

Diagnostyka laboratoryjna zarażeń *Blastocystis* – wyzwania i kontrowersje

Laboratory diagnostics of *Blastocystis* infections – challenges and controversies

Monika Rudzińska, Beata Kowalewska, Katarzyna Sikorska

Zakład Medycyny Tropikalnej i Epidemiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Blastocystis to jednokomórkowe organizmy jelitowe o nieustalonej patogeniczności, jedne z najczęściej występujących mikroorganizmów w próbkach kału ludzi na całym świecie. Niekiedy ich obecność może przyczyniać się do rozwoju blastocystozy manifestującej się dolegliwościami ze strony przewodu pokarmowego, takimi jak: bóle brzucha, biegunki, wzdęcia i nudności o różnym nasileniu z okresami zaostrzeń i remisji. Ze względu na znaczny polimorfizm (co najmniej 4 formy morfologiczne i duży zakres wielkości) oraz delikatną, łatwo ulegającą destrukcji strukturę, wykrywanie *Blastocystis* w mikroskopowych rozmazach kału jest trudne. Łatwo je przeoczyć lub pomylić z innymi mikroorganizmami obecnymi w kale. Brakuje ujednoliconego schematu postępowania w diagnostyce blastocystozy. W międzylaboratoryjnych badaniach porównawczych *Blastocystis* jest najbardziej niespójnie wykrywanym eukariontem jelitowym. W artykule omówiono trudności w diagnostyce blastocystozy oraz metody wykorzystywane do wykrywania *Blastocystis* pod względem ich przydatności w medycznym laboratorium diagnostycznym.

Abstract

Blastocystis is a unicellular intestinal organism with undetermined pathogenicity, one of the most commonly detected in human stool samples around the world. Sometimes their presence may contribute to the development of blastocystosis manifested by gastrointestinal complaints such as abdominal pain, diarrhea, flatulence, and nausea of varying severity with periods of exacerbation and remission. Due to the significant polymorphism (at least 4 morphological forms and a large range of sizes), and the delicate, easily degradable structure, recognition of *Blastocystis* in microscopic stool smears is difficult. They are easily overlooked or confused with other microorganisms present in the feces. There is a lack of a standardized procedure for the diagnostics of blastocystosis. In inter-laboratory comparative studies, *Blastocystis* is the most inconsistently detected intestinal eukaryote. The article discusses the difficulties in diagnosing blastocystosis, and the methods used to detect *Blastocystis* in terms of their usefulness in a medical diagnostic laboratory.

Słowa kluczowe: *Blastocystis*, diagnostyka

Keywords: *Blastocystis*, diagnostics

Wprowadzenie

Taksonomia i nazewnictwo

Organizmy z rodzaju *Blastocystis* to kosmopolityczne, jednokomórkowe, beztlenowe, eukariotyczne organizmy bytujące w jelitach człowieka i wielu gatunków zwierząt. Postrzegane są one jako komensale, ale ich patogenny potencjał jest intensywnie badany od wielu lat [1]. Kilukrotnie zmieniano przynależność taksonomiczną *Blastocystis*. Pierwotnie, wykorzystując technikę mikroskopii świetlnej, niezależnie od siebie Alexeieff (w 1911 r.) i Brumpt (w 1912 r.) zaklasyfikowali te organizmy do grzybów. W roku 1967 zostały one przeniesione do pierwotniaków, czyli królestwa *Protozoa*, a w 1985 roku umieszczono je w królestwie *Protista* [2]. W roku 1996, na podstawie badań molekularnych,

zwłaszcza analizy sekwencji w genie kodującym ie 18S rRNA, *Blastocystis* umieszczono w typie (phylum) *Stramenopile* (inaczej *Heteroconta*) w królestwie *Chromista*, zgodnie z podziałem świata organizmów na 6 królestw (*Bacteria*, *Protozoa*, *Animalia*, *Fungi*, *Plantae* i *Chromista*) zaproponowanym przez Cavalier-Smith [3]. *Stramenopile* obejmują bardzo różnorodne organizmy: jednokomórkowe i wielokomórkowe, heterotroficzne i fotosyntetyzujące, w tym śluzowce, okrzemki i glony. Przedstawiciele rodzaju *Blastocystis* nie mają cech typowych dla *Stramenopile*, bowiem nie posiadają wici i są beztlenowcami, ponadto jako jedyne spośród *Stramenopile* żyją w dolnej części przewodu pokarmowego człowieka oraz innych ssaków, a także ptaków, gadów, płazów i owadów [4]. Prawdopodobnie z tych względów identyfikacja afiliacji taksonomicznej i genetycznej *Blastocystis* trwa tak długo

oraz jest przyczyną utrzymującej się w piśmiennictwie naukowym niejednorodnej klasyfikacji i nazewnictwa tych organizmów [4, 5]. Nawet w publikacjach z ostatniej dekady można znaleźć takie anglojęzyczne określenia (i ich odpowiedniki w pracach polskojęzycznych) jak: protist, protozoa, protozoon, parasite, pathogen i commensal odnoszące się do *Blastocystis* i jego dawniejszej pozycji w biologicznej systematyce oraz ciągle dyskutowanej klasyfikacji ekologiczno-medycznej.

Na przestrzeni lat zmianie uległo nazewnictwo *Blastocystis*. Przez prawie 100 lat nazwy gatunkowe nawiązywały do gospodarza, z którego izolowano szczep (np. *B. hominis* lub *B. ratti*, szczepy izolowane odpowiednio od ludzi i szczurów), co wynikało z silnego przekonania, że istnieją odrębne – choć morfologicznie identyczne – gatunki charakterystyczne dla człowieka i innych kręgowców. Zapoczątkowany w latach 90. intensywny rozwój technik molekularnych oraz ich zastosowanie w taksonomii i medycynie (ludzkiej i weterynaryjnej) wykazały, że w przypadku organizmów z rodzaju *Blastocystis* często mamy do czynienia z wielością form jednego gatunku, który może występować u różnych gospodarzy spośród kręgowców, w tym człowieka. Dlatego zasugerowano, aby ludzkiego pasożyta dłużej nie nazywać *Blastocystis hominis*, lecz stosować zapis *Blastocystis spp.* lub *Blastocystis spp.* podtyp „n”, gdzie „n” jest numerem podtypu zgodnie z klasyfikacją Stensvolda, na przykład *Blastocystis spp.* ST1 lub w krótszej formie *Blastocystis* ST1 [6, 7]. Zgodnie z obecną wiedzą wyróżnia się co najmniej 17 podtypów, które wykazują do 7% różnorodności genetycznej w genie kodującym małą podjednostkę rybosomalnego RNA (SSU-rRNA; ang. *small sub-unit ribosomal RNA*) [8]. Podtypy ST1–ST8 znaleziono zarówno u ludzi, jak i zwierząt; ST9 zidentyfikowano tylko u człowieka, a ST10–ST17 wyłącznie u zwierząt. Współwystępowanie niektórych podtypów *Blastocystis* u człowieka i zwierząt sugeruje duży zoonotyczny potencjał zarażeń *Blastocystis* [9, 10, 11]. Choć cykl życiowy i drogi transmisji *Blastocystis* nie zostały ostatecznie wyjaśnione, to w świetle dostępnych danych na ogół przyjmuje się, że do zarażenia najprawdopodobniej dochodzi na drodze fekalno-oralnej – za pośrednictwem zanieczyszczonej cystami wody i/lub żywności bądź brudnych rąk [12, 13, 14].

Prewalencja

Szacuje się, że *Blastocystis* występuje w jelitach około miliarda ludzi na świecie i jest on jednym z najczęściej wykrywanych eukariontów w próbkach kału człowieka [15 – 19]. Brakuje danych na temat prewalencji *Blastocystis* u ludzi w Polsce. Dostępne, skąpe dane pochodzą z pojedynczych ośrodków badawczych i różnią się znacznie stwierdzanym odsetkiem zarażeń *Blastocystis* (0 – 12%) [20]. Obserwacje prowadzone od 1992 roku w Zakładzie Medycyny Tropikalnej i Epidemiologii (obecnie w strukturze Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) wykazały, że wśród pacjentów zgłaszających się na badania koproskopowe *Blastocystis* był najczęściej wykrywanym organizmem wśród pasożytów i komensali jelitowych, a liczba osób nim zarażonych rośnie [21]. Częstotliwość występowania *Blastocystis* u ludzi na świecie różni się znacznie i waha się od kilku/kilkunastu procent w krajach rozwiniętych do kilkudziesięciu – a nawet 100% – w niektórych społecznościach krajów rozwijających się [22, 23, 24]. Tłumaczy się

to różnym poziomem infrastruktury sanitarnej i higieny osobistej oraz zróżnicowaniem badanych populacji (wiejskie, miejskie, dzieci, dorośli, osoby z objawami choroby lub bezobjawowe). Istotny wpływ na wykrywalność *Blastocystis* mają techniki diagnostyczne stosowane do identyfikacji *Blastocystis* [25].

Dyskusyjna chorobotwórczość

Do dziś nie została jednoznacznie określona patogeniczność *Blastocystis*. Początkowo mikroorganizmy te uznawano za jelitowe komensale i jeszcze w latach 80. uważano, że inwazje *Blastocystis* mają charakter bezobjawowy i nie odgrywają roli w patogenezie chorób przewodu pokarmowego. Jednak późniejsze obserwacje kliniczne osób z *Blastocystis*, które zgłaszały dolegliwości, takie jak: biegunka i bóle brzucha o różnym nasileniu, nudności, zaparcia i wzdęcia, świąd odbytu i utratę masy ciała, sugerowały, że może być uznany za patogen, a dyskusja na temat roli tego organizmu w rozwoju nieswoistych zapaleń jelit trwa od lat [1, 26]. Ponadto opisywano przypadki pokrzywki, która ustępowała po eradykacji *Blastocystis* [27]. Wykrycie wielu podtypów w obrębie rodzaju *Blastocystis* nasunęło podejrzenie, że tylko niektóre z wielu morfologicznie identycznych podtypów mają potencjał patogeny. Jednak liczne próby mające na celu znalezienie powiązania pomiędzy dolegliwościami a poszczególnymi podtypami nie przyniosły oczekiwanego wyjaśnienia. Równie wiele doniesień przemawia za patogennością poszczególnych podtypów. Czynniki wirulencji, patogeniczności i cechy osobnicze gospodarza (w tym genetycznie uwarunkowane) związane z manifestacją choroby są nadal niejasne [1, 8, 28]. Ponadto pojawiły się opinie sugerujące, że obecność *Blastocystis* może być przejawem zdrowia, gdyż u wielu osób, których jelita zostały skolonizowane przez mikroorganizmy z tego rodzaju, nie występują żadne dolegliwości, a ich flora jelitowa jest bardziej zróżnicowana niż u osób bez *Blastocystis* [23, 29]. Niemniej stwierdzenie obecności *Blastocystis*, przy jednoczesnym braku innych czynników etiologicznych (pasożytów, bakterii, wirusów, grzybów), mogących odpowiadać za utrzymujące się dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, może upoważniać do rozpoznania blastocystozy i wdrożenia terapii [28].

Diagnostyka

Do wykrywania pasożytów przewodu pokarmowego wykorzystuje się bezpośrednie i pośrednie metody diagnostyczne. Metody bezpośrednie obejmują morfologiczną identyfikację form rozwojowych pasożytów (mikroskopia) oraz wykrywanie antygenów metodą immunofluorescencji (IF) lub immunoenzymatyczną (EIA) lub rzadziej DNA pasożytów (zazwyczaj metodą PCR). Metody pośrednie opierają się na wykrywaniu przeciwciał [30]. Znajdują one także zastosowanie w diagnostyce blastocystozy, ale ich skuteczność jest zróżnicowana.

Diagnostyka mikroskopowa

Obecność *Blastocystis* w przewodzie pokarmowym człowieka przeważnie wykrywa się na podstawie badań mikroskopowych bezpośrednich rozmazów świeżego kału, pomimo niezadawalającej czułości diagnostycznej tej metody [31]. Wykrycie *Blastocystis* może stanowić problem diagnostyczny, bowiem organizm ten

zaliczany jest do polimorficznych. Opisano kilka form morfologicznych (wodniczkowa, ziarnista, ameboidalna, cysta) różniących się wyglądem i wielkością od 2 do 200 µm (choć najczęściej w zakresie 6 – 40 µm), co utrudnia identyfikację *Blastocystis* [2]. Badanie porównawcze dwóch europejskich laboratoriów referencyjnych wykazało, że *Blastocystis* był najbardziej niespójnie wykrywanym eukariotycznym mikroorganizmem jelitowym. Ze 102 identycznych próbek w jednym laboratorium *Blastocystis* zidentyfikowano w 25 (24,5% próbek dodatnich), a w drugim w 90 próbkach, czyli w 88,2% [32]. W podobnym badaniu przeprowadzonym w dwóch europejskich ośrodkach diagnostycznych specjalizujących się w medycynie tropikalnej, spośród 48 identycznych próbek kału w jednym *Blastocystis* wykryto w 28 (58,3%), a w drugim w 38 próbkach, a zatem w 79,2% [33].

Bezpośrednia obserwacja mikroskopowa rozmazów kału w soli fizjologicznej i płynie Lugola (pow. 400x) pozwala na wykrycie najczęściej występującej i jednocześnie najłatwiejszej do rozpoznania wodniczkowej (wakuolarnej) formy *Blastocystis*. Cechuje się ona dużą, centralnie położoną wakuolą otoczoną cienkim pasmem cytoplazmy zawierającym jądra i inne organelle komórkowe. Zdecydowanie rzadziej w kale wykrywana jest forma ziarnista, a najrzadziej ameboidalna. Forma ziarnista przypomina wodniczkową z tą różnicą, że centralnie położoną wakuolę (a często również otaczającą ją cytoplazmę) wypełniają liczne ziarnistości o nieustalonej funkcji. Forma ameboidalna, nieregularnego kształtu, nie jest – wbrew temu co sugeruje nazwa – ruchliwa, ale posiada silne własności adhezyjne umożliwiające przywieranie do ściany jelitowej gospodarza, co może tłumaczyć jej sporadyczne obserwowanie w próbkach kału. Cysty (uważane za formę transmisyjną), ze względu na małe rozmiary (2 – 5 µm), są trudne do wykrycia pod mikroskopem, chociaż występują w kale ponad 20% nosicieli. Mają one do 4 jąder i grubą ścianę, która umożliwia im przetrwanie w środowisku zewnętrznym nawet do miesiąca. Cysty nie posiadają dużej, centralnej wakuoli, ale mają liczne, drobne wodniczki, w których magazynowane są substancje odżywcze [34, 35]. Te silnie zróżnicowane formy wegetatywne mogą być mylone (zwłaszcza przez niedoświadczonych diagnostów) z kropelkami tłuszczu, leukocytami, pasożytniczymi pierwotniakami i komensalami przewodu pokarmowego (na przykład *Dientamoeba fragilis* lub drożdżopodobnymi grzybami) oraz innymi strukturami obecnymi w kale [31, 35]. Dlatego poziom wykrywalności *Blastocystis* w bardzo dużym stopniu zależy od umiejętności i doświadczenia diagnosty.

W diagnostyce parazytologicznej za wysoce efektywną i zalecaną do wykrywania i identyfikacji pasożytów jelitowych uważa się metodę trwałego barwienia trichromem (ewentualnie metodą Giemsy lub hematoksyliną żelazistą) wcześniej utrwalonych rozmazów świeżego kału [36]. W przypadku *Blastocystis* nie zawsze prowadzi to do zwiększenia wykrywalności, gdyż jakoś wybarwienia bywa zróżnicowana, mimo stosowania odczynników o takim samym składzie i analogicznym czasie barwienia. Być może z tych powodów wykrywalność *Blastocystis* w preparatach trwałe barwionych na ogół nie przekracza 50%, a przez wielu badaczy metoda ta uważana jest za najmniej efektywną [25, 37 – 40].

Czynnikiem istotnie wpływającym na wykrywalność *Blastocystis* w preparatach mikroskopowych rozmazów kału jest liczba

wydalanych z organizmu gospodarza komórek drobnoustroju. Bardzo mała ich liczba w próbce może skutkować przeoczeniem inwazji, a należy podkreślić, że komórki *Blastocystis* wydalone są nieregularnie i w różnych ilościach, przy czym sugeruje się możliwość istnienia korelacji między liczebnością *Blastocystis* a nasileniem dolegliwości [4, 14, 41, 42, 43]. Z tego powodu w inwazjach *Blastocystis* zalecana jest ocena ilościowa w formie opisowej (na przykład: pojedyncze, nieliczne, liczne w preparacie/ polu widzenia) wraz z odpowiednią interpretacją umieszczoną na wyniku badania. Ze względu na nierównomierne wydalenie komórek *Blastocystis*, wskazane jest badanie kilku (co najmniej trzech) próbek kału pobranych od pacjenta w jedno- lub kilkudniowych odstępach. Powtórzenie badania, oprócz dokładniejszej oceny intensywności inwazji, pozwoli też upewnić się, czy nie występują żadne inne czynniki etiologiczne mogące odpowiadać za dolegliwości pacjenta [44].

Konwencjonalne metody zagęszczające (sedymentacja/dekantacja) rekomendowane w diagnostyce parazytoz jelitowych nie zwiększają wykrywalności *Blastocystis*, gdyż stosowane w tych metodach substancje (formalina, octan etylu, eter) i wirowanie uszkadzają delikatną strukturę komórek *Blastocystis*, co może utrudnić, a nawet uniemożliwić ich wykrycie [35, 36, 40, 45, 46].

Diagnostyka serologiczna

Oprócz badań mikroskopowych kału, diagności laboratoryjnej mają do dyspozycji testy do wykrywania koproantygenów patogenów. Immunodetekcja antygenów powierzchniowych pasożytów za pomocą znakowanych przeciwciał przy użyciu metody immunoenzymatycznej (EIA) (w próbkach kału) lub metody immunofluorescencji (IF) (w rozmazach kału) zapewnia zwiększoną czułość i jest szeroko wykorzystywana w diagnostyce kryptosporidiozy, giardiozy i amebozy [47]. Tego typu testy zostały także opracowane do wykrywania *Blastocystis*. Jednakże tylko pojedyncze doniesienia potwierdzają ich praktyczną użyteczność [25, 43, 48]. W badaniach świeżych i utrwalonych formaliną rozmazów kału czułość i swoistość metody IF oceniono odpowiednio na 86,7% i 97,3%, a metody ELISA na 82 – 92% i 86 – 87%, przy czym utrwalanie formaliną nie powodowało utraty czułości [25, 48]. Jednakże w części próbek, które uznano za dodatnie (na podstawie stwierdzenia obecności *Blastocystis* w hodowlach z kału) w badaniu metodą IF uzyskano wynik ujemny [25].

Ze względu na wciąż zbyt małą wiedzę na temat odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zarażenie *Blastocystis*, wykorzystanie oznaczania swoistych przeciwciał do oceny klinicznej zarażenia u ludzi nie zostało wystarczająco poznane i pozostaje w fazie badań [49, 50].

Metody hodowlane

Doniesienia wielu autorów sugerują, że metodą gwarantującą znacznie większą wykrywalność *Blastocystis* niż preparaty mikroskopowe jest hodowla *in vitro* z kału dzięki zwielokrotnieniu liczby komórek początkowo obecnych w próbce.

Stworzono i opisano wiele podłoży (płynnych i dwufazowych) zapewniających dobry wzrost *Blastocystis*, m.in. podłoże Jonesa, Ringera, Boeck-Drbohlava, Robinsona, Locka (LE), *Iscove's Modified*

Dulbecco's Medium (IMDM) [14, 25, 38, 42, 51, 52, 53]. Różnią się one składem chemicznym, czaso- i pracochłonnością, okresem przydatności do użycia oraz ceną. Podłoże płynne Jonesa jest często wybierane przez badaczy ze względu na łatwość przygotowania, możliwość przechowania w lodówce bez widocznych zmian nawet przez 6 miesięcy oraz niewielki koszt [1, 37]. Wadą hodowli *Blastocystis* z próbek kału jest wydłużenie czasu uzyskania wyniku o 2 – 3 dni, ale rekompensuje to jej większa czułość w porównaniu do klasycznych metod mikroskopowych, chociaż zdarza się czasem, że hodowle obumierają z niewyjaśnionych przyczyn [38, 42, 54]. W metodzie hodowlanej istotną rolę odgrywa pierwotna liczba komórek *Blastocystis* w badanej próbce kału, bowiem im więcej jest ich w inokulacie, tym wcześniej uzyskuje się maksymalny wzrost i większą liczbę komórek *Blastocystis* w fazie ich maksymalnego wzrostu. Za minimalną liczbę komórek w inokulacie, niezbędną do uzyskania wzrostu hodowli, uważa się 10^5 – 10^6 ml⁻¹ [2, 39, 52]. Ponadto należy pamiętać, że przedstawiciele *Blastocystis* są beztlenowcami, zatem niezapewnienie podczas inkubacji warunków beztlenowych (lub przynajmniej o obniżonej zawartości tlenu) wpływa niekorzystnie na ich rozwój. Czynnikiem, który także może współdecydować o powodzeniu hodowli jest odczyn pH. Obserwowano przypadki degradacji hodowli, gdy pH podłoża obniżało się < 6, a jej obfity wzrost, gdy pH było obojętne lub lekko alkaliczne (pH 7 – 8) [2, 39]. Niektóre izolaty *Blastocystis* wymagały do przeżycia obecności bakterii, a w przypadku ich braku obumierały [2].

Badania molekularne

Co najmniej od dwóch dekad obserwuje się intensywny rozwój technik molekularnych i korzyści płynące z ich stosowania, m.in. w diagnostyce zarażeń pasożytniczych oraz *Blastocystis* [54, 55]. Najczęściej wykorzystuje się dwie różne techniki PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*). Jedna z nich opiera się na amplifikacji fragmentu genu kodującego podjednostkę 18S rRNA (znanego jako „barcode region”), a następnie sekwencjonowaniu uzyskanego produktu amplifikacji DNA [56]. Druga polega na użyciu starterów komplementarnych do miejsc znakowanych sekwencyjnie (STS; ang. *sequence tagged sites*), czyli krótkich, łatwych do rozpoznania pojedynczych sekwencji DNA, swoistych dla poszczególnych podtypów *Blastocystis* [57]. Jej wadą jest konieczność przeprowadzenia 9 odrębnych reakcji (z 9 parami starterów), aby nie przeoczyć żadnego z 9 podtypów *Blastocystis* występujących u ludzi. W metodzie „barcodingu” wykonuje się tylko jedną reakcję amplifikacji, a uzyskany produkt poddaje sekwencjonowaniu i za pomocą dostępnych online programów (<http://pubmlst.org/blastocystis/>) identyfikuje się podtyp *Blastocystis*. W literaturze opisano przypadki, gdy uzyskane w wyniku „barcodingu” produkty po sekwencjonowaniu okazały się należeć do *Cryptosporidium spp.* lub grzybów z rodzaju *Mucor* lub *Rhizomucor* [58]. Dlatego sekwencjonowanie wszystkich uzyskanych produktów amplifikacji jest konieczne, aby uniknąć wyników fałszywie dodatnich (otrzymywanych z powodu dużego podobieństwa regionu „barcode” różnych eukariontów).

Obiecujące są próby wykorzystania PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) do wykrywania zarażenia *Blastocystis*. Metoda *real-time PCR*, dzięki zastosowaniu specyficznej sondy

i starterów ukierunkowanych na wysoce zmienny, ale względnie mały fragment genu kodującego 18S rRNA, zyskuje zarówno na czułości, jak i swoistości. Pierwsze próby wykazały 95% [54] i 100% [59] swoistość i zdolność wykrywania wszystkich dziewięciu podtypów *Blastocystis* zidentyfikowanych dotychczas u ludzi. Nie wykryto DNA bakteryjnego ani grzybów z rodzajów *Candida*, *Geotrichum* i *Saccharomyces*, które są powszechnymi składnikami mikrobioty jelitowej, a od *Blastocystis* różnią się sekwencją nukleotydów w obrębie genu kodującego 18S rRNA jedynie o około 20%. Nie stwierdzono fałszywie dodatnich wyników w próbkach zawierających patogeny z rodzaju *Entamoeba*, *Dientamoeba*, *Giardia* i *Cryptosporidium* [54, 59, 60]. Dodatkową zaletą tej metody jest możliwość oceny ilościowej swoistego DNA w badanej próbce poprzez analizę wartości punktu Ct (ang. *cycle threshold*) określającego liczbę cykli, po których reakcja wchodzi w fazę wykładniczą oraz wartości fluorescencji proporcjonalnej do przyrostu ilości produktu amplifikacji w porównaniu do krzywej standardowej lub kalibratora [59]. Gdyby dzięki zastosowaniu *real-time PCR* w badaniach na dużą skalę udało się ustalić, że istnieje zależność pomiędzy obrazem klinicznym a intensywnością inwazji, metoda ta mogłaby stać się cennym narzędziem w diagnostyce i leczeniu pacjentów z *Blastocystis*. Wadą wszystkich metod molekularnych jest możliwość otrzymania wyników fałszywie ujemnych z powodu obecnych w niektórych próbkach kału inhibitorów PCR [61].

Powstały już pierwsze, oparte na technikach molekularnych, komercyjne testy do diagnostyki patogenów przewodu pokarmowego obejmujące wykrywanie DNA *Blastocystis* [np. EasyScreen™ Enteric Parasite Detection Kit (Genetic Signatures, Sydney, Australia), NanoChip® (Savyon Diagnostics, Izrael)]. Pomimo dużego kosztu (cykler, zestawy do izolacji DNA, primery, nukleotydy, polimerazy, szkolenia personelu) ograniczającego ich powszechną dostępność, należy się spodziewać, że zaczną się one stopniowo pojawiać w ofercie laboratoriów diagnostycznych.

Kontrowersje diagnostyczno-kliniczne

Diagnostyka blastocystozy nierozdzielnie wiąże się z klinicznym problemem interpretacji wyników badań. Wykrycie drobnoustroju (lub potwierdzenie jego eradykacji po leczeniu) nie stanowi gwarancji dla jednoznacznych, słusznych decyzji terapeutycznych, do których podjęcia konieczne jest rozróżnienie kolonizacji od patologicznej, chorobotwórczej inwazji. Wiadomo, że stwierdzenie obecności tego mikroorganizmu nie musi być równoznaczne z chorobą, gdyż kolonizacja przewodu pokarmowego człowieka przez *Blastocystis* może utrzymywać się miesiącami lub nawet latami i nie wywoływać żadnych objawów [23, 62], może też ustępować samoistnie [63]. Niektórzy badacze sugerują istnienie zależności między obrazem klinicznym a intensywnością inwazji *Blastocystis* jako kryterium patogeniczności, przyjmując stwierdzenie powyżej 5 organizmów w polu widzenia [4, 14, 43]. Jednakże obserwacje innych (w tym własne) zaprzeczają istnieniu takiej zależności [54, 65, 66]. Sugerowany jest także związek występowania objawów chorobowych z funkcjonowaniem mechanizmów odpornościowych zarażonej osoby oraz ze zmienną patogenicznością różnych podtypów *Blastocystis*. Kwestia potencjalnego

wpływu wymienionych czynników na przebieg kliniczny tego zarażenia wymaga dalszych badań.

Stwierdzenie obecności *Blastocystis* u części osób może wywołać niepotrzebny niepokój i próby wymuszenia leczenia lub – gdy to się nie powiedzie – samoleczenia, ponieważ nieuzasadnione leczenie może poważnie naruszyć prawidłowy skład mikrobioty jelitowej. Dodatkową komplikację stanowi brak efektywnych, w pełni swoistych i skutecznych strategii terapeutycznych. Przyjęto, że wskazaniem do leczenia przeciwpasożytniczego zarażenia *Blastocystis* są zgłaszane przez chorego dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego pod warunkiem wykluczenia innych możliwych inwazji przewodu pokarmowego oraz niezakażnych przyczyn stwierdzanych objawów. Leczenie bywa długotrwałe i bywa nieskuteczne [4, 67, 68].

Z tych względów, uzasadnione są postulaty badaczy, aby: (1) wykrywania DNA *Blastocystis* nie umieszczać w panelu wraz z bezwzględnymi patogenami, takimi jak *Entamoeba histolytica*, *Giardia* spp. i *Cryptosporidium* spp.; (2) badanie wykonywane było tylko w uzasadnionych przypadkach, tzn. przy utrzymujących się dolegliwościach i braku innych czynników etiologicznych mogących je wywołać; (3) do interpretacji wyniku (i decyzji terapeutycznych) podchodzić ostrożnie, gdyż nie zawsze stwierdzenie obecności *Blastocystis* w kale jest równoznaczne z chorobą i nie zawsze wymaga leczenia [1, 68].

Podsumowanie

Trudności w diagnostyce i ocenie klinicznej blastocystozy mają wieloczynnikowe podłoże. Polimorficzna natura i nieregularne wydalanie drobnoustroju powodują trudności i znaczne rozbieżności w wykrywaniu *Blastocystis* w zależności od stosowanych metod diagnostycznych. Z tego względu diagnostyka blastocystozy wymaga ujednolicenia. W świetle dostępnych danych bezpośrednie rozmazy kału badane mikroskopowo wzbogacone o hodowle wydają się wystarczające do prawidłowego i skutecznego wykrycia *Blastocystis*. Niestety, nawet skuteczne wykrycie mikroorganizmu nie rozwiązuje problemu braku kryteriów odróżniających kolonizację od patologicznej inwazji i związanych z tym trudności w podejmowaniu decyzji terapeutycznych.

Piśmiennictwo

- Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* 2016; 65(6): 763–771. doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015
- Zierdt CH. *Blastocystis hominis* – past and future. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4(1): 61–79.
- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev.* 1998; 73(3): 203–266.
- Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(4): 639–665. doi/10.1128/CMR.00022-08
- Denoeud F, Roussel M, Noel B, et al. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 2011; 12(3): R29. Available from: <http://genomebiology.com/content/12/3/R29>
- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends Parasitol.* 2007; 23(3): 93–96.
- Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, et al. Current views on the clinical relevance of *blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep.* 2010; 12(1): 28–35.
- Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv in Parasit.* 2013; 82: 1–32.
- Ramírez JD, Sánchez LV, Bautista DC, et al. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol.* 2014; 22: 223–8.
- Wang J, Gong B, Yang F, et al. Subtype distribution and genetic characterizations of *Blastocystis* in pigs, cattle, sheep and goats in northeastern China's Heilongjiang Province. *Infect Genet Evol.* 2018; 57: 171–6. doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.026
- Udonsom R, Prasertbun R, Mahittikorn A, et al. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infect Genet Evol.* 2018; 65: 107–11. doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.007
- Suresh K, Smith HV, Tan TC. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(9): 5619–20.
- Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, et al. Drinking water: A possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(3): 401–6.
- Fathy FM. A study on *Blastocystis hominis* in food-handlers: diagnosis and potential pathogenicity. *J Egypt Soc Parasitol.* 2011; 41(2): 433–53.
- van Hattem JM, Arcilla MS, Grobusch MP, et al. Travel-related acquisition of diarrhoeagenic bacteria, enteric viruses and parasites in a prospective cohort of 98 Dutch travellers. *Travel Med Infect Dis.* 2017; 19: 33–36. doi.org/10.1016/j.tmaid.2017.08.003
- Shahnazi M, Sadeghi M, Saraei M, et al. Prevalence of parasitic intestinal infections among food handlers in Qazvin, Iran. *Turkish J Parasitol.* 2019; 43(1): 16–20.
- Menu E, Mary C, Toga I, et al. A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France. *Epidemiol Infect.* 2019; 147: 1–8
- Greigert V, Abou-Bacar A, Brunet J, et al. Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa. *PLoS One.* 2018; 13(10): 1–17.
- Barbosa CV, Barreto MM, de Jesus Andrade R, et al. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. *PLoS One.* 2018; 13(3): 1–12.
- Kaczmarek A, Gołąb E, Żarnowska-Prymek H, et al. Genetic diversity of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland. *Przegl Epidemiol.* 2017; 71(4): 539–546.
- Kowalewska B, Rudzińska M, Zarudzka D, Kotłowski A. Ocena częstości zarażeń pasożytami jelitowymi wśród pacjentów przychodni Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni w okresie ostatnich 30 lat. *Diagn Lab.* 2013; 49(1): 9–15.
- Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, et al. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 2013; 126(1): 11–8. doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.011
- Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, et al. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014; 90(1): 326–330.
- El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis.* 2014; 14(1): 164–175.
- Dogruman-AI F, Simsek Z, Boorum K, et al. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS One.* 2010; 5(11): 1–7.

26. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, et al. New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog*. 2012; 8(3): 1–4.
27. Hameed DMA, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol Res*. 2011; 108(3): 553–60.
28. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog* 2014; 6: 17–25.
29. Audebert C, Even G, Cian A, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep*. 2016; 6: 252–255.
30. Garcia LS. Chapter 22 Antibody and antigen detection in parasitic infections. In: Garcia LS, (eds) *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th ed. ASM PRESS. Washington, D.C. 2001; 584–588.
31. Stensvold CR, Nielsen HV, Molbak K, Smith H V. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis*—diagnostic limitations. *Trends Parasitol*. 2009; 25(1): 23–29.
32. Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: A comparison among European reference laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16(3): 267–273.
33. Bogoch II, Raso G, N'Goran EK, et al. Differences in microscopic diagnosis of helminths and intestinal protozoa among diagnostic centres. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006; 25(5): 344–347.
34. Fayer R, Elsasser T, Gould R, et al. *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitol Res*. 2014; 113(4): 1465–1472.
35. Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23(6): 509–511.
36. Garcia LS. Chapter 27 Macroscopic and microscopic examination of fecal specimens. In: Garcia LS, (eds) *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th ed, ASM PRESS. Washington, D.C. 2001; 747–769.
37. Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, et al. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Res*. 2004; 93(6): 445–457.
38. Roberts T, Barratt J, Harkness J, et al. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *blastocystis* sp. in clinical stool samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 84(2): 308–312.
39. Zhang X, Qiao J, Wu X, 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): 23–28.
40. Elghareeb AS, Younis MS, El Fakahany AF, et al. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. *Trop Parasitol*. 2015; 5(1): 36–41.
41. Nagel R, Cuttall L, Stensvold CR, et al. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Intern Med J*. 2012; 42(11): 1187–1195.
42. Santos HJ, Rivera WL. Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. *Asian Pac J Trop Med*. 2013; 6(10): 780–784. doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60138-8.
43. EL-Marhoumy SM, EL-Nouby KA, Shoheib ZS, Salama AM. Prevalence and diagnostic approach for a neglected protozoon *Blastocystis hominis*. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2015; 5(1): 51–59.
44. Garcia LS. Chapter 2 Intestinal parasites: Amebae. In: Garcia LS, (eds) *Diagnostic Medical Parasitology* 4th ed, ASM PRESS. Washington, D.C. 2001; 28–31.
45. Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, et al. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002; 96(8): 803–807.
46. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, et al. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 59(3): 303–307.
47. Rekomendacje Centers for Disease Control and Prevention. Stool Specimens – Detection of Parasite Antigens. 2016. <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/antigendetection.html>
48. Dogruman-AI F, Turk S, Adiyaman-Korkmaz G, et al. A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. *Parasitol Res*. 2015; 114(2): 495–500.
49. Su S, Yan Y, Liao H, et al. Dot enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in humans. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*. 2007; 25(3): 256–258.
50. Nagel R, Traub RJ, Kwan MMS, et al. *Blastocystis* specific serum immunoglobulin in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 453–465.
51. Jones WR. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Ann Trop Med Parasitol*. 1946; 40: 130–140.
52. Ho LC, Singh M, Suresh G, et al. Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol Res*. 1993; 79(7): 614–616.
53. Lanuza MD, Carbajal JA, Villar J, Borrás R. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitol Res*. 1997; 83(1): 60–63.
54. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(3): 975–983.
55. Verweij JJ, Rune Stensvold C. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27(2): 371–418.
56. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*. 2006; 157(1): 77–85.
57. Yoshikawa H, Iwamasa A. Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU rRNA gene. *Parasitol Int*. 2016; 65(6): 785–791.
58. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Vet Parasitol*. 2013; 196(1–2): 85–89.
59. Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen LOB, Nielsen HV. Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(6): 1847–1851.
60. Jones MS 2nd, Ganac RD, Hiser G, et al. Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitol Res*. 2008; 103(3): 551–557.
61. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012; 113(5): 1014–1026.
62. Andersen LO, Stensvold CR. *Blastocystis* in health and disease: Are we moving from a clinical to a public health perspective? *J Clin Microbiol* 2016; 54(3): 524–528.
63. van Hattem JM, Arcilla MS, Schultsz C, et al. Carriage of *Blastocystis* spp. in travellers – A prospective longitudinal study. *Travel Med Infect Dis*. 2018; doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.06.005
64. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, et al. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(1): 116–121.
65. Ozyurt M, Kurt O, Molbak K, et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int*. 2008; 57(3): 300–306.
66. Rudzińska M, Kowalewska B, Wąż P, et al. *Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland – A single center study. *Infect Genet Evol*. 2019; 75: 103926. doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103926

67. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, et al. *Blastocystis*: To treat or not to treat. Clin Infect Dis. 2012; 54(1): 105–110.
68. Kurt Ö, Doğruman AI F, Tanyüksel M. Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all? Parasitol Int. 2016; 65(6): 797–801.

Autor do korespondencji:

mgr inż. Monika Rudzińska
Zakład Medycyny Tropikalnej i Epidemiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
81-519 Gdynia, ul. Powstania Styczniowego 9B
tel. +48 58 3491761
e-mail: mrudz@gumed.edu.pl

Nie zgłoszono sprzeczności interesów.

Otrzymano: 19.05.2019

Akceptacja do druku: 27.12.2019

