх поділу, утворення псевдоподій, формування пре-цист і цист у старіючих культурах паразитів (рис. 4).

Якісний показник STGC оцінено з двома рейтинговими значеннями: помірної і високої придатності RPMI для вирощування культур *D. fragilis* у бактеріологічних пробірках під шаром вазелінового масла (ПрАТ Фармацевтична фабрика «Віола», Україна) та пробірках «Erpen-

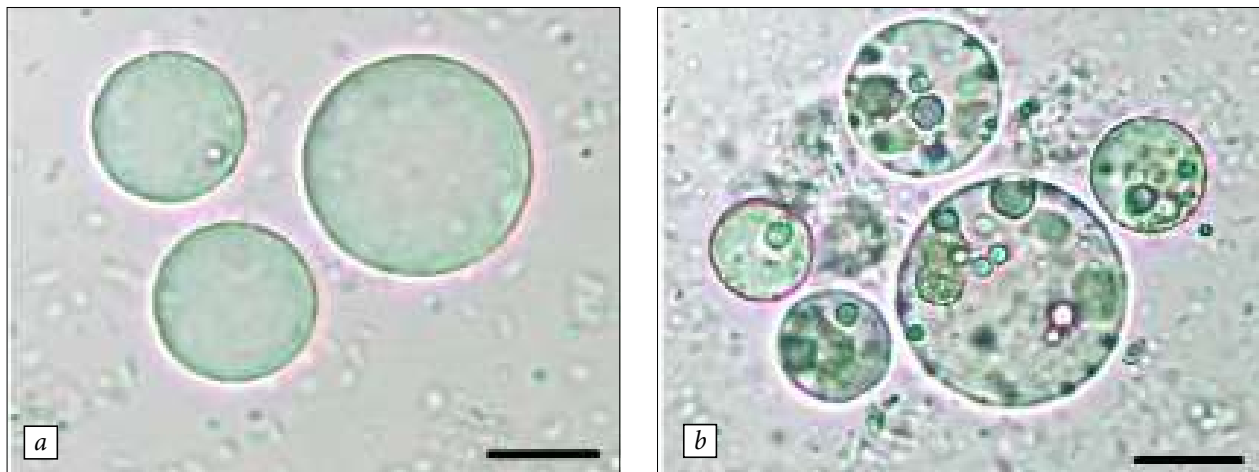


Рис. 5. Мікрофотографії трофозоїтів *D. fragilis* після процедури врівноваження: у зразках з С1-С4 (а); у зразку з СС5 (б); референтна мітка 10 мкм

dorf» (F. L. Medical) з малим об'ємом залишкового повітря відповідно.

У пробірках під шаром масла спостерігали пишний ріст усіх первинних культур *D. fragilis*. Проте, субкультури трофозоїтів відмирили через 3 (ізолят 4) або 4 пасажі (ізоляти 1, 2, 3 і 5). Тобто спосіб вирощування *D. fragilis* у бактеріологічних пробірках під шаром вазелінового масла є достатньо придатним для отримання короткострокових культур паразитів. Підтримувати ж ріст довгострокових субкультур трофозоїтів під маслом вдавалось шляхом збагачення інокулятив автентичними штамами *E. coli*. Для цього 100 мкл одно або дводобових бульйонних культур бактерій додавали до 3 мл RPMI на кожному наступному пасажі трофозоїтів, починаючи з третього-четвертого для конкретних ізолятів *D. fragilis*. Результати досліджень підтверджують висновок R. Gough та співавт. [16] про визначальну роль грамнегативних ентеробактерій, як облігатно необхідних симбіонтів, що забезпечують ріст культур *D. fragilis in vitro*.

Спосіб вирощування паразитів у пробірках «Eppendorf» (F. L. Medical) виявився більш ефективним, менш затратним і технічно простим. Цим способом було отримано як короткострокові, так і довгострокові культури трофозоїтів усіх ізолятів *D. fragilis* без процедури додаткового внесення симбіонтних бактерій. Економічна вигідність зазначеного способу обумовлена відносно низькою вартістю пробірок «Eppendorf» (F. L. Medical) та зменшенням (майже у 2 рази) об'ємів використаної RPMI. А про-

ста техніка пересіву субкультур *D. fragilis* полягала у видаленні (на другій добі культивування) з пробірки суспензії до осаду, в якому знаходиться переважна більшість трофозоїтів і симбіонтної мікрофлори, та внесенні потрібного об'єму свіжої RPMI (випускання середовища у пробірку забезпечує бажане перемішування осаду). Практична доступність способу вирощування *D. fragilis* у пробірках «Eppendorf» (F. L. Medical) обґрунтовує перспективність його використання для лабораторної діагностики дієнтамебіазу, вивчення чутливості ізолятів збудника до протипаразитарних засобів та оцінки ефективності ерадикації паразитів після проведеної етіотропної терапії.

Фрагмент роботи щодо розробки методу криоконсервування *D. fragilis* у RPMI був найбільш працезатратним з великим обсягом отриманих експериментальних даних.

Основні результати досліджень, що характеризують ефективність криоконсервування трофозоїтів *D. fragilis* в RPMI полягають у наступному. Використана процедура врівноваження (15–20 хв за температури 37 °С) є необхідною і достатньою за тривалістю. Її відтворення (порівняно з даними досліджень без неї) збільшувало у $4,5 \pm 1,3$ рази виживання трофозоїтів *D. fragilis* у суспензіях ізолятів 1, 2 і 3, криоконсервованих з СС2-4 в умовах одноетапного заморожування до -20 та до -70 °С ($p < 0,05$). По завершенню врівноваження не було виявлено ознак деструкції трофозоїтів в усіх суспензіях, оброблених СС1-4 (рис. 5а). Тобто, короткострокова дія концентрацій ДМСО від 1,0 до 7,0%

при 37 °С не спричинює значимого зниження життєздатності *D. fragilis* у RPM1. Навпаки, в усіх зразках, оброблених СС5, спостерігали надмірну грануляцію і вакуолізацію трофозоїтів (рис. 5б).

Незалежно від складу використаних СС, усі зразки, які були одноетапно швидко охолоджені до -196 °С, після розмороження, відмивання і висіву не відновили ріст у RPM1 (табл. 1). Мікроскопічно у таких зразках візуалізовано тотальне руйнування трофозоїтів, що, ймовірно, пов'язано з відомою тендітністю їх зовнішньої оболонки та надмірно інтенсивним утворенням кристалів льоду в клітинах паразитів. Після будь-якого іншого варіанту заморожування в усіх зразках, що містили СС1 і СС5, теж не вдалося відновити ріст культур *D. fragilis*. Очевидно, що 1,0 % ДМСО взагалі є недостатньою концентрацією цього кріопротектора як

у складі СС1, так і в композиціях з іншою основою, використаною для кріоконсервування *D. fragilis* [4]. Якщо під час мікроскопії в розморожених зразках з СС1 автори виявляли лише зруйновані трофозоїти, то у зразках з СС5 останні зберігали цілісність зовнішньої оболонки, яка запобігала потраплянню в клітини трипанового синього при виконанні тестів з цим барвником. Такий непередбачуваний дисонантний результат кріоконсервування культур паразитів у СС5 на тлі певного успіху відновлення їх росту у частині зразків з СС2 (склад якої теж містив 3,0 % ДМСО, а відрізнявся від попередньої лише відсутністю 1,0 % альгінату натрію) спонукав авторів виконати додаткові дослідження для з'ясування впливу альгінату натрію на ріст *D. fragilis*.

Слід зазначити, що в останні роки вітчизняні й закордонні науковці показали корисність

Таблиця 1. Ріст культур *D. fragilis* після їх кріоконсервування з різними режимами охолодження і варіантами СС1-5

Термін оцінки результату після кріоконсервування	Режим охолодження	Варіанти СС				
		СС1	СС2	СС3	СС4	СС5
10 діб	Одноетапний до -20 °С	-	+	+	+	-
1 місяць		-	-	×	+	-
3 місяці		-	-	-	×	-
10 діб	Одноетапний до -70 °С	-		+	+	-
1 місяць		-		×	+	-
3 місяці		-		×	+	-
10 діб	Одноетапний до -196 °С	-			-	-
10 діб		-		+	+	-
1 місяць		-		+	+	-
3 місяці	Двоетапний до -20 °С / -70 °С	-		×	+	-
10 діб		-		×	+	-
10 діб		-		+	+	-
10 діб	Триетапний до -20 / -70 / -196 °С	-		+	+	-

Ріст отримано в усіх (+), не в усіх (-) зразках з різними ізолятами *D. fragilis*, (×) — ріст отримано лише в частині зразків з однотипним варіантом СС без врахування відмінностей росту конкретних ізолятів *D. fragilis*.

введення альгінату натрію до складу СС для підвищення ефективності кріоконсервування різних типів еукаріотичних клітин (*Saccharomycetes* spp., ендотеліоцитів) [35, 37]. Авторами дослідження ж встановлено, що додавання альгінату (до кінцевої концентрації від 0,2 до 2,0 %) у RPMI негативно впливає на ріст *D. fragilis*. Впродовж першої доби культивування за присутності альгінату мікроскопічно виявляли: надмірну грануляцію і вакуолізацію трофозоїтів (рис. 5б), припинення їх проліферації і утворення псевдоподій, виразне зниження рухливості зовнішніх і проковтнутих симбіонтних бактерій, збільшення товщини зовнішньої оболонки клітин *D. fragilis* (рис. 4д). У наступні дві доби відбувається (більш ранне та інтенсивніше ніж у контролі) утворення пре-цист і цист паразитів (рис. 4е). На сьогодні недостатньо даних для чіткого пояснення механізму впливу альгінату натрію на пригнічення росту *D. fragilis*. Автори не виявили публікацій щодо прямої антипротозойної дії альгінату натрію на *D. fragilis* чи на інші види кишкових найпростіших. Поряд з цим вже широко відомою є антибактерійна активність гідрогелів альгінату у комбінаціях з різними її підсилювачами [36], а також безпосередня бактерицидна (помірна) дія альгінату натрію на *E. coli* [1]. Більш того,

збільшення в'язкості RPMI з 1,0% гелю альгінату (до близько 0,02 Па·с) знижує рухливість трофозоїтів *D. fragilis* та активність поглинання ними потрібних для виживання симбіонтних бактерій. Яким би не був механізм пригнічення росту *D. fragilis* альгінатом натрію, його наслідки виявились незворотними. Хоча після дії альгінату клітини паразитів зберігали цілісність впродовж усього періоду спостереження (5 діб) їх ріст не вдалося відновити у свіжому RPMI ні за умов одно- чи дворазового відмивання від залишків альгінату (ретельно виконаного у різні терміни), а ні за умов збагачення середовища глюкозою (2,5 і 5,0%) та / або бульйонними культурами симбіонтних *E. coli* (100 мкл і 200 мкл на один посів).

Результати росту культур *D. fragilis* після різних варіантів кріоконсервування з використаними СС1-5 представлено у табл. 1, дані якої окреслюють загальну тенденцію збільшення частоти отримання росту під час зростання концентрації ДМСО у варіанті СС.

За сумарною результативністю відновлення росту у RPMI усіх трьох ізолятів *D. fragilis* після їх кріоконсервування з різними режимами охолодження відносно більш ефективним визнано СС4 ($p < 0,05$). Тобто, серед досліджених концентрацій ДМСО у складі СС2-4 оптимальною

Таблиця 2. Показники життєздатності трофозоїтів *D. fragilis* у СС1-5 після їх заморожування за різних режимів охолодження

Режим охолодження	Вживаність трофозоїтів <i>D. fragilis</i> у % від контролю (розмір клітин у мкм)*				
	СС1	СС2	СС3	СС4	СС5
Одноетапний до -20 °С	0	16.0 ± 8.5 (12-28)	23.5 ± 11.0 (12-35)	54.0 ± 12.5 (12-45)	0
Одноетапний до -196 °С	0	0	0	0	0
Одноетапний до -70 °С	0	54.0 ± 12.5 (12-45)	11.8 ± 6.0 (12-18)	18.9 ± 7.5 (12-18)	0
Двоетапний до -20 / -70 °С	0	2.5 ± 1.0 (12-18)	17.5 ± 7.5 (12-22)	27.5 ± 11.0 (12-26)	0
Двоетапний до -70 / -196 °С	0	0	8.4 ± 5.5 (12-15)	15.8 ± 7.2 (12-15)	0
Триетапний до -20 / -70 / -196 °С	0	0	10.9 ± 6.5 (12-15)	20.1 ± 7.5 (12-15)	0

* — вживаність трофозоїтів *D. fragilis* через 10 діб після кріоконсервування.

є 7,0%. Використання СС4 з цією концентрацією ДМСО дозволяє зберегти здатність до росту культур *D. fragilis* щонайменше місяць у зразках, заморожених до -20 , -70 і -196 °C (див. табл. 1). Ці результати досліджень є близькими до даних N. Sawangjaroen та співавт. [29], які повідомили про успішне кріоконсервування трофозоїтів *D. fragilis* при кінцевій концентрації ДМСО 7,5 %. Навпаки, результати авторів дослідження не узгоджуються з висновком J.L. Barratt та співавт. [4], де 1,375 % ДМСО визнано його оптимальною концентрацією для кріоконсервування більшості ізолятів *D. fragilis*.

Зазвичай оцінка ефективності запропонованого методу кріоконсервування *D. fragilis* (як і багатьох інших видів найпростіших) обмежується критерієм отримання росту їх культур після розморожування [4, 24, 29]. Однак для подальшого удосконалення процедур кріоконсервування *D. fragilis*, крім відбору найбільш результативної СС (у нашому випадку СС4) важливо враховувати ступінь (%) виживання клітин паразитів за умов різних режимів охолодження зразків та стійкість різнорозмірних популяцій трофозоїтів до заморожування (табл. 2).

За результатами мікроскопії розморожених зразків (кріоконсервованих з СС2-4) авторами дослідження встановлено, що незалежно від ізоляту *D. fragilis* і вихідної концентрації у його суспензії трофозоїтів, найбільш значимі втрати життєздатності останніми відбуваються на етапах охолодження до -20 і -70 °C ($p < 0,05$). Попереднє заморожування зразків до -20 °C дещо підвищує (у 1,3–1,5 рази) відсоток виживаності трофозоїтів на наступних етапах їх охолодження до -70 і -196 °C, але без досягнення статистичної значущості ($p > 0,05$). Найменш стійкою до заморожування є популяція великорозмірних трофозоїтів (з діаметром >45 мкм), яка гине (руйнується) вже на етапі охолодження до -20 °C (табл. 2). Серед трофозоїтів середнього розміру (15–45 мкм), що становлять переважну більшість у вирощених на RPMI дводобових культурах *D. fragilis*, здатні пережити заморожування до -70 °C лише клітини з відносно меншим діаметром (≤ 26 мкм). Найвища стійкість до замороження (при усіх режимах охолодження) притаманна популяції трофозоїтів найменшого розміру (12–15 мкм), яка, вірогідно, забезпечує відновлення росту культур *D. fragilis* після їх кріоконсервування. Таким

чином, перспективним напрямом удосконалення методу кріоконсервування *D. fragilis* у RPMI є підвищення виживаності трофозоїтів на критично значимому етапі заморожування шляхом контрольованого регулювання швидкістю охолодження та використання молодих культур паразитів з більшою популяцією малорозмірних клітин.

ВИСНОВКИ

1. Середовище RPMI (з 10% термоінактивованої сироватки коня, без антибіотиків) є цілком придатним для вирощування *in vitro* як первинних (короткострокових), так і стабілізованих (довгострокових) ксенічних культур *D. fragilis*. Профілі росту на RPMI (при 37 °C у мікроаерофільних умовах) різних ізолятів *D. fragilis* є подібними. У фазі експоненційного розмноження паразитів (друга доба культивування) час генерації трофозоїтів становить $8,1 \pm 0,6$ години, а урівноважений показник їх максимальної концентрації сягає $(3,9 \pm 1,8) \times 10^5$ клітин / мл.

2. Культури *D. fragilis*, вирощені на RPMI, є високопридатними для вивчення морфологічної структури клітин цих найпростіших, процесів їх поділу, утворення псевдоподій, формування пре-цист і цист. Вирощувати культури *D. fragilis* на RPMI можна економічно вигідним і технічно простим способом у пробірках "Eppendorf" (E. L. Medical) об'ємом 1,5 мл.

3. Найбільш ефективне кріоконсервування трофозоїтів *D. fragilis* у RPMI досягається за умов використання композиції, що поряд з 2,5 % D-глюкози містить ДМСО в кінцевій концентрації 7,0 %. Ця композиція дозволяє зберегти здатність до росту культур *D. fragilis* щонайменше місяць у зразках, заморожених до -20 , -70 і -196 °C.

4. Під час кріоконсервування значуще зниження життєздатних клітин *D. fragilis* відбувається на етапах їх охолодження до -20 і -70 °C внаслідок руйнування велико- і середньорозмірних трофозоїтів. Трофозоїти найменшого розміру (12–15 мкм) є найбільш стійкими до замороження і забезпечують відновлення росту культур *D. fragilis* після їх кріоконсервування.

Робота є фрагментом прикладної НДР «Удосконалення діагностики і лікування протозойних кишкових хвороб у військовослужбовців», номер державної реєстрації 0123U100317.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abdellatif Soliman SM, Sanad MF, Shalan AE. Synthesis, characterization and antimicrobial activity applications of grafted copolymer alginate-g-poly(N-vinyl imidazole). RSC Adv. 2021; 11(19): 11541-8.
2. Ahmed NH. Cultivation of parasites. Trop Parasitol. 2014; 4(2): 80-9.
3. Aykur M, Caliskan Kurt C, Dirim Erdogan D, et al. Investigation of *Dientamoeba fragilis* prevalence and evaluation of sociodemographic and clinical features in patients with gastrointestinal symptoms. Acta Parasitol. 2019; 64(1): 162-70.
4. Barratt JL, Banik GR, Harkness J, et al. Newly defined conditions for the *in vitro* cultivation and cryopreservation of *Dientamoeba fragilis*: new techniques set to fast track molecular studies on this organism. Parasitol. 2010; 137(13): 1867-78.
5. Barratt JL, Cao M, Stark DJ, Ellis JT. The transcriptome sequence of *Dientamoeba fragilis* offers new biological insights on its metabolism, kinome, degradome and potential mechanisms of pathogenicity. Protist. 2015; 166(4): 389-408.
6. Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Dullaert-de Boer M, et al. Case-control comparison of bacterial and protozoan microorganisms associated with gastroenteritis: application of molecular detection. Clin Microbiol Infect. 2015; 21(6): 592.e9-19.
7. Cacciò SM. Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis*. Acta Trop. 2018; 184: 73-7.
8. Calderaro A, Buttrini M, Montecchini S, et al. MALDI-TOF MS as a new tool for the identification of *Dientamoeba fragilis*. Parasit Vectors [Internet]. 2018 Jan 04 [cited 2024 Aug 10]; 11: 11. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2597-3>
9. 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 [Internet]. 2022 Feb 12 [cited 2024 Aug 10]; 10 (2), 426. Available from: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020426>
10. CDC: DPDx – laboratory identification of parasites of public health concern. Centers for disease control and prevention. Sensors [Internet]. 2022 Dec 14 [cited 2023 Jun 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/index.html>
11. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(3): 329-41.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract; Approved guideline – Second Edition. CLSI document M28-A2 [Internet]. 2005 Jun 30 [cited 2022 Dec 11]; 25(16). Available from: https://clsi.org/media/1460/m28a2_sample.pdf
13. El-Gayar EK, Mokhtar AB, Hassan WA. Study of the pathogenic potential of *Dientamoeba fragilis* in experimentally infected mice. Parasite Epidemiol Control. 2016; 1(2): 136-43.
14. Elnazeer A.M., Elmaliq K.H., Elshikh A.A. Isolation, excystation and *in vitro* culture of *Giardia*-spp from fecal samples of suspected patients in RPMI media Europ Academic Res. 2016; 3(10): 10670-89.
15. Garcia LS. *Dientamoeba fragilis*, one of the neglected intestinal protozoa. J Clin Microbiol. 2016; 54(9): 2243-50.
16. Gough R, Barratt J, Stark D, Ellis J. Diversity profiling of xenic cultures of *Dientamoeba fragilis* following systematic antibiotic treatment and prospects for genome sequencing. Parasitol. 2020; 147(1): 29-38.
17. Guadano-Procesi I, Berrilli F, Montalbano Di Filippo M, Di Cave D. Detection and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from symptomatic patients: new insights from Italy into a little-known gastrointestinal protozoan. Parasitol Int. [Internet]. 2024 Feb [cited 14 May 2024]; 98: 102816. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576923000946>
18. Hall LM, Munasinghe VS, Vella NGF, et al. Observations on the transmission of *Dientamoeba fragilis* and the cyst life cycle stage. Parasitol. 2024; 151(3): 337-45.
19. Hamidi N, Meamar AR, Akhlaghi L, et al. *Dientamoeba fragilis* diagnosis by fecal screening: relative effectiveness of traditional techniques and molecular methods. J Infect Dev Ctries. 2018; 12(1): 52-9.
20. Hawash YA, Ismail KA, Saber T, et al. *Dientamoeba fragilis* infection in patients with digestive and non-digestive symptoms: a case-control study. Korean J Parasitol. 2020; 58(2): 129-34.
21. Intra J, Sarto C, Besana S, Tiberti N, Brambilla P. The importance of considering the neglected intestinal protozoan parasite *Dientamoeba fragilis*. J Med Microbiol. 2019; 68(6): 890-2.
22. Kurt Ö, Girginkardeşler N, Özbilgin A, Ok ÜZ. Choosing culture for *Dientamoeba fragilis* detection in stool when PCR is not available: assessment of its efficacy and comparison of three culture media. Infect Dis Clin Microbiol. 2019; 1(1): 34-41.
23. Kyrychenko II, Biriukov MS, Pokhil SI, Tymchenko OM. Protozoan intestinal invasions in military personnel of the northern region of Ukraine. Modern Gastroenterol. 2024; 137(3): 39-45.
24. Miyake Y, Karanis P, Uga S. Cryopreservation of protozoan parasites. Cryobiol. 2004; 48(1): 1-7.
25. Munasinghe VS, Stark D, Ellis JT. New advances in the *in vitro* culture of *Dientamoeba fragilis*. Parasitol. 2012; 139(7): 864-9.

26. Munasinghe VS, Vella NG, Ellis JT, *et al.* Cyst formation and faecal-oral transmission of *Dientamoeba fragilis* - the missing link in the life cycle of an emerging pathogen. *Int J Parasitol.* 2013; 43(11): 879-83.
27. Nagata N, Marriott D, Harkness J, Ellis JT, Stark D. *In vitro* susceptibility testing of *Dientamoeba fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(1): 487-94.
28. Pietilä JP, Häkkinen TA, Pakarinen L, *et al.* Treatment of *Dientamoeba fragilis*: a retrospective finnish analysis of faecal clearance and clinical cure comparing four antiprotozoal drugs. *New Microbes New Infect* [Internet]. 2023 Sep 23 [cited 2024 12 Jun]; 54: 101179. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10542007/>
29. Sawangjaroen N, Luke R, Prociw P. Diagnosis by faecal culture of *Dientamoeba fragilis* infections in australian patients with diarrhoea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993; 87(2): 163-5.
30. Stark D, Barratt J, Chan D, Ellis JT. *Dientamoeba fragilis*, the neglected trichomonad of the human bowel. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29(3): 553-80.
31. Stark D, Barratt JL, Roberts T, Marriott D, *et al.* Activity of benzimidazoles against *Dientamoeba fragilis* (Trichomonadida, Monocercomonadidae) *in vitro* and correlation of beta-tubulin sequences as an indicator of resistance. *Parasite* [Internet]. 2014 Aug 25 [cited 2024 Aug 12]; 21: 41. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4141546/>
32. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015; 111: A3.B.1–A3.B.3.
33. van Gestel RS, Kusters JG, Monkelbaan JF. A clinical guideline on *Dientamoeba fragilis* infections. *Parasitol.* 2019; 146(9): 1131-39.
34. van Kalleveen MW, van Gool T, Klarenbeek N, *et al.* *Dientamoeba fragilis* in children: a systematic review on diagnostic considerations and efficacy of treatment. *Expert Rev Gastroent Hepatol.* 2020; 14(4): 231-42.
35. Vysekantsev IP, Martsenyuk VP, Buriak IA, Gurina TM. Freezing regimens and gel carrier composition influence safety of *Saccharomyces boulardii* immobilized yeast cells. *Probl Cryobio Cryomed.* 2021; 31(4): 343-52.
36. Wathoni N, Suhandi C, Ghassani Purnama MF, *et al.* Alginate and chitosan-based hydrogel enhance antibacterial agent activity on topical application. *Infect Drug Resist.* 2024; 17: 791-805.
37. Xiang X, Liu Z, Zhao G. Sodium alginate as a novel cryoprotective agent for cryopreservation of endothelial cells in a closed polytetrafluoroethylene loop. *Biopreserv Biobank.* 2020; 18(4): 321-8.
38. Yetismis G, Yildirim A, Pekmezci D *et al.* First report and genotyping of *Dientamoeba fragilis* in pet budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), with zoonotic importance. *Zoonoses Public Health.* 2022; 69(5): 572-8.
39. Zhang X., Qiao J., Wu X., Da R. *et al.* *In vitro* culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *Int J Infect Dis.* 2012; 16(1): e23-e28.

Received: 15.09.2024

Accepted for publication: 20.02.2025

I.I. Kyrychenko^{1, *}, M.S. Biriukov¹, S.I. Pokhil², O.M. Tymchenko²¹ Military Medical Clinical Center of the Northern Region of the Ministry of Defense of Ukraine, Kharkiv, Ukraine² State Institution «I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

* kiricheigor@gmail.com

CULTIVATION AND CRYOPRESERVATION OF DIENTAMOEBEA FRAGILIS XENIC CULTURES IN RPMI MEDIUM

Dientamoeba fragilis is one of the most common intestinal protozoan parasites in humans and many animals, which can cause acute and chronic lesions of the gastrointestinal tract. Growing and preservation of *D. fragilis* cultures *in vitro* allows studying the features of the life cycle of these parasites, their pathogenic potential, sensitivity to antimicrobial drugs, etc. In this work, the suitability of RPMI nutrient medium for *in vitro* cultivation and cryopreservation of xenic cultures of *D. fragilis* was studied for the first time. Based on the results of sowing fresh fecal samples from Ukrainian military personnel (with confirmed monoinvasion of *D. fragilis*) in RPMI (with 10% heat-inactivated horse serum, without antibiotics), it was established that RPMI is quite suitable for growing both short-term and long-term xenic cultures of *D. fragilis*. Growth profiles on RPMI (at 37 °C in microaerophilic conditions) of different isolates of *D. fragilis* are similar. *D. fragilis* cultures grown on RPMI are highly suitable for studying the morphological structure of these protozoa cells, their division processes, the formation of pseudopodia, pre-cysts and cysts. The most effective cryopreservation of *D. fragilis* trophozoites is achieved in a composition based on RPMI containing DMSO in a final concentration of 7.0%. The smallest trophozoites (12–15 μm) are the most resistant to freezing and ensure the recovery of growth of *D. fragilis* cultures after their cryopreservation.

Key words: *Dientamoeba fragilis*, xenic cultures, cultivation, cryopreservation, RPMI medium.