

**ЧАСТОТА ВИЯВЛЕННЯ *BLASTOCYSTIS* SP.
МЕТОДАМИ МІКРОСКОПІЇ ТА
КУЛЬТИВУВАННЯ У ФЕКАЛІЯХ
АСИМПТОМАТИЧНИХ І
СИМПТОМАТИЧНИХ ОСІБ У ХАРКОВІ,
УКРАЇНА**

Похил¹ С.І., Тимченко¹ О.М., Чигиринська¹ Н.А.,
Костиря¹ І.А., Бодня² І.П., Кальян² В.В.

¹Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.
Мечникова,
²Харківський національний медичний
університет

Blastocystis sp. (раніше *Blastocystis hominis*) належить до родини Blastocystidae, нового класу Blastocystea, підтипу Opalinata, інфра-царства Heterokonta, під-царства Chromobiota, царства Chromista і є найбільш поширеним анаеробним одноклітинним паразитом кишкового тракту багатьох видів тварин, яким колонізовано від 1 до 2 мільярдів людей в країнах усього світу [1, 2].

Blastocystis sp. виявляють як у зразках фекалій (ЗФ) здорових людей (асимптоматичні особи), так і - хворих (симптоматичні особи) із неспецифічними симптомами ураження шлунково-кишкового тракту (біль у животі, діарея, метеоризм, анорексія, нудота, блювання, анальний свербіж, неконтрольоване схуднення), шкіри (кропив'янка), суглобів (артралгії) та, рідше, інших систем і органів [3-6]. Результати досліджень поширеності *Blastocystis* sp. серед людей обох когорт у світі варіюють в широких межах (від 0,08 % до близько 90 %) у залежності від ступеню економічного розвитку країни, рівня урбанізації її конкретного регіону, культурних і санітарно-гігієнічних традицій спільнот, сфери професійної діяльності людей тощо, а також – від лабораторного методу детекції паразитів, який було використано при проведенні епідеміологічних досліджень [4, 6-13]. У цілому середній рівень інфікованості *Blastocystis* sp. населення в індустріально розвинутих країнах дещо перевищує 5 %, а в країнах, що розвиваються, сягає 30-60 % [14, 15].

Для виявлення *Blastocystis* sp. у ЗФ застосовують мікроскопічні, культуральні (вирощування паразитів *in vitro*), імунологічні (виявлення антигенів найпростіших за допомогою імуноферментного аналізу, прямої реакції імунофлуоресценції, імунохроматографічного тесту тощо) та молекулярно-генетичні методи (детекція фрагментів геному паразитів з використанням різних типів полімеразної ланцюгової реакції) [4, 6, 7, 9-16]. Кожна група методів виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. у ЗФ має свої переваги і недоліки [4, 7, 11, 17-19]. Комерційні імунологічні та молекулярно-генетичні тест-системи є досить вартісними, а їх використання потребує відповідного лабораторного устаткування. Крім того, на сьогодні такі тест-системи не проходили державної реєстрації в Україні і недоступні на національному ринку для

практичного чи наукового використання (особисте повідомлення авторів). Навпроти, традиційні методи світлової мікроскопії завдяки технічній доступності до теперішнього часу залишаються найбільш вживаними в усіх країнах світу при проведенні лабораторної діагностики бластоцистозу. Вони ґрунтуються на виявленні/ідентифікації у мазках ЗФ діагностичних морфологічних форм (морфоформ) *Blastocystis* sp.: переважно вакуолярних, гранулярних (та перехідних стадій), рідше амебодібних, цист [4, 7, 9, 11, 20, 21]. Найбільш поширеним і доступним методом залишається світлова мікроскопія зразків фекалій: препаратів мокрих мазків тимчасово забарвлених 1-2 % розчином йоду; тонких фіксованих мазків ЗФ стійко забарвлених залізним гематоксилином за Гендейнайном (Heidenhain's iron-hematoxylin stain), трихромом за Вітлі (Wheatley's modification trichrome stain), методом Гімзе (Giemsa's stain), модифікованим швидким методом Філда (modified Field's rapid stain) [6, 7, 18, 19, 22]. Мікроскопія препаратів мазків фекалій, стійко забарвлених трихромом і залізним гематоксилином й досі залишається "золотим стандартом" рутинної лабораторної діагностики багатьох кишкових протозойних кишкових хвороб, у тому числі - бластоцистозу [16, 18, 23, 24].

Серед недоліків методу прямої копроскопії найбільш значущими є відносно низька його чутливість (в середньому 55-75 %), яку прагнуть підвищити шляхом застосування додаткових процедур збагачення фекалій (переважно седиментації), певна складність ідентифікації надзвичайно різноманітних за розміром і морфологією клітин *Blastocystis* sp. та їх диференціація від інших елементів, які можуть бути присутні у ЗФ - лейкоцитів, дріжджоподібних грибів, крапель жиру, інших найпростіших (мікроспоридій, ооцист *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp., *Cyclospora* sp.) [3, 4, 7, 18, 19].

Культуральні методи діагностики (короткострокове вирощування *in vitro*) є альтернативою широко вживаним в практиці мікроскопічним методам [6, 7, 25, 26, 27, 28, 29, 30]. Він потребує незначних матеріальних затрат і передбачає використання типового для бактеріологічних лабораторій устаткування із тривалістю процедури виявлення 24-72 години. Багато науковців саме культуральний метод діагностики вважають «золотим стандартом» виявлення *Blastocystis* sp. в ЗФ і порівнюють ефективність виявлення цих паразитів іншими методами саме із методом вирощування *in vitro* [7, 31-32].

У порівнянні із мікроскопічними, культуральні методи виявлення *Blastocystis* sp. характеризуються більш високими рівнями чутливості (близько 90 % і вище) та специфічності (100 %) [7, 23, 24], що дозволило авторам ряду робіт запропонувати культуральні методи для діагностики бластоцистозу [23-26, 32, 33].

Метою роботи було встановлення поширеності *Blastocystis* sp. в зразках фекалій у різних когортах людей (клінічно здорових та симптоматичних осіб із симптомами ураження шлунково-кишкового тракту) м. Харкова методами мікроскопії та культивування.

Матеріали та методи.

Когорту обстежених становили мешканці м. Харків (n=169), серед яких 72 людини з характерною для бластоцистозу симптоматикою (синдром подразненого кишківника та/або без діареї), 97 – асимптоматичні, клінічно здорові особи. ЗФ від кожної людини відбирались в 2 стерильні одноразові контейнери: з консервантом (10 % формалін) співвідношення об'ємів 1:1 для мікроскопічного дослідження; без консерванту (матеріал для культурального (*in vitro*) методу виявлення *Blastocystis* sp.

Мікроскопічному дослідженню підлягали усі 169 ЗФ (їх осади) після процедури збагачення (концентрування), яку виконано у відповідності із [34] із змінами як описано раніше [3]: у формалін-фосфатно-сольовому буфері (FPBSCS) (pH=7,4) за допомогою центрифуги лабораторної СМ-3 «MICROmed» (Україна) в режимі 500 г впродовж 10 хвилин.

Для виготовлення стійко забарвлених мазків готували тонкі мазки із збагаченого осаду ЗФ (50 мкл), які фарбували трихромом за модифікацією Вітлі (Wheatley's modification trichrome stain - mWTS) та залізним гематоксилином за Гейденгайном (Heidenhain's iron-hematoxylin stain - НІНС) як описано [34, 35].

Виявлення *Blastocystis* sp. в усіх ЗФ культуральним методом проводили за методологією, яка описана нами раніше [36], коротко: висів близько

200 мл фільтрованого гомогенату ЗФ в відновлене о монофазне рідке живильне середовище RPMI/IMDMEM об'ємом 5 мл (є комбінацією RPMI 1640 та модифікованого Дульбекко середовища Ігла в модифікації Іскоува - IMDMEM) 5 мл з антибіотиками (ампіцилін 12 мг/мл і стрептоміцин 4 мг/мл) та 10 % інактивованої сироватки коня; інкубування в анаеробних умовах при $t = (37 \pm 0,5)$ °С впродовж 5 діб. Наявність клітин паразитів у висівах встановлювали на 4 добу інкубування методом фазово-контрастної мікроскопії (сумарне збільшення $\times 600$) 20 мкл гомогенізованої суспензії, а остаточну ідентифікацію виявлених *Blastocystis* sp. здійснено за результатом світлової мікроскопії (із сумарним збільшенням $\times 1500$) мазків суспензій, стійко забарвлених mWTS або НІНС як описано вище [35, 36].

Світлову мікроскопію стійко забарвлених мазків осаду після збагачення ЗФ, як і суспензії після культивування проводили з використанням мікроскопу для клінічної лабораторної діагностики «МИКМЕД-2» Ю-33.22.926, з окулярами із рівнем збільшенням $10\times$, $15\times$ (сумарне збільшення $\times 1500$).

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

Результати.

Результати порівняльної оцінки результативності виявлення *Blastocystis* sp. методами мікроскопії та культивування у 169 зразках (72 – від асимптоматичних та 97 – від симптоматичних осіб) автентичних (тих самих) за походженням ЗФ представлено в таблиці.

Таблиця - Частота виявлення *Blastocystis* sp. у ЗФ від асимптоматичних і симптоматичних осіб (мешканців Харкова) методами мікроскопії та культивування

Джерело походження ЗФ, їх кількість (n)	Кількість позитивних результатів виявлення/ідентифікації <i>Blastocystis</i> sp. методами	
	мікроскопії ¹⁾ , абс. ч. (%)	культивування ²⁾ , абс. ч. (%)
ЗФ від асимптоматичних осіб, n = 72	3 (4,2)	5 (6,9)
ЗФ від симптоматичних осіб, n = 97	24 (24,7)	29 (29,9)
ЗФ різного походження, Σ n = 169	27 (16,0)	34 (20,1)

Примітки :

¹⁾ – за результатами остаточної мікроскопічної ідентифікації в стійко забарвлених (mWTS або НІНС) фіксованих мазках збагачених осадів;

²⁾ – за результатами остаточної мікроскопічної ідентифікації в стійко забарвлених фіксованих мазках суспензій культур, вирощених на середовищі RPMI/IMDMEM.

Дані таблиці свідчать про невисоке зростання частоти виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. культуральним методом (на 4,1 %) у порівнянні із частотою мікроскопічної детекції

паразитів у всіх ЗФ від людей (n = 169) ($p > 0,05$). Водночас, застосування культурального методу призвело до зростання частоти виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. у ЗФ від асимптоматичних осіб (n = 72) лише на 2,7 %, а у ЗФ

від симптоматичних осіб ($n = 97$) – на 5,2 % ($p > 0,05$). Аналіз цих даних призводить до логічного висновку про те, що використання культурального методу дозволило додатково виявляти *Blastocystis* sp. і у тих ЗФ, в яких кількість клітин паразитів була меншою за мінімально необхідну для їх виявлення мікроскопічним методом.

Слід відзначити, що за результатами наших досліджень з усіх ЗФ, в яких мікроскопічним методом було виявлено *Blastocystis* sp., отримано ріст первинних культур цих паразитів. Приклад мікроскопічного дослідження мазка суспензії ЗФ після культивування наведено на рисунку.

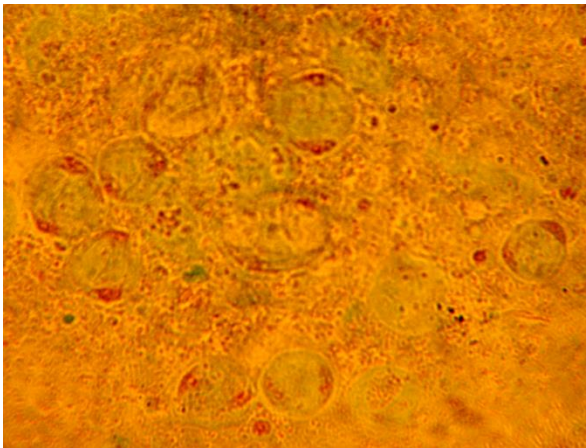


Рисунок - Препарат стійко забарвленого методом mWTS мазка суспензії культури *Blastocystis* sp. (світлова мікроскопія із сумарним збільшенням $\times 1000$, масляна імерсія, реперна мітка 10 мкм).

Таким чином, між сумарними результатами (негативні+позитивні) виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. мікроскопічним і культуральним методами у всіх ЗФ від людей r_{ϕ} сягає +0,92 а для груп ЗФ від асимптоматичних і симптоматичних осіб - $r_{\phi} = +0,94$ та $r_{\phi} = +0,90$, відповідно. У вибірці лише позитивних результатів виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. мікроскопічним і культуральним методами значення r_{ϕ} становить: +0,59 для усіх досліджених ЗФ від людей, +0,20 – для ЗФ від асимптоматичних осіб та +0,66 – для ЗФ від симптоматичних осіб. Отже, якщо рівень чутливості застосованого культурального методу виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. у всіх досліджених ЗФ прийняти за 100 %, то визначена відносна чутливість мікроскопічного методу складе 79,4 %.

Обговорення

Наскільки нам відомо, дана робота – перше повідомлення про виявлення *Blastocystis* sp. в ЗФ від людей в Україні культуральним методом. В попередні роки нашими колегами із ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» впродовж двох десятиліть проводились скринінгові дослідження ЗФ

(мікроскопічним методом) від симптоматичних та клінічно здорових людей [37]. Дані наших колег підтверджують думку інших науковців про те, що *Blastocystis* sp. є найпоширенішим найпростішим, а частота їх виявлення в ЗФ зростала протягом останніх 20 років. За результатами їх досліджень частка інвазованих людей збільшилася з 6,5 % у 1995 - 1997 рр. до 19,5 % у 2015-2016 рр. на тлі зниження показників виявлення інших найпростіших. Доля *Blastocystis* sp. серед виявлених найпростіших збільшилася з 57,1 % у 1995 - 1997 рр. до 97,0 % на теперішній час [37].

В ході досліджень отримані нами відносно невисокі показники приросту частоти виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. у ЗФ від людей культуральним методом (у порівнянні із результатами мікроскопічної детекції) істотно різняться від значно вищих аналогічних показників, які наведено авторами робіт [9, 23, 24, 28]. Це можна пояснити рядом відмінностей дизайну досліджень, виконаних авторами вказаних робіт. Ці відмінності полягають у порівнянні частоти виявлення *Blastocystis* sp. культуральним методом і світловою мікроскопією мокрих незабарвлених або тимчасово забарвлених мазків незбагачених фекалій, що у цілому характеризується відносно найнижчим рівнем чутливості.

Навпроти, нами проведено порівняльну оцінку частоти виявлення *Blastocystis* sp. у ЗФ від людей методом культивування (на середовищі RPMI/IMDMEM) та мікроскопічним методом з найбільшою ефективністю - у стійко забарвлених (mWTS або HHS) фіксованих мазках спеціально збагачених фекалій (збагачених осадах) (див. табл.). Слід відзначити, що використані нами процедури остаточної ідентифікації виявлених *Blastocystis* sp. як у мазках збагачених осадів, так і у мазках суспензій культур паразитів є ідентичними. У ряді інших робіт іноземних науковців проведено аналогічне нашому порівняння продуктивності мікроскопічних і культуральних методів виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. у ЗФ [25, 26].

Так, автори статті [25], які дослідили 398 ЗФ від амбулаторних пацієнтів, показали: зростання частоти виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. культуральним методом (на середовищі RPMI) на 8,9 % у порівнянні із результативністю мікроскопічної детекції цих паразитів у стійко забарвлених трихромом мазках фекалій, а також рівень чутливості цього мікроскопічного методу, який становить 90,8 % відносно чутливості використаного ними культурального методу.

У роботі [26], автори якої дослідили 72 ЗФ (від асимптоматичних і симптоматичних осіб), приріст частоти виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. культуральним методом варіював у межах від 5,6 % на середовищі Jones's до 16,7 % на середовищі Boeck and Drbohlav's modified Locke egg diphasic medium (LE) при співставленні із показником частоти мікроскопічного виявлення цих кишкових паразитів у стійко забарвлених трихромом мазках фекалій; а відносна чутливість мікроскопічного методу сягала

73,3 % від рівня чутливості методу первинного вирощування культур *Blastocystis* sp. на середовищі LE.

Таким чином, визначені за результатами наших досліджень як показники збільшення частоти (на 5,2 %) виявлення/ідентифікації *Blastocystis* sp. у ЗФ від симптоматичних осіб культуральним методом, так і - відносною чутливості (79,4 %) порівняного з ним мікроскопічного методу виявлення/ідентифікації цих кишкових паразитів є співставимими із аналогічними даними ряду іноземних науковців [25, 26].

Культуральний метод, у порівнянні із мікроскопічним методом виявлення *Blastocystis* sp. у ЗФ, окрім вищого рівня чутливості, характеризується і значно вищим рівнем специфічності (точності ідентифікації паразитів), який сягає 100 %. Це пояснюється тим, що варіативність морфології клітин *Blastocystis* sp. ускладнює їх мікроскопічну ідентифікацію у мазках фекалій навіть для досвідченого персоналу лабораторії. Вакуолярна форма *Blastocystis* sp. має унікальний центральний орган, тому при достатній кількості цього типу клітин можливість помилкової ідентифікації (чи пропущення при перегляді препарату) дуже низька. Натомість, інші форми *Blastocystis* sp. легко сплутати з іншими кишковими найпростішими, дріжджоподібними грибами, макрофагами, лейкоцитами, еритроцитами, фрагментами епітеліальних клітин кишечника неперетравленими елементами їжі, пилком рослин, грудочками слизу та з іншими артефактами ("псевдопаразитами") фекалій. Ця проблема вирішується при застосуванні культурального методу, так як вирощування *in vitro* *Blastocystis* sp. супроводжується значним збільшенням кількості (в експоненціальній фазі росту у сотні-тисячі раз) клітин паразитів та розвитком їх гранулярних, амебоїдних і цистних форм у типову вакуолярну, що легко ідентифікується.

Висновки

1. За результатами паралельного дослідження мікроскопічним і культуральним методами 169 ЗФ від різних груп людей встановлено, що культуральний метод переважає мікроскопічний за чутливістю виявлення *Blastocystis* sp. у ЗФ (на 20,6 %) та характеризується значно вищим рівнем специфічності (точності ідентифікації паразитів), який сягає 100 %.

2. Освоєння методів вирощування *Blastocystis* sp. *in vitro* дозволяє їх використовувати для підвищення ефективності виявлення паразитів у ЗФ людей з метою діагностики бластоцистозу, проведення епідеміологічних досліджень для встановлення популяційної поширеності найпростіших, визначення чутливості культур *Blastocystis* sp. до лікарських препаратів, контролю ефективності проведеної етіотропної терапії бластоцистозу, отримання антигенів паразитів, вивчення патогенезу хвороби та вірулентного потенціалу штамів збудника різного походження тощо.

Detection rate of *Blastocystis* sp. by microscopy and culture methods in symptomatic and asymptomatic persons in Kharkiv city, Ukraine

Pokhil S.I., Tymchenko O.M., Chigirinskaya N.A., Kostyria I.A., Bodnya I.P., Kalian V.V.

Introduction. *Blastocystis* sp. - is the most prevalent anaerobic intestinal protozoan parasite in humans and many animals; from 1 to 2 billion people in the world are colonized by this pathogen. *Blastocystis* sp. is found both in faecal samples (FS) of healthy people (asymptomatic persons) and - patients (symptomatic persons) with nonspecific symptoms of gastrointestinal tract, skin, joints and other organs lesions. The prevalence of people affected by *Blastocystis* sp. of both cohorts in the world vary widely (from 0.08% to about 90%) depending on the degree of the country's economic development, sanitary and hygienic conditions, cultural values, etc. Currently, microscopic, cultural, immunological and molecular genetic methods are used for *Blastocystis* sp. detection in stool samples. Each group of methods of *Blastocystis* sp. detection/identification in FS has its advantages and disadvantages. The **goal** of this study was to determine the prevalence of *Blastocystis* sp. in faecal samples in different cohorts of people (clinically healthy and symptomatic people with symptoms of gastrointestinal lesions) in Kharkiv by microscopic and cultural methods. **Materials and Methods.** Cohort of surveyed residents of Kharkiv (n=169) included 72 clinically healthy individuals and 97 symptomatic individuals with gastrointestinal tract diseases. All 169 FSs (their precipitates) were subjected to microscopic examination after the formalin-phosphate-salt buffer (FPBSCS) enrichment (concentration) procedure (pH=7.4) at 500 g for 10 minutes. *Blastocystis* sp. identification was carried out by means of microscopy of the faecal smears, which were stained by Wheatley's modification trichrome stain (mWTS) and by Heidenhain's iron-hematoxylin stain (HIHS). The inoculated material was a filtered suspension of native FS (200 µl) which was inoculated in 5 ml of liquid media RPMI/IMDMEM (mixture of equal volumes of RPMI and IMDMEM media) with antibiotics and serum. *Blastocystis* sp. culture growth was carried out under anaerobic conditions at 37 oC for 5 days. The blastocysts final identification was carried out by means of light microscopy of suspensions smears stably stained with mWTS HIHS. **Results & Discussion.** It was carried out a comparative evaluation of the effectiveness *Blastocystis* sp. detection methods as microscopy (smears of enriched faecal material stained with mWTS or HIHS) and cultivation (on RPMI/IMDMEM medium) based on the results of parallel studies of 169 FS from different groups of people by both methods. An insignificant increase (4.1%) of the *Blastocystis* sp. frequency detection/identification by means of cultural method in comparison with the frequency of microscopic parasites detection in all FS was determined: in FS from asymptomatic individuals (n = 72) only by 2.7%, and in FS from symptomatic individuals (n = 97) - by 5.2% (p> 0.05). From all FS in

which *Blastocystis* sp. was detected microscopically, the growth of these parasite primary cultures was obtained. Among the total results (negative + positive) *Blastocystis* sp. detection / identification by microscopic and cultural methods in all FS from humans r_{ϕ} reaches +0.92, and for groups FS from asymptomatic and symptomatic individuals - r_{ϕ} =+0.94 and r_{ϕ} =+0.90, respectively. In the sample of only positive results detection / identification of *Blastocystis* sp. by microscopic and cultural methods, the value of r_{ϕ} is: + 0.59 for all studied FS from humans, + 0.20 - for FS from asymptomatic individuals and + 0.66 - for FS from symptomatic individuals. **Conclusion.** According to the results of a parallel study of microscopic and cultural methods of 169 FS from different groups of people it was found that the cultural method dominates over microscopic in sensitivity of *Blastocystis* sp. detection in FS (20.6%) and is characterized by a much higher level of specificity (accuracy of parasite identification), which reaches 100%. The method of *in vitro* diagnostics helps to increase the efficiency of parasites detection in human FS, can be used for epidemiological studies to establish the population prevalence of protozoa, to determine the sensitivity of *Blastocystis* sp. cultures to drugs, control of the etiotropic blastocystosis therapy effectiveness, obtaining parasites antigens, study the disease pathogenesis and the virulence potential of pathogen strains of different origin, etc.

Keywords: *Blastocystis* sp., diagnostics, *in vitro*. microscopic examination.

References.

1. Stensvold C.R., Tan K.S.W., Clark C.G. Blastocystis. Trends Parasitol. 2020 Mar; 36(3): 315-316. DOI: 10.1016/j.pt.2019.12.008.
2. Scanlan P.D., Stensvold C.R. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. Trends Parasitol. 2013 Nov; 29(11): 523-529. DOI: 10.1016/j.pt.2013.08.006.
3. Parija S.C., Jeremiah S.S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. Trop. Parasitol. 2013 Jan; 3(1):17-25. DOI: 10.4103/2229-5070.113894.
4. Vielma J. R. Blastocystosis: epidemiological, clinical, pathogenic, diagnostic, and therapeutic aspects. Invest. Clín. 2019 Mar; 60(1): 53-78. DOI: 10.22209/IC.v60n1a06.
5. Stensvold R.D., Clark C.G. Current status of *Blastocystis*: A personal view. Parasitol. Int. 2016 Dec; 65(6 Pt B): 763-771. DOI: 10.1016/j.parint.2016.05.015.
6. Sekar U., Shanthi M. Recent insights into the genetic diversity, epidemiology and clinical relevance of *Blastocystis* species. J. Med. Res. 2015; 1(1): 33-39. URL: http://www.medicinearticle.com/JMR_201511_10.pdf.
7. Tan K.S.W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. Clin. Microbiol. Rev. 2008 Oct; 21 (4): 639-665. DOI: 10.1128/CMR.00022-08.
8. Boorom K.F., Smith H., Nimri L. et al. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. Parasit Vectors. 2008 Nov; 1(1): 40. DOI: 10.1186/1756-3305-1-40
9. Mohamed R.T., El-Bali M.A., Mohamed A.A. et al. Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. Parasit Vectors. 2017; 10(1): 174. DOI: 10.1186/s13071-017-2114-8.
10. Ning C.Q., Hu Zh., Chen Jh. et al. Epidemiology of *Blastocystis* infection from 1990 to 2019 in China. Infect. Dis. Poverty. 2020; 9, 168. DOI: 10.1186/s40249-020-00779-z
11. El Safadi D., Cian A., Nourrisson C. et al. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. BMC Infect. Dis. 2016 Aug; 16(1): 451. DOI: 10.1186/s12879-016-1776-8.
12. Lhotska Z., Jirku M., Hlozkova O. et al. A Study on the Prevalence and Subtype Diversity of the Intestinal Protist *Blastocystis* sp. in a Gut-Healthy Human Population in the Czech Republic. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020 Oct; 10:544335. DOI: 10.3389/fcimb.2020.544335.
13. Lepczyńska M., Dzika E., Chen W.C. Prevalence of *Blastocystis* subtypes in healthy volunteers in Northeastern Poland. J. Parasitol. 2021 Sep; 107 (5): 684-688. DOI: 10.1645/20-170.
14. Nemati S., Zali M. R., Johnson P. et al. Molecular prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Asia and in Australia. J. Water Health. 2021; 19(5): 687-704. DOI: <https://doi.org/10.2166/wh.2021.011>
15. Javanmard E., Niyayati M., Ghasemi E. et al. Impacts of human development index and climate conditions on prevalence of *Blastocystis*: A systematic review and meta-analysis. Acta Tropica. 2018; 185(1): 93-203. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.05.008>
16. Salman Y.J. Detection of *Blastocystis hominis* among peoples in Kirkuk province using ELISA and direct microscopy. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2015; 4(10): 686-695.
17. Garcia L.S., Arrowood M., Kokoskin E. et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. Clin. Microbiol. Rev. 2017 Nov; 31 (1): e00025-17. DOI: 10.1128/CMR.00025-17.
18. McHardy I., Wu M., Shimizu-Cohen R. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 2014 Mar; 52(3): 712-720. DOI: 10.1128/JCM.02877-13.
19. Dagci H., Kurt O., Demirel M. Epidemiological and diagnostic features of blastocystis infection in symptomatic patients in Izmir province, Turkey. Iran. J. Parasitol. 2014 Oct-Dec; 9(4): 519-529. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4345091/>.
20. Tan T.C., Suresh K.G. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. Parasitol. Res. 2006 Feb; 98(3):189-193. DOI: 10.1007/s00436-005-0033-7.
21. Kantardjiev V., Galev A., Broshtilova V. Urticaria Associated with Amoeboid Forms of *Blastocystis* spp. Asian J. Res. Infect. Dis. 2019; 2(3): 1-4. DOI: 10.9734/ajrid/2019/v2i330105.
22. Wawrzyniak I., Poirier P., Viscogliosi E. et al. Blastocystis, an unrecognized parasite: an overview of

- pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 2013; 1(5): 167-178. DOI: 10.1177/2049936113504754.
23. Stensvold C.R., Arendrup M.C., Jespersgaard C. et al. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007 Nov; 59(3): 303–307 DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003.
24. Mohamad N.A., Mastuki M.F., Al-Mekhlafi H.M. et al. Comparative study of Wheatley's trichrome stain and *in-vitro* culture against PCR assay for the diagnosis of *Blastocystis* sp. in stool samples. *Iran J. Parasitol.* 2018 Jan-Mar; 13(1): 127-136. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6019595/>
25. 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 Jan; 16(1): e23-e28. DOI: 10.1016/j.ijid.2011.09.012.
26. Hegazy L.A., Salama M.A., Fawzy E.M. et al. Evaluation of Jones' medium culture versus Locke egg medium in diagnosis of *Blastocystis hominis*. *Ann. Roman. Soc. Cell. Biol.* 2021; 25(5): 987-1001. <https://www.annalsofrscb.ro/index.php/journal/article/view/4451>.
27. Santos H.J., Rivera W.L. 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 : 10.1016/S1995-7645(13)60138-8.
28. Padukone S., Mandal J., Rajkumari N. et al. Detection of *Blastocystis* in clinical stool specimens using three different methods and morphological examination in Jones' medium. *Trop Parasitol.* 2018; 7(8): 33-40. DOI: 10.4103/tp.TP_4_18
29. Zerp L.R., Huicho L., Naquira C. et al. A simplified culture method for *Blastocystis hominis*. *Rev. Mex. Patol. Clin. Med. Lab.* 2000; 47(1): 17-19. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2000/pt001d.pdf>.
30. Gabr N., Abdellatif M., Mohamed R. et al. *Blastocystis* spp. infection among IBS patients: various diagnostic methods and epidemiological study. *J. Egyptian Soc. Parasitology.* 2018; 48(1): 119-128. URL : DOI10.21608/jesp.2018.77474.
31. Dageci H., Kurt O., Demirel M. et al. Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in Izmir province, Turkey. *Iran J. Parasitol.* 2014 Oct-Dec; 9(4): 519-29. PMID: 25759733; PMCID: PMC4345091.
32. Melo G., Paula F., Malta F. et al. Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil. *Parasitology.* 2017; Open 3, E3. DOI: 10.1017/pao.2017.3
33. Piekara-Stepinska A., Gorczykowski M., Piekarska J. Suitability of selected culture media for *Blastocystis* spp. *Polish J. Vet. Scien.* 2018; 21(4): 815-817. DOI: 10.24425/pjvs.2018.125593.
34. UK. National Standard Method. Staining Procedures / Health Protection Agency. BSOP TP 39. Is. 1. 2007. 29 p. <http://hemltd.ru/publications/sections/Normativ/foreign/samples/medicine/NHS023/article.pdf>.
35. Garcia L.S., Campbell J.L., Fritsche T.R. et al. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from Intestinal Tract; Approved Guideline - Second Edition. CLSI document M28-A2. 2005; 25(16): 111 p. URL: https://clsi.org/media/1460/m28a2_sample.pdf
36. Pokhil S.I., Tymchenko O.M., Chigirinskaya N.A. et al. Regularities of primary growth of *Blastocystis* sp. in five types of nutrient media. *Annals of Mechnikov Institute.* 2021; 4: 45-53. DOI: 10.5281/zenodo.5761243
37. Shahinian V. R. Kharchenko N. V. Danko O. P. et al. *Blastocystis* spp.: the role in human somatic pathology. *Modern Gastroenterology.* 2020; 4(114): 73-79. DOI: <https://doi.org/10.30978/MG-2020-4-73>