



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ  
ДЕПАРТМАН ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

**ПРЕВАЛЕНЦА И МОЛЕКУЛАРНА  
ТИПИЗАЦИЈА ЗООНОТСКОГ  
ПАРАЗИТА *BLASTOCYSTIS* SP.  
КОД СВИЊА СА ТЕРИТОРИЈЕ  
ВОЈВОДИНЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

**Ментор:**  
Др Весна Лалошевић,  
редовни професор

**Кандидат:**  
Тамаш Шили,  
др вет. мед.

Нови Сад, 2017. године

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	Тамаш Шили
Ментор (титула, име, презиме, звање): МН	Др Весна Лалошевић, редовни професор
Наслов рада: НР	Преваленца и молекуларна типизација зооноског паразита <i>Blastocystis</i> sp. код свиња са територије Војводине
Језик публикације: ЈП	Српски
Језик извода: ЈИ	Српски / Енглески
Земља публикавања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Војводина
Година: ГО	2017.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8

Физички опис рада: ФО	(9 поглавља / 139 страна / 12 слика / 29 табела / 3 дијаграма / 306 референци)
Научна област: НО	Ветеринарска медицина
Научна дисциплина: НД	Ветеринарска микробиологија и заразне болести животиња
Предметна одредница, кључне речи: ПО	<i>Blastocystis</i> , свиње, преваленца, суптип
УДК	
Чува се: ЧУ	Библиотека Пољопривредног факултета, Нови Сад
Важна напомена: ВН	Нема
<p>Извод: ИЗ</p> <p><i>Blastocystis</i> је паразитска протозоа гастроинтестиналног тракта која се виђа код људи и мноштва животиња. Паразит има светску дистрибуцију и представља веома чест налаз у различитим паразитолошким испитивањима. Иако је прошло више од 100 година од када је <i>Blastocystis</i> први пут описан, и поред напора бројних истраживача још увек постоје бројне непознанице око овог микроорганизма. Нека од најважнијих питања јесу да ли <i>Blastocystis</i> узрокује обољења људи и која је улога животиња, односно контакта човек-животиња у епидемиологији инфекције код људи. Све већи број података из епидемиолошких, <i>in-vivo</i> и <i>in-vitro</i> студија јасно указује на <i>Blastocystis</i> као патогени микроорганизам. У природи постоји мноштво генотипова, а новија запажања указују да су људи домаћини великог броја зоонотских генотипова. Изолати <i>Blastocystis</i> sp. су сврстани у генетске варијетете, односно суптипове (ST) од 1-17, на основу молекуларне карактеризације.</p> <p>Висока преваленца овог паразита код свиња и присуство суптипова ST5, али и ST1 и ST3 може бити доказ да су свиње природни резервоар инфекције и да могу бити добар модел у истраживању патогенезе инфекције код људи. Са епидемиолошког аспекта, блиски контакт људи и свиња, било да је реч о интензивном узгоју или малим сеоским домаћинствима, представља ризик у смислу зоонотске трансмисије бластоцистиса. Ова дисертација представља прву епидемиолошку студију о преваленци и молекуларној карактеризацији зоонотског паразита <i>Blastocystis</i> sp. код свиња са територије Србије.</p> <p>У циљу процене преваленце <i>Blastocystis</i> sp. код свиња са територије Војводине, укупно је сакупљено 403 индивидуална узорка фецеса свиња. Узорковање је извршено на укупно 10 фарми за интензивни узгој свиња. Узорци су били распоређени пропорционално броју свиња одређене категорије. Од свих узорака су припремљени нативни размази, који су прегледани светлосним микроскопом. За умножавање паразита у циљу лакше лабораторијске дијагностике примењена је ксенична (не-стерилна) метода <i>in vitro</i> култивације. Све културе су такође прегледане светлосним микроскопом. ДНК је изолована из 48 насумице одабраних узорака у циљу упоређивања перформанси различитих дијагностичких приступа. За 38 насумично одабраних узорака, који су били позитивни при <i>in vitro</i> култивацији, урађена је суптипизација са STS прајмерима специфичним за суптипове очекиване код свиња: ST1, ST2, ST3 и ST5.</p> <p>Нативним прегледом је <i>Blastocystis</i> sp. идентификован у 41,69% узорака, док је</p>	

култивацијом паразит установљен у 70,22% узорака. *Blastocystis* је пронађен код свих категорија свиња, на свих десет фарми. Приликом упоређивања традиционалних паразитолошких дијагностичких поступака и молекуларне дијагностике, установљена је осетљивост директног микроскопског прегледа од 46,15%, односно *in vitro* култивације од 84,62%. При молекуларној суптипизацији од 38 узорака, који су били позитивни у култури у 25 узорака смо установили најмање један од тражених суптипова.

У закључку, установљена висока преваленца бластоцистиса код свиња из интензивног узгоја, потврђује улогу свиња као природних резервоара ове зоонотске протозое. Потврђена је хипотеза да су свиње резервоар одређених зоонотских суптипова *Blastocystis* sp. и да представљају фактор ризика у ширењу инфекције на људе. У највећем броју узорака установљено је присуство суптипа ST1, који је један од најчешће доказаних суптипова код људи. На другом месту по заступљености је био суптип ST5, који представља ризик по људе који су у непосредном свакодневном контакту са свињама, као што су радници на фармама и кланицама. Суптип ST3 који се најчешће доводи у везу са синдромом иритабилног колона (ИБС) је био присутан у 24% узорка, који су били успешно типизирани. Један од закључака ове дисертације је и да су дијагностичке перформансе *in vitro* култивације и молекуларних техника у дијагностици *Blastocystis* sp. код свиња супериорне у односу на традиционални и опште прихваћен нативни преглед фекалног материјала.

Датум прихватања теме од стране Сената: ДП	22.06.2017
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: КО	<p>Председник: _____</p> <p>Др Александар Поткоњак, ванредни професор Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Ментор: _____</p> <p>Др Весна Лалошевић, редовни професор Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: _____</p> <p>Др Огњен Стеванчевић, доцент Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: _____</p> <p>Др Гордана Козодеровић, доцент Педагошки факултет, Сомбор, Универзитет у Новом Саду</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF AGRICULTURE**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Doctoral dissertation
Author: AU	Tamaš Šili
Mentor: MN	Dr Vesna Lalošević, full profesor
Title: TI	Prevalence and molecular typization of zoonotic parasite <i>Blastocystis</i> sp. in pigs from territory of Vojvodina
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2017.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Physical description: PD	(9 chapters / 139 pages / 12 figures / 29 tables / 3 charts / 306 references)
Scientific field: SF	Veterinary medicine
Scientific discipline: SD	Veterinary microbiology and infectious diseases of animals
Subject, Key words: SKW	<i>Blastocystis</i> , pigs, prevalence, subtype
UC	
Holding data: HD	Library, Faculty of Agriculture, Novi Sad
Note: N	None
<p>Abstract: AB</p> <p><i>Blastocystis</i> is a common protist colonizing the gastrointestinal tract of humans and various animals. This parasite has a worldwide distribution and presents a frequent finding in different parasitological surveys. <i>Blastocystis</i> has been described for the first time over a century ago, but despite the efforts of many researchers, there are still many unknowns about this microorganism. Some of the most important questions are whether <i>Blastocystis</i> causes disease in humans and what is the role of animals or the animal-human contact in the epidemiology of human blastocystosis. An increasing number of data from epidemiological, <i>in-vivo</i> and <i>in-vitro</i> studies clearly suggests that <i>Blastocystis</i> is a pathogenic microorganism. In the nature several genotypes exist and contemporary observations are suggesting that humans are hosts for a large number of zoonotic genotypes. Based on molecular characterization, isolates of <i>Blastocystis</i> sp. are classified into genetic variants, so called subtypes (ST) from 1 to 17.</p> <p>High prevalence of this parasite in pigs and the presence of subtypes ST5, ST1 and ST3 suggests that that pigs are a natural reservoir of infection and can be a good model in studying the pathogenesis of infection in humans. The close contact of humans and pigs, whether we speak about intensive farming or small rural households, represents a substantial risk of zoonotic transmission of <i>Blastocystis</i>. This thesis presents the first epidemiological study on prevalence and molecular characterization of zoonotic parasite <i>Blastocystis</i> sp. in pigs from Serbia.</p> <p>In order to assess the prevalence of <i>Blastocystis</i> sp. in pigs from Vojvodina province, a total of 403 individual faecal samples were collected. Samples were collected from 10 intensive growing systems. Samples were taken at random and proportionate to each production category of pigs. Direct wet mounts were made from all samples and examined under a microscope. Xenic (non sterile) <i>in vitro</i> cultivation was used for multiplication and easier diagnosis of the parasite. All cultured samples were also examined under a light microscope. DNA was extracted from 48 randomly selected samples for the purpose of comparison of different diagnostic approaches. 38 randomly selected culture positive samples were subjected to subtyping with STS primer sets for subtypes expected in pigs: ST1, ST2, ST3 and ST5.</p> <p><i>Blastocystis</i> sp. was present in 168 samples when wet mount preparations were analyzed under the microscope, indicating a prevalence of 41.69%. 283 samples were culture positive indicating a prevalence of 70.22%. <i>Blastocystis</i> was found in all the farms included in the study and at all categories of pigs. When we compared the performances of PCR and traditional parasitological techniques the estimated sensitivity of direct wet mount was 46.15%, while the sensitivity of <i>in vitro</i> cultivation was 84.62%. From 38 randomly selected culture positive</p>	

samples we identified one of the sought subtypes (ST1-ST3 and ST5) in 25 samples.

In conclusion, the high prevalence of *Blastocystis* in pigs from intensive growing systems confirms the role of pigs as natural reservoirs of this zoonotic parasite. As hypothesized, our investigation showed the presence of all sought subtypes. ST1 was the predominant subtype, present in 96% (24/25) of samples in which we identified *Blastocystis* with STS primers. ST1 is one of the subtypes most commonly reported in humans, thus a high incidence of this subtype in pigs should not be neglected when we try to evaluate the zoonotic potential. ST5 was identified in 64% samples. ST5 as a potential zoonotic subtype has a significance in industrial swine production, where increased risk of zoonotic transmission exists. ST3 was identified in 24% of samples. This subtype is frequently associated with irritable bowel syndrome (IBS). One of the conclusions of this thesis is that diagnostic performances of *in vitro* cultivation and molecular techniques in diagnosis of *Blastocystis* in pigs, are superior compared to the widely accepted direct faecal smear examination.

Accepted on Senate on: AS	22.06.2017
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: _____</p> <p>Dr Aleksandar Potkonjak, associate profesor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad</p> <p>Mentor: _____</p> <p>Dr Vesna Lalošević, full profesor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad</p> <p>Member: _____</p> <p>Dr Ognjen Stevančević, assistant profesor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad</p> <p>Member: _____</p> <p>Dr Gordana Kozoderović, assistant profesor Faculty of Education, Sombor, University of Novi Sad</p>

## **САДРЖАЈ**

<b>Кратак садржај</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>1. УВОД</b>	<b>1</b>
<b>2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ</b>	<b>4</b>
<b>2.1 КЛАСИФИКАЦИЈА</b>	<b>4</b>
2.1.1. Историја	4
2.1.2. Таксономија	5
2.1.3. Генетска разноликост и специфичност према домаћину	7
<b>2.2. БИЛОГИЈА</b>	<b>11</b>
2.2.1. Морфологија	11
2.2.2. Животни циклус и размножавање	18
<b>2.3. ЛАБОРАТОРИЈСКА ДИЈАГНОСТИКА</b>	<b>20</b>
2.3.1. Микроскопија	20
2.3.2. Култивација	22
2.3.3. Серологија	23
2.3.4. Молекуларна дијагностика	24
2.3.5. Перформансе појединих дијагностичких метода	26
<b>2.4. КЛИНИЧКИ АСПЕКТИ</b>	<b>28</b>
2.4.1. Епидемиологија и преваленца	28
2.4.2. Инфекција и обољење	34
2.4.2.1. Гастро-интестиналне манифестације	34



*Преваленца и молекуларна типизација зооноског паразита *Blastocystis* sp.  
код свиња са територије Војводине*

---

2.4.2.2. Екстра-интестиналне манифестације	40
2.4.2.3. Генетски, морфолошки и остали фактори који утичу на развој инфекције и обољења	41
2.4.3. Патогенеза	44
2.4.4. Терапија	49
<b>2.5. ЗООНОТСКИ ПОТЕНЦИЈАЛ</b>	<b>50</b>
2.5.1 Присуство бластоцистиса код различитих животињских врста и потенцијални утицај на здравље људи	50
2.5.2. Свиње као резервоар бластоцистиса	57
<b>3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА</b>	<b>63</b>
3.1. Утврђивање преваленце бластоцистиса код свиња на територији АП Војводине	63
3.2. Утврђивање присуства субтипова бластоцистиса код свиња на територији Војводине	63
3.3. Упоредивање различитих дијагностичких метода у детекцији <i>Blastocystis</i> sp. код свиња	63
<b>4. ХИПОТЕЗА</b>	<b>64</b>
<b>5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>	<b>65</b>
5.1. Избор и структура узорка	65
5.2. Нативни преглед	68
5.3. <i>In vitro</i> култивација	69
5.4. Молекуларна дијагностика	70
5.4.1. Екстракција ДНК	70
5.4.2. Ланчана Реакција Полимеразе (PCR)	75
5.4.3. Молекуларна суптипизација	75
5.5. Статистичка анализа података	77

*Преваленца и молекуларна типизација зооноског паразита *Blastocystis* sp. код свиња са територије Војводине*

---

<b>6. РЕЗУЛТАТИ</b>	78
6.1. Резултати нативног прегледа и <i>in vitro</i> култивације	78
6.2. Преваленца <i>Blastocystis</i> sp. код свиња на основу резултата различитих дијагностичких метода	85
6.3. Присуство бластоцистиса код различитих категорија свиња	86
6.4. Дистрибуција <i>Blastocystis</i> sp. по различитим регионима и окрузима у Војводини	88
6.5. Дистрибуција <i>Blastocystis</i> sp. по различитим фармама за узгој свиња	91
6.6. Резултати ланчане реакције полимеразе (PCR)	93
6.7. Резултати молекуларне суптипизације изолата	94
6.8. Упоређивање различитих дијагностичких метода у детекцији <i>Blastocystis</i> sp. код свиња	95
<b>7. ДИСКУСИЈА</b>	98
<b>8. ЗАКЉУЧЦИ</b>	114
<b>9. ЛИТЕРАТУРА</b>	115

## Кратак садржај

*Blastocystis* је паразитска протозоа гастроинтестиналног тракта која се виђа код људи и мноштва животиња. Паразит има светску дистрибуцију и представља веома чест налаз у различитим паразитолошким испитивањима. Иако је прошло више од 100 година од када је *Blastocystis* први пут описан, и поред напора бројних истраживача још увек постоје бројне непознанице око овог микроорганизма. Нека од најважнијих питања јесу да ли *Blastocystis* узрокује обољења људи и која је улога животиња, односно контакта човек-животиња у епидемиологији инфекције код људи. Све већи број података из епидемиолошких, *in-vivo* и *in-vitro* студија јасно указује на *Blastocystis* као патогени микроорганизам. У природи постоји мноштво генотипова, а новија запажања указују да су људи домаћини великог броја зоонотских генотипова. Изолати *Blastocystis* sp. су сврстани у генетске варијетете, односно суптипове (ST) од 1-17, на основу молекуларне карактеризације.

Висока преваленца овог паразита код свиња и присуство суптипова ST5, али и ST1 и ST3 може бити доказ да су свиње природни резервоар инфекције и да могу бити добар модел у истраживању патогенезе инфекције код људи. Са епидемиолошког аспекта, блиски контакт људи и свиња, било да је реч о интензивном узгоју или малим сеоским домаћинствима, представља ризик у смислу зоонотске трансмисије бластоцистиса. Ова дисертација представља прву епидемиолошку студију о преваленци и молекуларној карактеризацији зоонотског паразита *Blastocystis* sp. код свиња са територије Србије.

У циљу процене преваленце *Blastocystis* sp. код свиња са територије Војводине, укупно је сакупљено 403 индивидуална узорка фецеса свиња. Узорковање је извршено на укупно 10 фарми за интензивни узгој свиња. Узорци су били распоређени пропорционално броју свиња одређене категорије. Од свих узорака су припремљени нативни размази, који су прегледани светлосним микроскопом. За умножавање паразита у циљу лакше лабораторијске дијагностике примењена је ксенична (не-стерилна) метода *in vitro* култивације. Све културе су

такође прегледане светлосним микроскопом. ДНК је изолована из 48 насумице одабраних узорака у циљу упоређивања перформанси различитих дијагностичких приступа. За 38 насумично одабраних узорака, који су били позитивни при *in vitro* култивацији, урађена је суптипизација са STS прајмерима специфичним за суптипове очекиване код свиња: ST1, ST2, ST3 и ST5.

Нативним прегледом је *Blastocystis* sp. идентификован у 41,69% узорака, док је култивацијом паразит установљен у 70,22% узорака. *Blastocystis* је пронађен код свих категорија свиња, на свих десет фарми. Приликом упоређивања традиционалних паразитолошких дијагностичких поступака и молекуларне дијагностике, установљена је осетљивост директног микроскопског прегледа од 46,15%, односно *in vitro* култивације од 84,62%. При молекуларној суптипизацији од 38 узорака, који су били позитивни у култури у 25 узорака смо установили најмање један од тражених суптипова.

У закључку, установљена висока преваленца бластоцистиса код свиња из интензивног узгоја, потврђује улогу свиња као природних резервоара ове зооноске протозое. Потврђена је хипотеза да су свиње резервоар одређених зооноских суптипова *Blastocystis* sp. и да представљају фактор ризика у ширењу инфекције на људе. У највећем броју узорака установљено је присуство суптипа ST1, који је један од најчешће доказаних суптипова код људи. На другом месту по заступљености је био суптип ST5, који представља ризик по људе који су у непосредном свакодневном контакту са свињама, као што су радници на фармама и кланицама. Суптип ST3 који се најчешће доводи у везу са синдромом иритабилног колона (ИБС) је био присутан у 24% узорка, који су били успешно типизирани. Један од закључака ове дисертације је и да су дијагностичке перформансе *in vitro* култивације и молекуларних техника у дијагностици *Blastocystis* sp. код свиња супериорне у односу на традиционални и опште прихваћен нативни преглед фекалног материјала.

## **Abstract**

*Blastocystis* is a common protist colonizing the gastrointestinal tract of humans and various animals. This parasite has a worldwide distribution and presents a frequent finding in different parasitological surveys. *Blastocystis* has been described for the first time over a century ago, but despite the efforts of many researchers, there are still many unknowns about this microorganism. Some of the most important questions are whether *Blastocystis* causes disease in humans and what is the role of animals or the animal-human contact in the epidemiology of human blastocystosis. An increasing number of data from epidemiological, *in-vivo* and *in-vitro* studies clearly suggests that *Blastocystis* is a pathogenic microorganism. In the nature several genotypes exist and contemporary observations are suggesting that humans are hosts for a large number of zoonotic genotypes. Based on molecular characterization, isolates of *Blastocystis* sp. are classified into genetic variants, so called subtypes (ST) from 1 to 17.

High prevalence of this parasite in pigs and the presence of subtypes ST5, ST1 and ST3 suggests that that pigs are a natural reservoir of infection and can be a good model in studying the pathogenesis of infection in humans. The close contact of humans and pigs, whether we speak about intensive farming or small rural households, represents a substantial risk of zoonotic transmission of *Blastocystis*. This thesis presents the first epidemiological study on prevalence and molecular characterization of zoonotic parasite *Blastocystis* sp. in pigs from Serbia.

In order to assess the prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs from Vojvodina province, a total of 403 individual faecal samples were collected. Samples were collected from 10 intensive growing systems. Samples were taken at random and proportionate to each production category of pigs. Direct wet mounts were made from all samples and examined under a microscope. Xenic (non sterile) *in vitro* cultivation was used for multiplication and easier diagnosis of the parasite. All cultured samples were also examined under a light microscope. DNA was extracted from 48 randomly selected samples for the purpose of comparison of different diagnostic approaches. 38 randomly

selected culture positive samples were subjected to subtyping with STS primer sets for subtypes expected in pigs: ST1, ST2, ST3 and ST5.

*Blastocystis* sp. was present in 168 samples when wet mount preparations were analyzed under the microscope, indicating a prevalence of 41.69%. 283 samples were culture positive indicating a prevalence of 70.22%. *Blastocystis* was found in all the farms included in the study and at all categories of pigs. When we compared the performances of PCR and traditional parasitological techniques the estimated sensitivity of direct wet mount was 46.15%, while the sensitivity of *in vitro* cultivation was 84.62%. From 38 randomly selected culture positive samples we identified one of the sought subtypes (ST1-ST3 and ST5) in 25 samples.

In conclusion, the high prevalence of *Blastocystis* in pigs from intensive growing systems confirms the role of pigs as natural reservoirs of this zoonotic parasite. As hypothesized, our investigation showed the presence of all sought subtypes. ST1 was the predominant subtype, present in 96% (24/25) of samples in which we identified *Blastocystis* with STS primers. ST1 is one of the subtypes most commonly reported in humans, thus a high incidence of this subtype in pigs should not be neglected when we try to evaluate the zoonotic potential. ST5 was identified in 64% samples. ST5 as a potential zoonotic subtype has a significance in industrial swine production, where increased risk of zoonotic transmission exists. ST3 was identified in 24% of samples. This subtype is frequently associated with irritable bowel syndrome (IBS). One of the conclusions of this thesis is that diagnostic performances of *in vitro* cultivation and molecular techniques in diagnosis of *Blastocystis* in pigs, are superior compared to the widely accepted direct faecal smear examination.

## 1. УВОД

*Blastocystis* је паразитска протозоа гастроинтестиналног тракта која се виђа код људи и мноштва животиња (Stenzel и Voreham, 1996; Tan, 2004). Паразит има светску дистрибуцију и представља веома чест налаз у различитим паразитолошким испитивањима. *Blastocystis* је први пут описан у раним 1900-тим годинама (Alexeieff, 1911; Brumpt, 1912), али је тек почетак 21. века донео значајнији помак у разумевању биологије овог једноћелијског организма. Међутим, сама природа паразита и недостатак стандардизације дијагностичких техника су довеле до бројних недоумица а понекад и до потпуно погрешне интерпретације добијених података. Све наведено је у значајној мери отежало лабораторијску дијагностику и успорило напоре у разумевању начина размножавања, животног циклуса, преваленце и патогенезе.

Све већи број података из епидемиолошких, *in-vivo* и *in-vitro* студија јасно указује на *Blastocystis* као патогени микроорганизам. У природи постоји мноштво генотипова, а новија запажања указују да су људи домаћини великог броја зоонотских генотипова (Abe, 2004; Ersfeld, 2003). Висок ниво генетске разноликости је довео до предлога, на основу којег су претходна различита запажања о патогенези паразита резултат постојања патогених и апатогених генотипова (Clark, 1997).

Иако је прошло више од 100 година од када је *Blastocystis* први пут описан, и поред напора бројних истраживача још увек постоје бројне непознанице око овог организма. Нека од најважнијих питања јесу да ли *Blastocystis* узрокује обољења људи и која је улога животиња, односно контакта човек-животиња у епидемиологији инфекције код људи.

*Blastocystis* се може изоловати из пацијената са гастро-интестиналним симптомима, као што су дијареја, мучнина, абдоминални болови, надутост, повраћање и анорексија. Такође, у литератури се спомињу и екстра-интестинални симптоми повезани са присуством бластоцистиса (појава артритиса, уртикарије, ангиоедема), али нема опште прихваћеног консензуса о патогености ове протозое

(Stensvold и Clark, 2016). Присуство асимптоматске инфекције код људи са скоро идентичном преваленцом је такође доказано, што оставља отворено питање о патогеном значају бластоцистиса. Једна од најчешћих у литератури описаних клиничких манифестација присуства бластоцистиса код људи је асоцијација овог микроорганизма и Синдрома иритабилног колона (ИБС) (Poirier и сар., 2012).

*Blastocystis* је осим код људи изолован из водоземаца, рептила, инсеката, бројних врста птица и сисара, мноштва зоолошких животиња, посебно примата. Осим дивљих и зоолошких животиња *Blastocystis* је изолован и из домаћих животиња као што су свиње, живина, преживари и коњи (Alfellani и сар., 2013). Изолати *Blastocystis sp.* су сврстани у генетске варијетете, односно суптипове (ST) од 1-17, на основу молекуларне карактеризације. Суптип ST5, најчешће се изолује из животиња и из људи који раде са животињама, што указује на зоонотски потенцијал овог паразита. Претпоставља се дакле, да инфекције људи потичу од зоонотске трансмисије паразита, јер је само један суптип (ST9) везан само за инфекцију људи. *Blastocystis* се спомиње као чест паразит код свиња у неколико студија које су спроведене у различитим деловима света. Истраживања су потврдила преваленцу бластоцистиса код свиња од 46,8% до 76,7% (Wang и сар., 2014б). Wang и сарадници сматрају да присуство ST5, али и ST1 и ST3 може бити доказ да су свиње природни резервоар инфекције и да могу бити добар модел у истраживању патогенезе инфекције код људи. Иако још недовољно расветљено, са епидемиолошког аспекта, блиски контакт људи и свиња, било да је реч о интензивном узгоју или малим сеоским домаћинствима, представља ризик у смислу зоонотске трансмисије бластоцистиса.

Stensvold и сарадници (2009) су у истом истраживању у којем су повезали ИБС са бластоцистисом, доказали значајну повезаност контакта са свињама и живином и последичне инфекције људи узрочником *Blastocystis*. Из случајног узорка од 126 људи код 19 је утврђено присуство узрочника *Blastocystis*. Од тих 126 испитаника троје је било у контакту са свињама 7 дана пре узорковања столице, и код сво троје (100%) је доказан *Blastocystis*. Navarro и сарадници (2008) су установили преваленцу бластоцистиса код свиња у интензивном систему узгоја од



46,8%, Wang и сарадници (2014б) су доказали преваленцу од 76,7% у интензивном узгоју и 45,2% код свиња у руралној средини. Зооноски значај регистрован је код асимптоматских радника на фарми свиња, где је преваленца бластоцистиса износила 41%, док је код урбаног становништва, без контакта са свињама износила 17% (Rajah Salim и сар., 1999).

Ипак, детерминација зооноског потенцијала бластоцистиса захтева генотипску карактеризацију, без обзира што се фенотипски, културелно и морфолошки, изолати животиња и људи не разликују. Резултати истраживања о преваленци бластоцистиса код свиња и анализа методама молекуларне биологије, директно би омогућила лакше разумевање улоге животиња у екологији и епидемиологији бластоцистиса, односно индиректно би се утврдила повезаност између контакта са животињама и функционалног гастроинтестиналног поремећаја код људи, као што је синдром иритабилног колона.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. КЛАСИФИКАЦИЈА

#### 2.1.1. Историја

Најранији описи и цртежи, који су наводно представљали организам касније назван *Blastocystis hominis*, су они које су дали Brittan (1849) и Swayne (1849). Њих двојица су истраживали и обимно писали о епидемији колере која је погодила Лондон 1849. године. У одвојеним извештајима описали су претпостављене узрочнике колере, које је Swayne описао као „колера телашца“ а Brittan као „ануларне ћелије“. Критичка анализа радова ова два аутора ипак не подупиरे њихове заслуге за откриће *B. hominis*-а. Већина њихових претпоставки је била заснована на погрешном морфолошком запажању, међутим на Brittan-овим цртежима екскрета од пацијената који имају дијареју, могу да се уоче ћелије, које подсећају на *B. hominis*. Kean и сарадници (1978) су сматрали да је за откриће *B. hominis*-а заслужан Fedor Aleksandrovich Lösch, који је открио и микроорганизам *Entamoeba histolytica*. Међутим, извештаји и илустрације Lösch-а не поткрепљују ово откриће (Lösch, 1975). На основу доступних рукописа, већа је вероватноћа да је *B. hominis* открио Perroncito (1899), али ни то откриће није поткрепљено одговарајућом документацијом.

Први рад, који јасно дефинише нови род *Blastocystis* објавио је Alexeieff (1911). Он је осим што је дао детаљан опис о морфологији и животном циклусу, такође предложио назив *Blastocystis enterocola*. Годину дана касније Brumpt (1912) је предложио назив *Blastocystis hominis* за микроорганизам изолован из фекалног материјала човека, а тај назив се задржао у литератури све до данашњег дана. У предстојећих неколико деценија објављен је извештај број радова и извештаја, који су углавном говорили о *B. hominis* изолованом из узорака људске столице, и који су предлагали различите теорије о патогености овог микроорганизама. Осим горе наведеног мало је било познатих чињеница, све док Zierdt и сарадници (1967) нису поново покренули интересовање научне јавности за овај недовољно истражени микроорганизам.

### 2.1.2. Таксономија

*Blastocystis hominis* се на основу морфолошких карактеристика веома лако могао погрешно класификовати. Alexeieff (1911) и Brumpt (1912) су овај нови микроорганизам сврстали међу квасце. Многе дегенерисане ткивне ћелије, биљне ћелије, као и многи артефакти се лако могу окарактерисати као *B. hominis*. Као протозоу са свим карактеристикама ових једноћелијских организама, описали су га Zierdt и сарадници (1967) у претходно наведеном раду. Након прескакања из једне у другу таксономску групу током скоро целог 20. века, *Blastocystis hominis* је превалио пут од квасца до припадника царства *Stramenopila*.

Царство *Stramenopila* представља велику групу еукариота, међутим до данашњег дана садржи свега још једног еукариота инфективног за човека, генус *Pythium* (Stensvold и Clark, 2016). *Blastocystis* не поседује нити једну типичну карактеристику *Stramenopila*, што је један од разлога због којег је таксономска идентификација овог микроорганизма трајала тако дуго. Од момента класификације у царство *Stramenopila* дошло се до одређеног броја закључака по питању најближих сродника блатоцистиса. *Blastocystis* је у најближем сродству са мало познатим флагелатама и цилиатама које настањују дигестивни тракт кичмењака. Док су већина *Stramenopila* слободно живећи аеробни организми, *Blastocystis* и његови „сродници“ живе у цревном тракту домаћина и анаеробни су микроорганизми, иако садрже митохондријалне органеле. Као што је горе наведено *Blastocystis* је атипичан представник *Stramenopila*, које су добиле име по тубуларним длачицама налик на сламке које се могу видети на флагелама или на самој ћелији. *Blastocystis* не поседује ни флагеле, нити тубуларне длачице. Веза са овим царством је направљена помоћу филогенетске анализе секвенце мале субјединице рибосомалног РНК гена (SSU-rDNA) и потврђена секвенцирањем других гена (Agrisue и сар., 2002). Унутар *Stramenopila*, *Blastocystis* је у ближем сродству са генусима *Proteromonadidae* и *Slopalinida* (Kostka и сар., 2007), коменсалима који се често изолују из гмизаваца и водоземаца. Одсуство типичне морфологије *Stramenopila* је више него вероватно последица секундарног губитка одређених морфолошких структура (Clark и сар., 2013).

Описан је велики број морфолошких форми бластоцистиса, међутим по неким ауторима већина тих форми је артефакт настао као последица дејства кисеоника, пре него што такве форме постоје *in-vivo* (Stenzel и сар., 1991; Vdovenko, 2000). Ипак, једногласно се може закључити да је *Blastocystis* сферичног облика, дијаметра око 5-10  $\mu\text{m}$ , са више једара, као и присутном органелом сличном митохондријама и Голџијевим апаратом. Секундарни губитак морфолошких структура је довео до конфузије око номенклатуре врста. Као резултат горе наведеног, врсте бластоцистиса су до недавно добијале називе по домаћинима из којих су изоловани. Најочигледнији пример за то је назив *Blastocystis hominis*, који је примењен код свих бластоцистиса изолованих из човека. Развој молекуларних метода дијагностике средином 1990-их година брзо је открио две ствари: 1. SSU-rDNA ген код бластоцистиса људи је значајно варијабилан; 2. SSU-rDNA ген бластоцистиса присутним у различитим врстама животиња не може да се разликује од истог гена бластоцистиса присутних у људима (Böhm-Gloning и сар., 1997; Clark, 1997) Ово откриће је значило да је биноминални назив врста на основу домаћина неодржив, пошто се један те исти организам називао различитим именима. На пример, једна група *B. hominis* се показала потпуно идентичном са врстом *Blastocystis ratti*, а касније су обе врсте идентификоване као *Blastocystis* ST4, тј. суптип 4.

У наредној деценији, молекуларна анализа бластоцистиса је постала интересантна међу истраживачима у различитим деловима света, који су покушавали да схвате генетску варијабилност овог микроорганизама. Ово је нажалост довело до још веће конфузије, пошто је свака група истраживача осмислила сопствену номенклатуру за класификацију бластоцистиса које су изоловали. Да ствари буду још компликованије, истраживачи су углавном примењивали различите молекуларне методе, од којих су две биле доминантне: SSU-rDNA анализа и STS-ампликација методом ланчане реакције полимеразе (PCR). До 2006. године стручна литература је постала практично непрегледна, као последица различитих класификација на генотипове, групе, подгрупе, суптипове и др. Сва та конфузија је имала за последицу доношење консензуса на предлог Stensvolda и сарадника (2007). Консензусом је предложено да се све врсте

изоловане из птица или сисара, укључујући *Blastocystis hominis*, именују као *Blastocystis sp.*, а да тај назив прати ознака суптипа „ST“ са одређеним бројем у зависности којем суптипу врста припада (пример: ST1, ST3, ST5 итд.). Ову номенклатуру је прихватила већина истраживача, што је довело до одређеног реда у литерарним подацима објављеним после 2007. године.

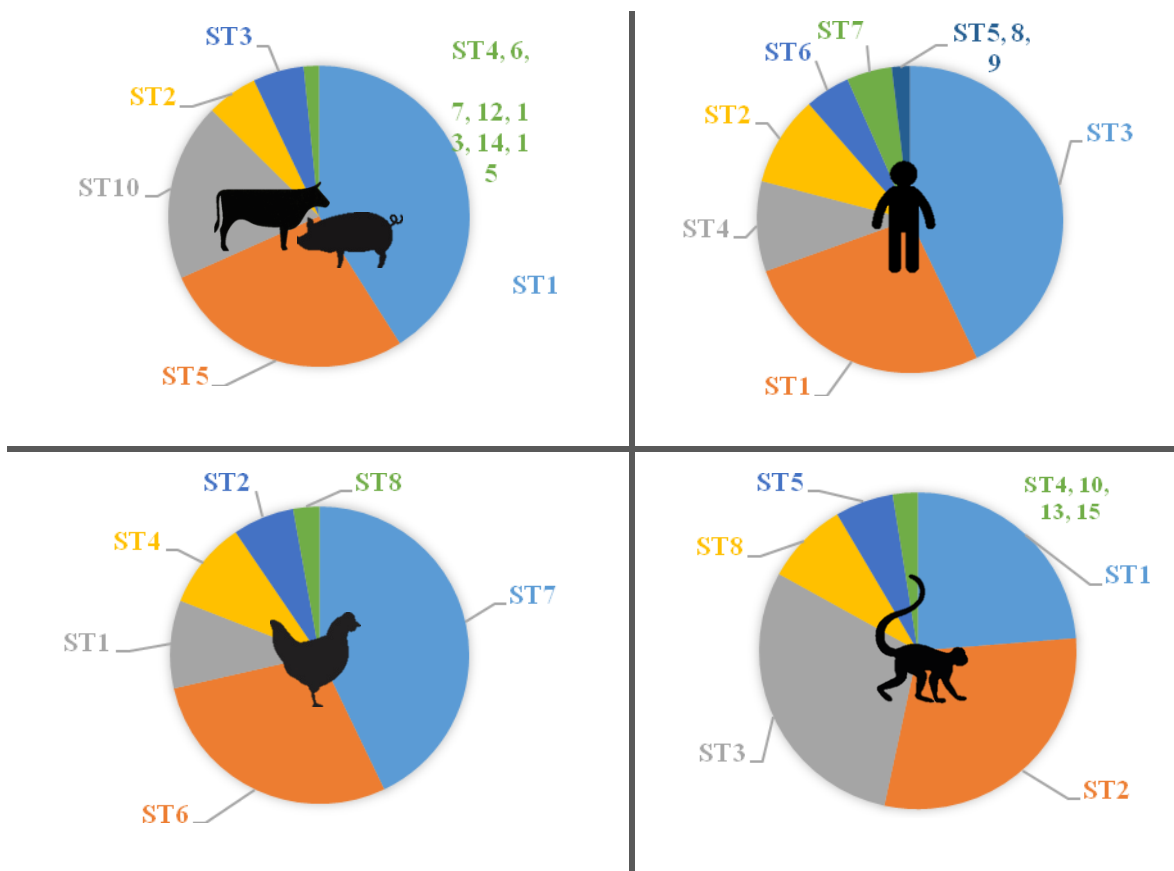
### 2.1.3. Генетска разноликост и специфичност према домаћину

Разлике у генетској структури бластоцистиса могу бити изузетно дискретне, из тог разлога је неопходан посебан опрез приликом објављивања података о претпостављеном новом суптипу. Препорука је да се нови суптип дефинише само у оном случају ако постоји минимум 5% одступања секвенце SSU-rDNA гена у односу на познате суптипове (Stensvold и Clark, 2016). Праг од 5% се препоручује делом из разлога што генетска варијабилност може да буде изражена и унутар самих суптипова, са одступањима чак до 3% (Clark и сар., 2013). У моменту постизања консензуса око номенклатуре бластоцистиса идентификовано је девет субтипова (ST1-ST9). Данас постоје објављени и необјављени подаци о укупно 17 суптипова. Суптипови изоловани из човека и различитих животињских врста, са припадајућим референцама приказани су у *Табели 1*. Код људи је, до данашњег дана, пронађено девет различитих суптипова бластоцистиса. Међутим, 95% људских изолата припада неком од суптипова од ST1 до ST4 (Alfellani и сар., 2013а), само један суптип (ST9) није пронађен ни у једном другом домаћину.

Табела 1. Суптипови бластоцистиса изоловани из различитих група животиња широм света (Alfellani и сар. (2013c))

Домаћин	Субтип																	Референце
	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST11	ST12	ST13	ST14	ST15	ST16	ST17	
<b>Плацентални сисари</b>																		
Homo sapiens	x	x	x	x	x	x	x	x	x									Alfellani и сар. (2013a)
Primates	x	x	x	x	x			x		x			x					Alfellani и сар. (2013b)
Artiodactyla	x	x	x	x	x	x	x			x		x	x	x	x			Stensvold и сар. (2009) Parkar и сар. (2010) Santín и сар. (2011) Tan и сар. (2013) Fayer и сар. (2012) Lee и сар. (2012) Roberts и сар. (2013) Alfellani и сар. (2013c)
Perissodactyla	x				x													Stensvold и сар. (2009) Alfellani и сар. (2013c)
Proboscidea										x								Parkar и сар. (2010) Roberts и сар. (2013)
Carnivora	x	x	x	x			x											Stensvold и сар. (2009) Eroglu и Koltas (2010) Nagel и сар. (2012) Roberts и сар. (2013)
Rodentia			x	x	x												x	Stensvold и сар. (2009) Alfellani и сар. (2013c)
<b>Торбари</b>																		
Didelphimorphia				x														Stensvold и сар. (2009)
Diprotodontia				x								x	x				x	Parkar и сар. (2010) Roberts и сар. (2013)
<b>Птице</b>																		
Anseriformes							x											Stensvold и сар. (2009)
Galliformes	x	x				x	x	x										Stensvold и сар. (2009) Santín и сар. (2011) Roberts и сар. (2013) Alfellani и сар. (2013c)
Ratites		x		x														Roberts и сар. (2013)
Неидентификоване птице	x						x											Eroglu и Koltas (2010)

Тренутно се са сигурношћу може тврдити да је ST9 искључиво хумани суптип. Четири најчешћа хумана суптипа се могу изоловати и из других домаћина. Најчешће ти домаћини су примати, али се могу наћи и у глодарима, птицама, копитарима, односно папкарима (*Дијаграм 1.*).



*Дијаграм 1.* Шематски приказ специфичности према домаћину и релативне преваленце *Blastocystis* суптипова: према Stensvold и Clark, (2016) на основу података које су објавили Alfellani и сарадници (2013c).

На дијаграму 1 приказани су суптипови који су изоловани из четири велике групе домаћина: људи, примата, копитара и папкара, односно птица. Преваленца хуманих субтипова ST1: 28,0%; ST2: 10,9%; ST3: 44,4% и ST4: 10,0%. Ређи хумани суптипови (ST5-ST8) се чешће проналазе у другим домаћинима: ST5 код копитара и папкара; ST6 и ST7 код птица, односно ST8 код примата. Претпоставка је да су наведени ређи хумани суптипови заправо зооноског порекла, за шта постоје и одговарајући докази: ST8 се веома често изолује из радника у зоолошким вртovima,

који су у контакту са приматима (Alfellani и сар., 2013b); ST5 је доминантно присутан код радника у прасилиштима на фармама свиња (Wang и сар., 2014b). Међутим, нема разлога за сумњу да инфекције људи са најчешћим суптиповима (ST1-ST4) потичу од других извора осим људских, осим у изузетним случајевима.

Сматра се да излагање животињама инфицираним бластоцистисом само по себи није довољно за развој инфекције код људи. На пример, ST10 је веома чест субтип код животиња намењених за људску исхрану (Alfellani и сар., 2013c), међутим још увек није изолован код човека. На основу горе наведеног може се претпоставити, да на способност бластоцистиса да колонизује дигестивни тракт људи утиче више фактора, а не само телесна температура како се некад претпостављало. На ефикасну колонизацију велики утицај би могла имати и физиолошка цревна флора човека (Stensvold и Clark, 2016).

Степен генетске разноликости унутар самих суптипова може бити изузетно варијабилан. ST3 је вероватно најваријабилнији од свих боље изучених суптипова, са варијабилношћу од око 3% SSU-rDNA секвенце. ST4 је суптип са најмањом генетском варијабилношћу, нарочито код људи (Stensvold и сар., 2011). Варијабилност унутар ова два суптипа је додатно истражена уз помоћ „multi-locus sequence“ типизације (MLST), технике засноване на варијацијама неколико региона генома митохондријалних органела (Stensvold и сар., 2011). Истраживање варијација унутар суптипова је довело до нових закључака по питању специфичности према домаћину. На пример, ST3 је чест суптип код људи и примата (Alfellani и сар., 2013b). Међутим, MLST анализа је овај суптип сврстала у четири таксономске класе, а скоро сви хумани ST3 изолати су сврстани само у једну класу. Код оних изолата где ово није био случај, људи код којих је доказан овај суптип били су у контакту са приматима, што опет указује на зоонотску трансмисију (Stensvold и сар., 2011). MLST анализа има потенцијал да пружи увид у географске аспекте генетске варијабилности. Међутим, у свету у којем све више расте мобилност популације, географске разлике у генетској варијабилности различитих изолата, се неће моћи јасно разграничити. Све до данас једино је суптипизација пружала доказе о географским разликама дистрибуције



бластоцистиса. Међутим, једино се за ST4 може тврдити да има ограничену дистрибуцију. Овај суптип је редак или одсутан у Јужној Америци, Северној Африци и Средњем Истоку, док у Европи представља други најчешћи суптип. Разлог је за сада непознат, али ако се узме у обзир релативно низак степен генетске варијабилности ST4 код људи, могуће је да је овај суптип тек недавно ушао у људску популацију (Alfellani и сар., 2013а).

## 2.2. БИОЛОГИЈА

### 2.2.1. Морфологија

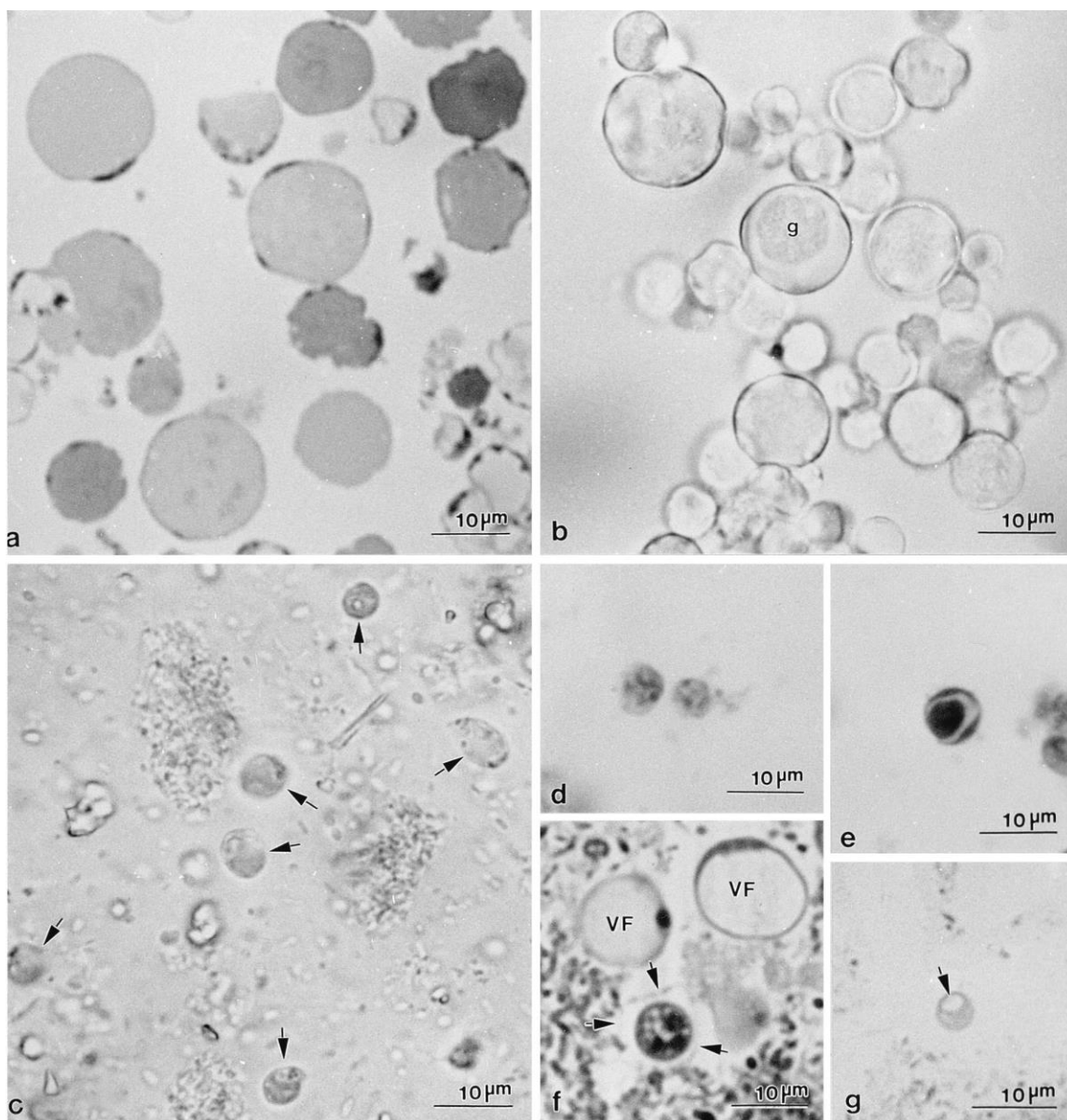
У радовима који се баве морфологијом бластоцистиса из култивисаних узорака обично се говори о три главне форме овог микроорганизма (*Слика 1.*). То су вакуоларна, грануларна и амeboидна форма (Boreham и Stenzel, 1993; Zierdt, 1991; Zierdt и сар., 1967). Известан број радова који описују морфологију бластоцистиса у фекалном материјалу или директно из црева домаћина указују на постојање додатних форми (Boreham и Stenzel, 1993; Mehlhorn, 1988; Stenzel, 1995; Zaman и сар., 1995; Zierdt и Tan, 1976а), али се ове форме не могу срести у радовима чија је главна тема дијагностика.

Светлосна микроскопија је једноставна техника у детекцији бластоцистиса, међутим сви подаци о биологији, морфологији и животном циклусу овог организма су добијени електронском микроскопијом. Ултраструктурна испитивања из 90-тих година прошлог века доказала су главне форме бластоцистиса, које су у извесној мери зависне од фактора спољне средине (Boreham и Stenzel, 1993; Dunn, 1992; Dunn и сар., 1989; Stenzel, 1995). Физички фактори попут промена осмотског притиска, присуства одређених хемијских материја могу утицати на морфологију овог микроорганизма у условима *in vivo* и *in vitro*.

Варијабилност морфолошких форми може у значајној мери утицати на дијагностику, пошто се *Blastocystis* у фекалном материјалу обично идентификује као сферична форма, дијаметра 10-15  $\mu\text{m}$ , са великом централном вакуолом. Међутим, неки аутори сугеришу да управо ова форма није та која доминира у

свежем фекалном материјалу (Stenzel, 1995). Присуство мањих форми, укључујући мултивакуоларне и цистичне форме (дијаметра око 5  $\mu\text{m}$ ) у фекалном материјалу (Boreham и Stenzel, 1993; Mehlhorn, 1988; Stenzel, 1995; Zaman и сар., 1995), указује да многе инфекције бластоцистисом могу проћи неопажене током рутинског лабораторијског прегледа. Недостатак информација о формама бластоцистиса, осим вакуоларне, и разноликост морфологије организма унутар једног узорка у значајној мери компликује идентификацију, чак и за искусно лабораторијско особље (Stenzel и Boreham, 1996).

**Вакуоларна и грануларна форма.** Вакуоларна форма бластоцистиса се сматра типичном ћелијском формом овог организма. Ова форма је најопштије прихваћена као форма од дијагностичког значаја (Ash и Orihel, 1990; Garcia и Bruckner, 1993). Вакуоларна форма доминира у култури, а налази се и приликом директног прегледа фекалног материјала (Matsumoto и сар., 1987; Zierdt и сар., 1967). Грануларна форма поседују ултраструктуру сличну вакуоларној форми, осим морфолошки и цитохемијски различите централне вакуоле (Dunn и сар., 1989; Matsumoto и сар., 1987). Вакуоларна и грануларна форма се не посматрају као две различите форме, пре се сматра да је грануларна форма у суштини вакуоларна са гранулама одређене структуре у централној вакуоли.



**Слика 1.** Различити морфолошки облици блатоцистиса. а) вакуоларна форма у лабораторијској култури; б) грануларна форма у лабораторијској култури; с) мале вакуоларне и мулти-вакуоларне (обележене стрелицама) форме у свежем фекалном материјалу; д) мале мултивакуюларне форме у свежем фекалном материјалу; е) мала вакуоларна форма у свежем фекалном материјалу; ф) форма цисте у лабораторијској култури; г) циста у свежем фекалном материјалу (према Stenzel и Boreham, 1996).

Вакуоларна и грануларна форма су обично ћелије сферичног облика, мада се ћелије неправилног облика могу често срести у културама. Значајна је хетерогеност у ултраструктури вакуоларних и грануларних форми различитих изолата, али структура појединачних форми је стабилна и конзистентна, чак и након продужене *in vitro* култивације (Dunn и сар., 1989). Димензије вакуоларних форми у великој

мери варирају, од 2  $\mu\text{m}$  (van Saanen-Ciurea и El Achachi, 1985) до чак 200  $\mu\text{m}$  (Zierdt и Tan, 1976b) у дијаметру, са просечним дијаметром ћелија између 4 и 15  $\mu\text{m}$  (Zierdt, 1991). Грануларне форме су често веће у односу на вакуоларне, дијаметра од 10 до 60  $\mu\text{m}$  (Zierdt и сар., 1967).

Вакуоларне и грануларне форме поседују танак појас цитоплазме око велике централне вакуоле. Дугачки цитоплазматски изданци, који често садрже органеле, могу проминирати ка централној вакуоли код вакуоларних форми присутних у фекалном материјалу (Stenzel, 1995; Suresh и сар., 1995). Претпоставља се да инвагинирани цитоплазматски филаменти учествују у апоптози организма, међутим ове твдње још увек нису у потпуности доказане (Tan и Nasirudeen, 2005).

Постоје знатне варијације у морфологији садржаја централне вакуоле. Код вакуоларне форме, централна вакуола је обично садржи фини грануларни или флокулентни материјал, који је у вакуоли распоређен неједнако (Dunn и сар., 1989). Код грануларне форме централна вакуола може садржати неколико различитих морфолошких типова гранула. Изворно, предлагана су два различита типа гранула на основу светлосне микроскопије. Претпостављало се да се једна врста гранула развија у ћелију ћерку, док друга врста гранула има метаболичку функцију (Zierdt и сар., 1967). Касније је електронском микроскопијом утврђено да у ћелијама постоји три врсте гранула: метаболичке, липидне и репродуктивне (Tan и Zierdt, 1973). Zierdt (1973) је описао метаболичке грануле у цитоплазми, липидне грануле у централној вакуоли и цитоплазми, док је репродуктивне грануле лоцирао у централној вакуоли. Dunn и сарадници (1989) су описали мијелинске инклузије, мале везикуле, кристалоидне грануле и липидне капљице у централној вакуоли грануларне форме. Липидне капљице су такође уочили и у цитоплазми. Грануле које су уочене у централној вакуоли такође се могу уочити у малим везикулама и вакуолама грануларних ћелија (Dunn и сар., 1989; Yoshikawa и сар., 1988).

Према неким ауторима централна вакуола има функцију у ендодиогенији и шизогонији кроз развој репродуктивних гранула (Zierdt, 1988; Zierdt, 1991). Ова истраживања нису потврђена, а већа је вероватноћа да су грануле у централној

вакуоли резултат метаболизма или складиштења унутар ћелије (Dunn и сар., 1989; Stenzel и сар., 1989). Предлози о томе да су грануле у ствари митохондрије (Zierdt, 1991) су одбачени на основу морфолошких доказа. Осим функције складиштења, централна вакуола игра значајну улогу у програмираној ћелијској смрти организма (Nasirudeen и сар., 2001).

Површински омотач, који се негде спомиње као слузави омотач или капсула (Zierdt и сар., 1967), може обухватити ћелије бластоцистиса у култури. Површински омотач варира у дебљини и морфологији (Dunn и сар., 1989; Yoshikawa, 1988), и може бити промењен при лабораторијској култивацији. Он временом постаје све тањи или пак нестаје након дужег времена култивације (Stenzel, 1995).

Ћелијске органеле се обично налазе у задебљаним деловима цитоплазме, често на супротним половима ћелије. Ова подручја цитоплазме могу проминирати у централну вакуолу (Dunn и сар., 1989; Zierdt, 1991) или пак пружати се ка окружењу, при чему ћелија добија неправилан облик (Dunn и сар., 1989). Већина органела је прост представник своје врсте. Органеле митохондријалног типа, које варирају у облику и димензијама, обично садрже мали број сакуларних кристи (Dunn и сар., 1989). Голџијев комплекс се налази у близини ћелијског једра, и обично има неколико цистерни са припадајућим везикулама (Dunn и сар., 1989; Yoshikawa, 1988).

Ћелије у лабораторијским културама могу имати више једара, до четири се сматра уобичајеним у литератури (Dunn и сар., 1989; Matsumoto и сар., 1987; Zierdt, 1973). Једро је дијаметра око 1  $\mu\text{m}$ , обавијено је једровим омотачем на којем се налазе поре (Stenzel, 1995; Yoshikawa, 1988; Yoshikawa и сар., 1988). У једру се може видети полумесечаста појас (Dunn и сар., 1989), а повремено и додатна тачка електронски-непрозрачног материјала (Boreham и Stenzel, 1993).

У литератури је представљен изванредан број начина деобе вакуоларне и грануларне форме (Boreham и Stenzel, 1993; Jiang и He, 1993; Zierdt, 1991). Међутим, једино је бинарна деоба потврђена као начин размножавања

бластоцистиса. Ћелије се обично деле на два једнака дела, са дистрибуцијом органела у обе половине (Dunn и сар., 1989; Matsumoto и сар., 1987; McClure и сар., 1980).

**Амебоидна форма.** Амебоидне форме се срећу знатно ређе у односу на вакуоларну и грануларну форму. Оне су неправилног облика и обично су дијаметра око 10  $\mu\text{m}$  (Tan и Zierdt, 1973) Иако је присуство једне или две псеудоподе карактеристично за ове форме, оне су ипак непокретне (Tan, 2008). Цитоплазма може садржати једну велику вакуолу (сличну централној вакуоли) или неколико мањих вакуола (Tan и Suresh, 2006a). Singh и сарадници (1995) су претпоставили да вакуоларна форма прелази у интермедијерну амебоидну форму пре трансформације у форму цисте. У тој интермедијерној амебоидној форми се храни бактеријама у циљу прикупљања хранљивих састојака. Како се амебоидне форме све чешће изолују из пацијената са дијарејом, претпоставка је да је амебоидна форма уствари патогена форма овог микроорганизма (Zhang и сар., 2012a; Tan и Suresh, 2006b). Као последица малих димензија и сличности са неутрофилима и макрофагима, ове форме се лако превиде приликом рутинског прегледа столице.

**Цистична форма.** Ова форма је најскорије описани облик овог паразита. Форме цисте су сферичног или овалног облика, димензија мањих од вакуоларне и грануларне форме. Цисте изоловане код људи су обично дијаметра 3-6  $\mu\text{m}$  и не прелазе дијаметар од 10  $\mu\text{m}$ , док су цисте које се срећу код животиња нешто крупније (Stenzel и сар., 1997; Zaman и сар., 1995). Јединствена особина ове форме јесте присуство дебелог вишеслојног зида. Осим зида, новоформирану цисту може обухватати и површински омотач вакуоларне форме од које настаје или пак може бити присутна као огољена циста без омотача (Zaman и сар., 1998; Zhang и сар., 2003). Цитоплазма је густе конзистенције са варијабилним бројем митохондрија, липидних и гликогенских вакуола. Цисте које су изоловане из људи су обично двоједарне, мада број једара варира између један и четири (Stenzel и Voreham, 1991). Циста представља форму која омогућава паразиту да преживи у неповољним условима животне средине. Доказано је да форма цисте представља

трансмисибилну инфективну форму, која се приликом уласка у пријемчивог домаћина развија у вакуоларну форму (Мое и сар., 1999; Yoshikawa и сар., 2004а).

Истраживања су доказала да се свака вегетативна форма може слободно трансформисати у другу вегетативну форму, у насумичном и непрекидном процесу који се дешава *in vivo*. Као резултат непрекидне трансформације у свежем фекалном материјалу се обично налази обиље различитих интермедијерних форми бластоцистиса. Пошто се могу наћи у најразличитијим облицима, морфологија интермедијерних форми се тешко може окарактерисати, тако нису ретки превиди у дијагностици овог микроорганизма (Zhang и сар., 2003). Иако се класичне вакуоларне и грануларне форме најчешће користе у постављању дијагнозе помоћу светлосне микроскопије, скорија истраживања су довела у питање њихов *in vivo* значај. Vdovenko (2000) је применом посебне технике бојења демонстрирао да су живи организми из свежих култура обојени униформно. Организми који су обојени после извесног времена у култури су приказивали вакуоларну и грануларну структуру са смањеним интензитетом бојења. На основу ових запажања, аутор предлаже теорију о дегенеративној природи грануларне и вакуоларне форме. У овом контексту, друге форме као што су авакуоларна и мулти-вакуоларна добијају на свом значају.

**Авакуоларна и мулти-вакуоларна форма.** Ове форме су мањих димензија, дијаметра 5-8  $\mu\text{m}$ , без екстремних варијација у димензијама. Авакуоларна форма је лишена централне вакуоле, док мулти-вакуоларна форма поседује већи број малих вакуола различитих димензија, које су међусобно повезане или се налазе засебно унутар цитоплазме (Stenzel и сар., 1991). Ове форме обично поседују једно, али могу имати и два једра. Нуклеус авакуоларних форми је већих димензија од једара у другим морфолошким облицима (Stenzel и Boreham, 1996). Старије теорије су сматрале ове форме интермедијерним формама које настају током трансформације, а новија запажања указују на то да су авакуоларна и мулти-вакуоларна форма предоминантне форме *in vivo* и да често пролазе незапажено током рутинског лабораторијског прегледа (Мое и сар., 1999; Stenzel и сар., 1991). Различите морфолошке форме бластоцистиса су приказане у табели 2.

**Табела 2.** Различите морфолошке форме бластоцистиса и њихова појава (према Parija и Jeremiah, 2013).

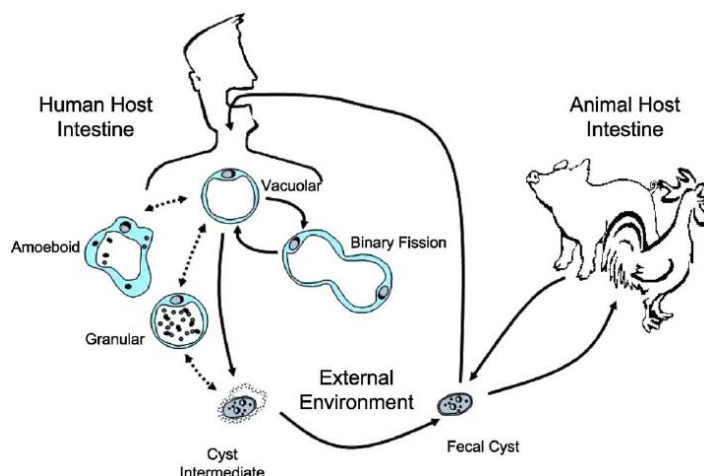
Морфолошка форма	Појава
<b>Вакуоларна форма</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Најчешћа форма у свежем фекалном материјалу.</li> <li>- Најчешћа форма у ксеничним културама: Jones-ов медијум, Locke-ов медијум, Boesck &amp; Drobhlav медијум.</li> <li>- Најчешћа форма у аксеничним културама: RPMI 1640, Medium 199, Dulbesso модификовани Eagle медијум.</li> <li>- Једина форма која формира цисте <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>.</li> </ul>
<b>Грануларна форма</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Честа форма у свежем фекалном материјалу.</li> <li>- Трансформација вакуоларне у грануларну форму <i>in vitro</i> као последица високих концентрација серума у култури, аксенизације, продужене инкубације култура итд.</li> </ul>
<b>Амебодна форма</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Све чешћи налаз код симптоматских пацијената.</li> <li>- Може се доказати на агару са додатком тиогликолата.</li> </ul>
<b>Авакуоларна и мулти-вакуоларна форма</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Чест налаз у свежем фекалном материјалу симптоматских пацијената, али се често превиди због малих димензија и недовољног познавања морфологије.</li> <li>- Може се видети култури у раној фази инкубације, после извесног времена се трансформише у вакуоларну форму.</li> </ul>
<b>Цистична форма</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Чест налаз у старијим узорцима и културама.</li> <li>- Може се доказати у културама којима се додају средства за енцистацију.</li> <li>- Може се доказати у културама са додатим антипротозоалним средством.</li> </ul>

### 2.2.2. Животни циклус и размножавање

Животни циклус бластоцистиса још увек није расветљен са сигурношћу, делом због недостатка одговарајућег лабораторијског животињског модела. Међутим, нека нагађања и погрешне опсервације из прошлости су успешно оповргнуте. Студије инфективности на BALB/с мишевима и Wistar пацовима су доказале да су цисте једине трансмисибилне форме бластоцистиса, које се преносе фекално-оралним путем (Yoshikawa и сар., 2004а; Мое и сар., 1997). Доказано је преношење инфекције на пријемчивог домаћина преко хигијенски неисправне пијаће воде, као и путем конзумације биљака које су контаминирани цистама овог паразита (Lee и сар., 2012; Li и сар., 2007). Новије студије су доказале могућност преношења инфекције рукама запрљаним контаминираним тлом (Anuar и сар., 2013). Након дигестије, цисте се развијају у вегетативне форме искључиво у пријемчивим домаћинима. Даљи ток животног циклуса зависи од компатибилности суптипа и домаћина. Циста пролази кроз фазу ексцистације у дебелом цреву, при чему се ослобађа вакуоларна форма (Мое и сар., 1997). Вакуоларна форма се може



трансформисати у било коју другу форму. Чести налази амебоидних, авакуоларних и мулти-вакуоларних форми код пацијената са дијарејом, указују да ове форме играју улогу у патогенези (Zhang и сар., 2012а). Вакуоларне форме се у лумену црева поново трансформишу у цисте, које се путем фецеса луче у спољну средину. Схематски приказ претпостављеног животног циклуса бластоцистиса приказан је на **Слици 2**.



**Слика 2.** Претпостављени животно циклус бластоцистиса. Инфекција почиње ингестијом цисте. Циста се трансформише у вакуоларну форму која подлеже бинарној деоби. Вакуоларна форма енцистира и излучује се у спољну средину. Транзиција из осталих форми у форму цисте је недовољно расветљена па је приказана испрекиданим линијама. (Tan, 2004)

Разни аутори су писали о својим запажањима на тему размножавања бластоцистиса. Предложени су разни начини размножавања, као што су бинарна деоба, пупљење, мултипла деоба, плазмотомија, ендодиогенија и шизогонија (Zhang и сар., 2007). Међутим, једино је бинарна деоба вакуоларних форми у потпуности потврђена као метод репродукције (Мое и сар., 1999). Новија истраживања које су обавили Zhang и сарадници (2012а) пак потврђују и пупљење и плазмотомију као репродуктивне процесе карактеристичне за *Blastocystis*. Ранија запажања, на основу којих постоје цисте дебелог и танког зида, које подлежу мултиплој деоби у циљу ослобађања ћелија ћерки су непотпуна због недостатка чврстих научних доказа (Tan, 2008). Могућа улога репродуктивних гранула у ендодиогенији и шизогонији није доказана, пошто ови начини размножавања нису детаљније испитивани (Stenzel и Boreham, 1996).

## 2.3. ЛАБОРАТОРИЈСКА ДИЈАГНОСТИКА

Као и код већине паразита, за доказивање бластоцистиса развијене су и директне и индиректне дијагностичке методе. Директне методе су засноване на морфологији (микроскопија) и детекцији ДНК (PCR) или антигена (имунофлуоресценција, ELISA, и др.), док су индиректне методе углавном засноване на детекцији антитела (индиректна имунофлуоресценција, индиректна ELISA)(Verweij и Stensvold, 2014). Иако је употребљивост серологије у индиректном доказивању инфекције бластоцистисом за сада нејасна, неки аутори су применили серолошке технике у испитивању квантитативних разлика у имунолошком одговору између симптоматских и асимптоматских појединаца (Zierdt и сар., 1995; Nagel и сар., 2015).

Разноврсни директни дијагностички приступи са варијабилном сензитивношћу су у великој мери отежали напоре у доказивању клиничког значаја бластоцистиса (Stensvold и сар., 2009b; Stensvold, 2013a; Scanlan и Stensvold, 2013). Молекуларне методе које су развијене у циљу доказивања бластоцистиса из ДНК екстраховане директно из узорака столице су указале на недостатке традиционалних паразитолошких метода за доказивање цисти протозоа или јаја хелмината, метода култивације и трајног бојења фиксираних размаза столице (Stensvold и сар., 2007a; Stensvold и сар., 2006; Poirier и сар., 2011).

### 2.3.1. Микроскопија

Упркос томе што је примарни избор у дијагностици бластоцистиса широм света, корисност директног микроскопског прегледа је ограничена у клиничким паразитолошким лабораторијама, клиничким и епидемиолошким студијама. За то постоји неколико разлога: 1) микроскопија концентрованог фекалног материјала показује ниску осетљивост у детекцији бластоцистиса (Stensvold и сар., 2007a; Roberts и сар., 2011); 2) не постоји консензус о значају броја или присуству различитих морфолошких форми; 3) применом микроскопског прегледа не може да се направи разлика између генетски различитих варијетета, односно суптипова који у великој мери могу варирати по клиничком значају. Ипак, микроскопија може

послужити у сврху потврде присуства бластоцистиса у разним узорцима, који нису хуманог порекла. На пример Londoño-Franco и сарадници (2014) су успешно применили микроскопију у доказивању бластоцистиса у различитим узорцима из животне средине, као што су храна, вода и разни неживи објекти.

Неколико студија су поставиле праг у погледу броја *Blastocystis* микроорганизама у микроскопском видном пољу, изнад којег се узорци проглашавају позитивним. Тај праг обично износи 5 ћелија у видном пољу при увећању од 40x. Ипак, овакав приступ није оправдан због могућности да се различите форме бластоцистиса излучују из организма у неправилном временском размаку, као и броју паразита (Vennila и сар., 1999). Штавише, неколико фактора могу да утичу на број видљивих организама у једном видном пољу. На пример, да ли се ради о свежем или конзервисаном узорку.

Слаба осетљивост микроскопије концентрованих фекалних узорака вероватно потиче од дезинтеграције бластоцистиса током техничке припреме узорака, али треба имати у виду и одсуство консензуса по питању различитих морфолошких облика. Не постоје тачне одреднице за идентификацију вакуоларних, грануларних, авакуоларних, мулти-вакуоларних, амебоидних и цистичних форми, а постоји и могућност да су неке од ових форми вештачке творевине настале као последица разних фактора, као што је на пример присуство кисеоника (Stensvold, 2015). Изненађујућа је чињеница да се форма цисте, која је највероватније одговорна за трансмисију, релативно ретко описује и може захтевати посебне процедуре за детекцију (Rene и сар., 2009). Дијагностичке лабораторије би требале укључити и фекалне цисте бластоцистиса међу индикаторе инфекције. По потреби цисте се могу селективно концентровати у циљу повећања осетљивости микроскопије (Zaman, 1996 ; Zaman и Khan, 1994).

*Blastocystis* се релативно лако идентификује микроскопирањем неколико микролитара позитивне културе, па се не очекује специфичност мања од 100%. Насупрот прегледу култура на присуство бластоцистиса, преглед трајно обојених препарата фекалног размаза изискује извесне вештине и рутину. На пример при

бојењу методом по Giemsa, паразити као што су *Blastocystis* и *Dientamoeba* лако могу да се замене са леукоцитима или епителним ћелијама, што може да се догоди и најјесућнијим паразитолозима. У дијагностици бластоцистиса трихром бојење се чешће користи од методе по Giemsa, али без молекуларне потврде, оцена перформанси различитих метода дијагностике се мора узети са резервом (Stensvold, 2015). Бојење трихромом је рутинска техника која се користи у многим паразитолошким лабораторијама. Доказано је да је у дијагностици интестиналних протозоа трихром техника бојења трајних препарата осетљивија од бојења свежих фекалних размаза јодом, што је случај и са бластоцистисом (Özçakir и сар., 2007; Termmathuraroј и сар., 2004).

### 2.3.2. Култивација

Ксенична *in vitro* култура (XIVC) је метода култивације уз присуство неидентификоване бактеријске флоре. *Blastocystis* може да расте и размножава се у великом броју ксеничних култура (Clark и Diamond, 2002; Leelayoova и сар., 2002). Због једноставног састава и ниске цене, Jones-ов медијум је заступљенији у детекцији и одржавању културе бластоцистиса. Такође, Jones-ов медијум је у широкој употреби због своје једноставности и економичности, али бројне друге хранљиве подлоге су погодне за култивацију бластоцистиса (Clark и Diamond, 2002). Други медијуми, који су често у употреби су Робинсонов и LYSGM (варијација TYSGM-9 медијума) (Clark и Diamond, 2002; Stechmann и сар., 2008), нарочито ако је циљ добијање великог броја ћелија. Култивација у Jones-овом медијуму као дијагностичка процедура има осетљивост између 52% и 79% у поређењу са real-time PCR протоколима (Poirier и сар., 2011; Stensvold и сар., 2012).

Мало је познато о факторима који потенцијално утичу на осетљивост културе као дијагностичког метода. Међу ове факторе се убрајају време протекло од узорковања до култивације, врста медијума за култивацију, односно да ли у медијуму долази до ексцистације и подједнаке амплификације различитих суптипова. Svensson (1935) је указао на чињеницу да *Blastocystis* одлично расте у подлогама које садрже скроб (посебно уз присуство бактерија које хидролизују

скроб). Тако употреба подлоге која садржи скроб (Jones-ов медијум не садржи скроб) може утицати на већу осетљивост култивације. Дуготрајна култивација може фаворизовати одређени суптип ако се ради о мешаној инфекцији, међутим искуства по том питању су ограничена (Parkar и сар., 2007).

Аксеничне културе, односно културе у којима *Blastocystis* расте без присуства било којег другог живог организма, омогућавају бујно размножавање овог паразита. Постоји више комерцијалних и модификованих аксеничних подлога, које омогућавају раст и размножавање бластоцистиса. Аксеничне културе бластоцистиса су важне у молекуларним и биохемијским студијама. Аксенизација се постиже додавањем коктела антибиотика у подлогу, у циљу елиминације бактерија и гљивица. Процес је захтеван и дуготрајан (може трајати недељама, па чак и месецима) а елиминација микробиолошке контаминације није загарантована. Осим тога, постоје сугестије да извесни изолати захтевају присуство бактерија да би преживели, па тако аксенизација доводи до смрти паразита (Zierdt, 1991).

Раст бластоцистиса је могућ и у течном агару уз додатак натријум-тиогликолата (Тап и сар., 1996). Ћелије бластоцистиса се могу размножавати и на чврстим подлогама, а паразитски клонови имају макроскопски изглед сличан бактеријским колонијама (Тап и сар., 2000).

Zhang и сарадници (2012б) промовишу употребу култивације као дијагностичке методе из простог разлога, што се вакуоларна морфолошка форма која је доминантна у условима *in vitro* тешко може погрешно класификовати. Приликом *in vitro* култивације, форме (грануларна, амебоидна и цистична форма) које се често могу заменити са другим паразитима, прелазе у типичне вакуоларне форме (Zhang и сар., 2007).

### 2.3.3. Серологија

Корисност Ag-ELISA и имунофлуоресцентних тестова у детекцији бластоцистиса, укључујући комерцијалне китове као што су: *ParaFlor B* (Boulder Diagnostics, Boulder, CO, USA), *coproELISA™ Blastocystis* (Savyon Diagnostics,

Ashdod, Israel) и *Blasto-Fluor* (Antibodies Inc., Davis, CA, USA), је до сада непотврђена. Ови тестови су до сада коришћени у ограниченом броју студија са веома релативно малим бројем прегледаних узорака (Fayer и сар., 2012; Dogruman-AI и сар., 2010; El-Marhoumy и сар., 2015; Gould и Boorom, 2013; Dogruman-AI и сар., 2015). Примену ових тестова ограничава и непознаница о распону суптипова које детектују.

Инфекције бластоцистисом доводе до имунолошког одговора у коме доминирају имуноглобулини Г (IgG) и имуноглобулини А (IgA) класе, који се могу детектовати индиректном имунофлуоресценцијом и ELISA техником. Kaneda и сарадници (2000) су имунофлуоресценцијом доказали присуство антитела против бластоцистиса код асимптоматских носиоца паразита, мада је ниво детектованих антитела био релативно низак. Са друге стране хронично инфициране индивидуе су као налаз имале високе нивое антитела, што указује на константну изложеност антигену који изазива имунолошки одговор.

Ако се узме у обзир да *Blastocystis* поседује веома изражену генетску и антигенску разноликост, резултати серолошких тестова се морају посматрати са извесном задршком. Антигенске варијације могу бити узрок дискрепанција између различитих студија и морају се узети у обзир приликом развоја нових серолошких тестова. Због ограничених сазнања о имуном одговору на *Blastocystis* и већ поменуте антигенске разноликости, тренутно није оправдано укључивање серолошких тестова у рутинску лабораторијску дијагностику, већ би је требало ограничити на серо-епидемиолошке студије (Tan, 2008).

#### 2.3.4. Молекуларна дијагностика

Први дијагностички PCR протокол за *Blastocystis* су описали Stensvold-а и сарадници 2006. године (Stensvold и сар., 2006), међутим нешто касније се појавила сумња да овај протокол преферира амплификацију одређених суптипова у односу на друге. Од тада су објављена три дијагностичка протокола за *real-time* PCR са валидацијама за различити број суптипова (Jones и сар., 2008; Poirier и сар., 2011; Stensvold и сар., 2012). Употреба *real-time* PCR технике, која омогућава

квантификацију *Blastocystis* специфичне ДНК у узорцима, је од помоћи у доказивању повезаности интензитета инфекције и развоја симптома.

Ако се уобзир узму претпоставке да је симптоматско обољење узроковано бластоцистисом везано за одређене суптипове, укључивање тих суптипова у дијагностичке PCR панеле би било корисније него уопштено доказивање бластоцистиса. Постоје суптип-специфични PCR протоколи, а такође се може применити и тзв. „barcoding“ уз примену генеричких прајмера (Scicluna и сар., 2006; Stensvold, 2013b). До данашњег дана, PCR методе су развијене и валидоване искључиво на хуманим клиничким узорцима и према тврдњама Stensvold-а и Clark-а (2016) не постоје валидовани протоколи за детекцију бластоцистиса из других узорака.

Као последица генетске разноликости бластоцистиса (Alfellani и сар., 2013c; Parkar и сар., 2007; Clark, 1997) развијен је велики број метода за потребе молекуларно епидемиолошких студија. Међу овим методама нарочито су заступљене две. Прва је PCR протокол који користи STS прајмере (sequence-tagged-site), који су развијени раних 1990-их година (Yoshikawa и сар., 2004b). Овај приступ подразумева примену седам PCR реакција, по једну за сваки суптип од 1 до 7. Свака реакција се може посматрати као посебан поступак за одређени суптип, што омогућава идентификацију без секвенцирања генома. Други метод подразумева анализу SSU rDNA варијација. Овај метод је развијен од стране неколико различитих истраживачких група, које су користиле различите регионе SSU rRNA гена као маркере (Stensvold и сар., 2007a; Stensvold и сар., 2006; Stensvold и сар., 2010; Özyurt и сар., 2008; Stensvold и сар., 2009b; Parkar и сар., 2007; Parkar и сар., 2010; Santín и сар., 2011; Wong и сар., 2008). Претходно поменути „barcoding“, који су развили Scicluna и сарадници 2006. године је један од примера ове методе. „Barcoding“ користи RD5 и BhRDr прајмере, који амплификују 600 базних парова SSU rRNA гена. Поређење ове две методе је показало предност на страни „barcoding“-а из неколико разлога (Stensvold, 2013b). Најважнији разлог је, да „barcoding“ омогућава детекцију других суптипова осим ST1-7 и представља валидовани маркер генетске разноликости бластоцистиса (Parkar и сар., 2007).

Недостатак „barcoding“-а у односу на STS методу је потреба за накнадним секвенцирањем генома. Надаље, мешане инфекције нису увек евидентне на хроматограму, а када то и јесу, релативно тешко их је интерпретирати (Stensvold, 2013b). Са друге стране „barcoding“ омогућава суптилније анализе, то јест анализе SSU rDNA алела (Parkar и сар., 2007).

Упркос брзом развоју и све већој доступности, употреба молекуларних метода дијагностике је још увек релативно скупа и захтевна по питању опреме и уложеног рада. Потребно је развити једноставне, јефтине методе које лако диференцирају различите суптипове и омогућавају обраду великог броја узорака (Stensvold, 2015).

### 2.3.5. Перформансе појединих дијагностичких метода

Elghareeb и сарадници (2015) су упоредили различите методе за детекцију бластоцистиса на 1200 узорака столице од пацијената са дијарејом из Египта, и доказују широк обим дијагностичке осетљивости. Према њиховим подацима 22,8% ( $n = 274$ ) узорака је било позитивно применом ксеничне *in vitro* култивације, 12,3% је било позитивно применом бојења трихромом, 10,0% применом FECT методе, 6,0% бојењем методом по Луголу и 3,5% узорака је било позитивно директним микроскопским прегледом размаза столице. Према ауторима ксенична култивација је једина метода којом су успешно идентификоване све морфолошке форме паразита, укључујући и форму цисте. Интересантна је чињеница, да Elghareeb и сарадници пишу о присуству цисти у култури, где се иначе очекује ексцистација при анаеробној инкубацији на температури од 37° C (Stensvold, 2015).

Технике попут *real-time* PCR метода које су описали Poirier и сарадници, односно Stensvold и сарадници (Stensvold и сар., 2012; Poirier и сар., 2011), или „barcoding“-а описаног од стране Scicluna-е и сарадника (2006) показују високу осетљивост, па тако осетљивост култивације у поређењу са поменутиим молекуларним методама износи од 52 до 79%. Према бројним ауторима, насупротив *in vitro* култури, концентрација формол-етил-ацетатом (FECT) показује ниску осетљивост за детекцију паразита (Stensvold и сар., 2007a; Stensvold и сар., 2006;



Suresh и Smith, 2004). Дobar пример који иде у прилог овој тврдњи је налаз преваленце бластоцистиса од свега 0,19% у једном истраживању спроведеном у централном Тајланду, које је користило искључиво FECT технику као дијагностичку методу (Saksirisampant и сар., 2006). Друга студија у истом региону, која је користила низ дијагностичких приступа (директан размаз, FECT, култивацију у Boesk & Drbohlav медијуму и модификовано трихром бојење) је доказала преваленцу од 45,2% (Saksirisampant и сар., 2003).

Постоји већи број студија које су се бавиле компарацијом различитих метода дијагностике бластоцистиса. Stensvold и сарадници (2007a) извештавају о дијагностичким перформансама FECT-а, трајног бојења трихромом, *in vitro* културе и молекуларних техника. PCR дијагностика се показала супериорним у односу на све остале технике, са осетљивошћу сличној култури. Termmathuraroј и сарадници (2004), са друге стране, указују на супериорност *in vitro* култивације у односу на PCR методу, када се дијагностика ради директно из узорака столице. Истраживање коју су спровели Parkar и сарадници (Parkar и сар., 2007) пак тврди супротно. Ови аутори су уз помоћ PCR методе, директно из узорака столице доказали преваленцу од 35%, у односу на свега 19% позитивних узорака културе. Могућа објашњења за разлике у резултатима ове две групе аутора је да су Parkar и сарадници користили Jones-ов медијум за култивацију фецеса различитих животиња, а тај медијум не подржава раст апсолутно свих варијетета. Надаље, разлог за разлику може бити и ефикаснија екстракција ДНК од стране потоње групе аутора. Друга објашњења укључују и различиту специфичност PCR прајмера, који су коришћени у овим студијама (Stensvold и сар., 2007a). Stensvold и сарадници (2006) извештавају о PCR протоколу који омогућава брзу идентификацију бластоцистиса у свежим узорцима столице. Резултати указују на супериорност PCR-а у односу на FECT. Међутим у неколико случајева узорци негативни у култури су били PCR позитивни. Аутори су ову појаву приписали деградацији паразита у столици или малом броја паразита што је онемогућило *in vitro* раст. Једно од могућих објашњења је и присуство паразита који су толико ретки и неупадљиви да се просто превиде приликом микроскопирања узорка културе. Случајеви када су узорци позитивни у култури а негативни применом неке од молекуларних техника могу се приписати недовољној

или непотпуној екстракцији ДНК из узорака столице. Yoshikawa и сарадници (2011) су испитали ефикасност пет различитих комерцијалних китова за екстракцију ДНК из фецеса у молекуларној дијагностици хуманих суптипова бластоцистиса. Два кита су искључена из даљег испитивања већ при прелиминарном тестирању, наиме ова два комерцијална кита нису успела да детектују позитивне контроле. Преостала три кита за екстракцију су примењена на по 50 клиничких узорака позитивних у култури. Процент PCR позитивних узорака је износио 10% (5/50), 48% (24/50) и 94% (47/50). Резултати ових аутора указују на немогућност појединих китова да у потпуности уклоне инхибиторе PCR амплификације.

## 2.4. КЛИНИЧКИ АСПЕКТИ

### 2.4.1. Епидемиологија и преваленца

Објављена су бројна истраживања о преваленци бластоцистиса код људи широм света. Публиковани су подаци о преваленци између 0,5% и 62%. Проблем са оваквим подацима је да се они обично односе на изабране популације, па самим тим не дају праву епидемиолошку слику. Ретка су она епидемиолошка истраживања која посматрају довољно велики и разноврсни узорак одређене популације за недвосмислено доношење закључака, међутим већина студија се интерпретира управо тако. Добра илустрација је случај, када се у једној земљи спроведе више од једног епидемиолошког истраживања. На пример, у Малезији истраживање које су спровели Suresh и сарадници (2001) доказало је преваленцу од 15%, док су Noor Azian и сарадници (2007) доказали преваленцу од 52%. У Турској, Köksal и сарадници (2010) пишу о преваленци од 2%, док Östan и сарадници (2007) пријављују преваленцу од 14%. Потоња група аутора је посматрала школску децу, од којих су многа живела у лошим животним условима импровизованих насеља, док су Köksal и сарадници (2010) изучавали присуство бластоцистиса код одрасле популације. Примењене лабораторијске технике у ова два истраживања су биле мање више једнаке. У Малезији две групе истраживача су као предмет истраживања посматрали такође две потпуно различите популације, урбану

популацију престонице и припаднике једне домородачке руралне насеобине. Осим тога, једна група је применила различите дијагностичке поступке, док је друга група користила искључиво директну микроскопију. Дакле у обе земље испитаници су били демографски потпуно различити, и ни у једном случају се те групе не могу посматрати као типични представници целокупне популације. Дијагностичке процедуре такође представљају сигнификантну променљиву, која може утицати на добијене резултате. Amin (2002) је на основу прегледаних узорака столице од укупно 2.896 пацијента из 48 држава САД-а саопштио преваленцу од 23%, са тенденцијом раста у односу на период од претходне две деценије. Резултати се морају узети са резервом, пошто је примењена искључиво једна дијагностичка метода, а узорци су потицали из рутинских прегледа али и од пацијената који су имали промене у учесталости столице, губитак снаге, или промене варења након путовања на даље дестинације и сл.

Недостатак епидемиолошких података је представљао проблем за ране истраживаче, који су се бавили бластоцистисом. Међутим, број истраживања о преваленци овог паразита константно расте од почетка 21. века, што у извесној мери баца светло на дистрибуцију генотипова, начине преношења и патогенезу. *Blastocystis* је убиквитаран микроорганизам са светском дистрибуцијом (Jelinek и сар., 1997; Tan, 2004). Није редак случај да је управо *Blastocystis* најизолованији паразит у епидемиолошким истраживањима. Преваленца варира између различитих земаља, па чак и између различитих популација унутар исте земље. Генерално посматрано земље у развоју имају више преваленцу у односу на развијене земље. Ова разлика у преваленцама се приписује неповољним хигијенским условима, контакту са животињама и конзумацији контаминиране хране или воде. Преваленца може бити ниска у земљама као што је Јапан (0.5-1%) (Hirata и сар., 2007; Horiki и сар., 1997) и Сингапур (3.3%) (Wong и сар., 2008) и висока у земљама у развоју као што су Аргентина (27.2%) (Basualdo и сар., 2007), Бразил (40.9%) (Aguilar и сар., 2007), Куба (38.5%) (Escobedo и сар., 2005), Египат (33.3%) и Индонезија (60%) (Pegelow и сар., 1997).

У појединим земљама број позитивних налаза може бити изузетно варијабилан, у зависности од испитиване суппопулације. Преваленце се крећу између 1,9-32,6% у истраживањима спроведеним у Кини (Li и сар., 2007b); 0,19-45,2% на Тајланду (Saksirisampant и сар., 2003; Saksirisampant и сар., 2006) или од 1,04 до 18,3% у истраживањима у Турској (Akdemir и Helvacı, 2007; Culha, 2006). Овакве варијације унутар једне државе могу јасно указати на разлике између појединих суппопулација, посебно ако се примењују исте дијагностичке процедуре. Међутим, варијације у резултатима лако могу настати као последица неунформности дијагностичких процедура и својственог проблема морфолошке класификације самог микроорганизма. Све је више оних истраживача које примењују молекуларне технике у епидемиолошким студијама. Оваква истраживања расветљавају дистрибуцију генотипова у хуманој и животињској популацији, а такође пружају информације о путевима преношења и изворима инфекције. Yoshikawa и сарадници (2004b) су применом PCR методе класификовали и одредили генотипску дистрибуцију изолата из Бангладеша, Немачке, Јапана, Пакистана и Тајланда. Осим Тајланда у свим другим земљама доминирао је ST3 (41,7-92,3%) а отприлике у истом проценту су били присутни ST1 (7,7-25%) и ST6 (10-22,9%). Слична дистрибуција генотипова је доказана у Сингапуру (Wong и сар., 2008), Кини (Li и сар., 2007b), Грчкој (Menounos и сар., 2008), Немачкој (Boöhm-Gloning и сар., 1997) и Турској (Özyurt и сар., 2008). Forsell и сарадници (2012) су генетску разноликост бластоцистиса испитали у узорцима 68 пацијената са подручја Стокхолма (Шведска), и успешну типизирали 5 суптипова: ST1 (15,9%), ST2 (14,3%), ST3 (47,6%), ST4 (20,6%) и ST7 (1,6%). У циљу описивања молекуларне епидемиологије инфекција бластоцистисом у Италији, Mattiucci и сарадници (2015) су применом молекуларних метода прегледали 189 изолата бластоцистиса, који су сакупљени у периоду од 2012. до 2014. године. Изолати су водили порекло од пацијената са благим интестиналним симптомима, пацијената са инфламаторним обољењем црева и синдромом иритабилног колона, пацијената са хроничном дијарејом, односно пацијената са неким обликом имуносупресивног стања. Аутори су доказали присуство укупно 6 суптипова: ST1 (15,3%), ST2 (13,8%), ST3 (46,0%), ST4 (21,7%), ST6 (3,2%) и ST8 (0,5%).

Истраживања откривају да је већина појединаца заражена једним од суптипова бластоцистиса, међутим релативно често се пише и о мешаним инфекцијама са два или више суптипова. У зависности од студије мешане инфекције се виђају у распону од 1,1 до 14,3% случајева. Већина коинфекција је са суптиповима 1 и 3 (Li и сар., 2007a; Li и сар., 2007b; Thathaisong и сар., 2003; Yan и сар., 2006), док се ређе пријављују коинфекције са суптиповима 1 и 2, 2 и 3 (Li и сар., 2007a; Li и сар., 2007b), односно 3 и 5 (Yan и сар., 2007).

Различити аутори дају различити патолошки значај бластоцистису, и још увек не постоји консензус о клиничком значају овог микроорганизма. Извесне популације могу бити пријемчивије на поремећаје које су повезани са бластоцистисом, а међу факторе ризика спадају имуно-компромитована здравствена стања, слабе хигијенске навике, имиграција и путовање из/у земље у развоју, блиски контакт са животињама и конзумација контаминиране хране и/или воде.

Известан број истраживања је доказао вишу инциденцу бластоцистиса код имуно-компетентних појединаца са гастроинтестиналним поремећајима него код асимптоматске групе индивидуа (El-Shazly и сар., 2005; Graczyk и сар., 2005; Kaya и сар., 2007; Leelayoova и сар., 2004; Miller и сар., 2003; Minvielle и сар., 2004; Nimri и Meqdam, 2004; Yakoob и сар., 2004). Занимљив је резултат више инциденце бластоцистиса код пацијената са алергијским обољењима коже (Özçakir и сар., 2007). Пацијенти инфицирани ХИВ-ом такође показују већу преваленцу бластоцистиса (Albrecht и сар., 1995; Brites и сар., 1997; Cirioni и сар., 1999; Florez и сар., 2003; Gassama и сар., 2001; Hailemariam и сар., 2004; Zali и сар., 2004). У извесном броју тих студија присуство паразита је повезано са неспецифичним симптомима као што су абдоминални болови, дијареја и надутост, док према Albrecht-у и сарадницима (1995) *Blastocystis* није у вези са дијарејом пацијената оболелих од АИДС-а. Виша инциденца изолације бластоцистиса је уочена код појединаца на имуносупресивној терапији, као што су лица са трансплантацијом бубрега (Ok и сар., 1997; Özçakir и сар., 2007) и деца на кортикостероидној терапији (Noureldin и сар., 1999). Код пацијента са хематолошким малигнитетима,

који су добијали хемотерапију, *Blastocystis* је био најчешће изолован паразит, а повезиван је абдоминалним боловима, дијарејом и надутотошћу (Tasova и сар., 2000). Инфекција бластоцистисом се често среће код деце са различитих географских подручја и све је већи број епидемиолошких и студија случаја, које указују на то да инфекција бластоцистисом узрокује гастро-интестинална обољења у овој суппопулацији. (al-Tawil и сар., 1994; Andiran и сар., 2006; Bratt и Tikasingh, 1990; Devera и сар., 1998; Graczyk и сар., 2005; Martin-Sanchez и сар., 1992; Miller и сар., 2003; Nimri, 1993; Sinniah и Rajeswari, 1994). Најновија истраживања рађена у Војводини, о повезаности хроничног колитиса код деце и присуства бластоцистиса у столицама, показала су статистички већу учесталост колитиса и хроничне инфламаторне болести црева код деце хоспитализоване због пролива и бола у трбуху која су била инфицирана бластоцистисом (Стојшић Мирјана, докторска дисертација, 2016). El-Marhoumy и сарадници (2015) су испитивању подвргли узорке фецеса од 300 деце из Египта, узраста од две до пет година. Узорци су прегледани различитим техникама бојења, а 30 узорака је било прегледано применом теста имунофлуоресцентних антитета. Утврђена је преваленца од 53%, са већом заступљеношћу паразита код дечака узраста четири до пет година. Паразитемија је била виша код симптоматских него код асимптоматских носиоца, што према ауторима потврђује патогени значај бластоцистиса. El Safadi и сарадници (2014) су пријавили највишу икад пријављену преваленцу бластоцистиса од 100%, и то код деце са територије слива реке Сенегал. Постоји све већи број доказа, који указују на то да је *Blastocystis* патогени или опортунистички узрочник, а да су имуно-компромитоване популације пријемчивије према инфекцији и поремећајима везаним за инфекцију.

Инфекције узрочником *Blastocystis* су честе међу припадницима различитих занимања која подразумевају контакт са животињама, што потврђује зоонотску природу овог микроорганизма. Међу ризичном популацијом се налазе људи који рукују храном (Amin, 1997; Danchaivijitr и сар., 2005; Khan и Alkhalife, 2005; Requena и сар., 2003; Sadek и сар., 1997), као и радници у зоолошким вртovima и кланицама (Parkar и сар., 2007; Rajah Salim и сар., 1999).

Велики је број студија преваленце које указују на контаминирану воду као извор инфекција бластоцистисом, што и не чуди када је познато да је трансмисибилни облик бластоцистиса водоотпорна циста (Мое и сар., 1996). *Blastocystis* је био најчешће изоловани интестинални паразит у истраживању спроведеном на Тајланду међу припадницима војске, са учесталошћу од 21,9% (Таамасри и сар., 2000). Овако висока преваленца је повезана са конзумацијом нефилтриране и термички необрађене воде за пиће. Ли и сарадници (2007) су молекуларном анализом узорака столице 238 насумице изабраних појединаца из села провинције Yunnan (Кина) утврдили висок степен инфекције од 32,6%. Уочено је да је конзумација водених биљака повезана са инфекцијама суптипом 1, а конзумација непрокуване воде са инфекцијама суптипом 3. Ово је прва студија која је испитивала повезаност суптипова и путева преношења инфекције, те је су даља истраживања неопходна за доношење једногласних закључака.

Једно од кључних питања у биологији бластоцистиса је да ли је обољење везано за одређене генетске варијетете. Литерарни подаци нису једногласни по том питању. Капета и сарадници (2001) су подвргли генеотипизацији изолате из асимптоматских и пацијената са гастро-интестиналним симптомима. Њихови резултати указују да су суптипови 1, 4 и 2 повезани са симптомима, док најчешће изоловани суптип 3 није био повезан са симптомима. У сличној студији, извршена је генотипизација изолата из 28 пацијената са гастро-интестиналним поремећајима и 16 асимптоматских индивидуа (Hussein и сар., 2008). Суптип 1 је доказан искључиво код симптоматских пацијената, док су суптипови 3 и 6 пронађени код обе групе. Суптип 7 је доказан само код асимптоматских појединаца. Hussein је са својим сарадницима закључио да је ST1 највирулентнији, док суптипове 3 и 6 чине патогени и апатогени сојеви узрочника. Студија спроведена у Кини је такође повезала ST1 са обољењем, док је ST3 доминирао код асимптоматских носиоца (Yan и сар., 2006). Насупрот наведеним ауторима, поједини истраживачи нису пронашли никакву везу између обољења и генетског варијетета паразита. Böhm-Glönig и сарадници (1997) су анализирали 158 изолата и установили да је популација инфицирана са пет различитих генотипова без сигнификантне повезаности било којег субтипа са гастроинтестиналним обољењима.

Молекуларном типизацијом изолата из асимптоматских и симптоматских пацијената из Бангладеша, није доказана никаква повезаност између обољења и генотипа, мада се треба узети у обзир чињеница да је испитано свега 26 узорака (Yoshikawa и сар., 2004b). Dogruman-A1 и сарадници (2008) су у узорцима из једне турске болнице доказали присуство суптипова 1, 2 и 3 код одраслих и педијатријских пацијената. Само је суптип 2 показивао статистички сигнификантну разлику у дистрибуцији између симптоматских и асимптоматских пацијената, са већом заступљеношћу у асимптоматској групи. Souppart и сарадници (2009) су у истраживању спроведеном у Француској, подвргли испитивању 40 узорака столице који су били позитивни у микроскопском прегледу. Клиничка слика је била испољена код 25 пацијената код којих је доказан бластоцистис, док преосталих 15 пацијената није показивало симптоме инфекције. У циљу молекуларне анализе ДНК је екстрахована директно из фекалног материјала или лабораторијских култура фецеса. Генотипизацијом је утврђено укупно 43 изолата који су припадали субтипovima 1, 2, 3, 4 и 7 са доминацијом субтипа 3 (53.5%). Није било могуће повезати симптоматски статус пацијената са суптипом бластоцистиса.

Један од разлога за овако различите закључке може бити и начин на који се резултати интерпретирају. Већина аутора тражи статистичке разлике у дистрибуцији суптипова између асимптоматских и симптоматских група (Böhm-Gloning и сар., 1997; Dogruman-A1 и сар. 2008; Yan и сар., 2006; Yoshikawa и сар., 2004b), док други аутори претпостављају да су патогени суптипови присутни у обе групе, а да њихова патогеност зависи од варијација унутар самог суптипа (Hussein и сар., 2008; Kaneda и сар., 2001). Dogruman-A1 и сарадници (2008) су предложили да је сигурније идентификовати апатогене суптипове, пошто се ови суптипови доследно проналазе у већим пропорцијама код асимптоматских носиоца. Потребан је већи број истраживања са већим узорцима да би се недвосмислено могли повезати поједини суптипови и настанак обољења. Генотипизација изолата из епидемија би свакако олакшала идентификацију патогених суптипова бластоцистиса (Tan, 2008). Ако се погледају сва истраживања о патогености, може се закључити да је најмање један суптип повезан са клиничким обољењем (ST1), док су ST2 и ST3 највероватније апатогени суптипови бластоцистиса.



## 2.4.2. Инфекција и обољење

### 2.4.2.1. Гастро-интестиналне манифестације

Иако су први писани подаци о бластоцистису стари више од 100 година, улога овог микроорганизама у људском здрављу остаје нејасна. *Blastocystis* је повезиван са бројним органским и функционалним поремећајима дигестивног тракта, али је присутан у скоро истом броју асимптоматских случајева. Међутим, то не значи да *Blastocystis* не узрокује обољење. Слична ситуација се среће код *Giardia*, где су многе инфекције асимптоматске (Tellevik и сар., 2015) или код *Entamoeba histolytica*, где је проценат симптоматских случајева највише 10% (Pritt и Clark, 2008). Већина објављених радова повезује *Blastocystis* са симптомима, али то није увек случај. Stensvold и Clark (2016) указују на две веома важне чињенице које се морају узети у обзир приликом тумачења литерарних података: 1) одређивање одговарајуће контролне групе у епидемиолошким истраживањима је изузетно проблематично; 2) готово је немогуће искључите остале етиолошке агенсе или не-инфективне узроке гастро-интестиналних поремећаја.

Карактеристична гастро-интестинална патологија је недвосмислено повезана са цревним протистима као што су *Giardia*, *Cryptosporidium* и *Entamoeba*, док мало је доказа о директном патолошком дејству бластоцистиса. Фагоцитоза црвених крвних зрнаца је добро позната карактеристика *Entamoeba histolytica* која је у корелацији са вируленцијом; али само један рад говори о фагоцитози код бластоцистиса (Dunn и сар., 1989). До сада нису идентификовани протеини, као што су гликопротеини или лектини, који би омогућили везивање бластоцистиса за епител цревног тракта, међутим Depoed и сарадници (2011) су претпоставили да хидролазе бластоцистиса могу променити мукозни слој слузнице дебелог црева. Лалошевић и сарадници (1998) дали су приказ случаја 11-тогодишње девојчице са патохистолошком дијагнозом улцерозног колитиса и налазом бластоцистиса у столицама. Након терапије метронидазолом, тегобе су нестале а морфолошке промене мукозе су се повукле, што иде у прилог тези да постоји повезаност између инфекције, патохистолошког и клиничког налаза.

Један од најчешћих, у литератури описаних, клиничких знакова код људи инфицираних бластоцистисом је Синдром иритабилног колона (ИБС) (Poitier и сар, 2012). За то постоје најмање два разлога. Један од њих је да пацијенти којима је дијагностикован синдром иритабилног колона према извесним студијама показују већу стопу инфицираности бластоцистисом (Giacometti и сар, 1999; Jimenez-Gonzalez и сар, 2012; Yakoob и сар, 2004, 2010). Други разлог је то што су симптоми, који се приписују инфекцији са бластоцистисом веома слични оним симптомима, који карактеришу извесне форме ИБС-а (дијареја, повраћање, абдоминални болови и надутост), што указује на то да *Blastocystis* може бити непосредни узрочник у неким случајевима ИБС-а или да се мора уврстити у диференцијалну дијагностику етиологије овог обољења.

Синдром иритабилног колона (ИБС) је често присутан гастро-интестинални поремећај, којег карактеришу абдоминални бол са дијарејом и/или констипацијом. Етиологија ИБС-а није у потпуности разјашњена. ИБС се изворно сматрао психосоматским поремећајем (Levy и сар., 2000), међутим скорија истраживања су показала хроничну имуну активацију код пацијената са ИБС-ом (Liebregts и сар., 2007). Директни и индиректни трошкови везани за ИБС у Сједињеним Америчким Државама износе око 30 милијарди долара на годишњем нивоу, чинећи ову болест најскупљим гастро-интестиналним поремећајем у САД-у и другим развијеним земљама (Hulisz, 2004). За разлику од гастро-ентеритиса вирусне или бактеријске етиологије, ИБС може трајати доживотно (Lembo и сар., 1996). Преваленца ИБС-а у појединим земљама у развоју се креће у распону 35-43% (Schmulson и сар., 2006; Quigley и сар., 2006).

Присуство бластоцистиса у организму без сумње указује на феко-оралну експозицију, па се може закључити да је ИБС вероватно повезан барем са фекалном експозицијом, ако не и са самим бластоцистисом. Студије спроведене у Европи и Блиском Истоку су показале да је отприлике 30-40% ИБС пацијената носиоци бластоцистиса (Boorum и сарадници, 2008). Stensvold и сарадници (2009а) су у студији, која је укључивала 126 појединаца случајно одабраних из опште

популације, доказали преваленцу бластоцистиса од 19% и сигнификантну повезаност са ИБС-ом.

Релативна преваленца симптома као што су абдоминални бол, дијареја и констипација код инфекција бластоцистисом и ИБС-а показује сличну тенденцију (Wilson и сар., 2004; Camilleri и сар., 2008). Висока преваленца *Blastocystis* инфекција наизглед прати високу преваленцу ИБС-а (Hirata и сар., 2007; Boivin, 2001; Lagace-Wiens и сар., 2006; Hungin и сар., 2005; Cruz Licea и сар., 2003; Guimaraes и сар., 1993). Поједини аутори чак указују на *Blastocystis* као директног узрочника ИБС-а (Giacometti и сар., 1999; Hussaini сар., 1997). Међутим, неодређеност патогености овог паразита отежава његово систематско повезивање са одређеним патолошким стањем.

*Blastocystis* је један од неколико микроорганизама, који су повезивани са синдромом иритабилног колона (ИБС), укључујући и пост-инфективни ИБС (Collins, 2014; Kennedy и сар., 2014; Beatty и сар., 2014). Poirier и сарадници (2012) су анализом генома идентификовали различите гене, који кодирају хидролазе односно серин и цистеин протеазе. Аутори су претпоставили да су управо то фактори вируленције, који могу иницирати ИБС тако што доводе до промена у мукозном слоју црева.

Кауа и сарадници (2007) су из испитивања искључили оне пацијенте код којих је осим бластоцистиса дијагностикован још неки патогени узрочник. Тако су евалуацији клиничких симптома подвргли само оне пацијенте (n=52) са *Blastocystis* моноинфекцијом. Интестинални симптоми (абдоминални бол, дијареја и надутост) су забележени у 88,4% (46/52) случајева. Абдоминални болови су представљали најчешћи симптом (76.9%), затим је следила дијареја са 50%, односно надутост са 32,6%. 39 од 46 пацијената позитивних на *Blastocystis*, који су имали гастро-интестиналне симптоме су подвргнути испитивању и након терапије метронидазолом. Гастро-интестинални симптоми су нестали код 36 пацијената, а од 26 пацијената са дијарејом њих 24 је показало побољшање при поновном прегледу, без присуства паразита у столицама. Аутори закључују да се гастро-

интестинални симптоми срећу често при инфекцији бластоцистисом и да се овај микроорганизам може сматрати патогеним, нарочито ако су искључени остали потенцијални узрочници.

Das и сарадници (2016) су применом различитих дијагностичких метода (укључујући молекуларну типизацију) испитивали повезаност бластоцистиса и његових суптипова са синдромом иритабилног колона на групи пацијената са дијагностикованим ИБС-ом (n=150) и контролној групи (n=100) здравих појединаца. Укупно су идентификовали 65 изолата, 50 из ИБС групе и 15 из контролне групе. Они су установили да је 91% изолата припадало суптипу 3, док је преосталих 9% изолата припадало суптипу 1. Статистички значајна повезаност је запажена између бластоцистиса и ИБС-а, међутим ниједан суптип се није могао повезати са неким од клиничких презентација ИБС-а.

Stensvold и сарадници (2011) су дијагностиковали *Blastocystis* код 25 од укупно 444 пацијента са акутном дијарејом. Преглед на паразите обично није саставни део дијагностичког поступка код акутне дијареје управо из разлога што је присуство паразита чешће код перзистентних дијареја, па самим тим не изненађује овако ниска преваленца бластоцистиса. Међутим, интересантно је да је већина изолата припадала суптипу 4. Овакав налаз је у супротности са претходним резултатима, на основу којих су асимптоматске контролне групе углавном колонизоване бластоцистисима суптипова 3 и 4 (Stensvold и сар., 2009а). Hussein и сарадници (2008) нагађају о постојању патогених и апатогених варијанти ST3 и ST4. Dominguez-Marques и сарадници (2009) су установили доминацију ST4 (94,1%) код пацијената, који су патили углавном од акутне дијареје. За разлику од осталих суптипова, који се често јављају код људи, главни резервоар суптипа 4 јесу глодари.

Yakoob и сарадници (2004) су у своју студију укључили укупно 150 пацијената, 95 са дијагнозом ИБС-а и 55 појединаца у контролној групи. Пацијенти су подвргнути клиничком испитивању, колоноскопији, прегледу директног размаза столице и културе фецеса. Директан размаз столице је био позитиван на *Blastocystis*

код 32% (30/95) пацијената са ИБС-ом, и код 7% (4/55) припадника контролне групе. *In vitro* култура је била позитивна код 46% (44/95) симптоматских пацијената и 7% (4/55) контролне групе. Насупрот овим резултатима, Tungtrongchitr и сарадници (2004) нису пронашли никакву повезаност ИБС-а и инфекције бластоцистисом.

Студије које тестирају хипотезу о повезаности бластоцистиса са ИБС-ом углавном полазе од претпоставке, да ако је микроорганизам повезан са обољењем требао би да је чешћи налаз код пацијената са симптомима ИБС-а. Резултати оваквих истраживања су различити, па претходно наведени доказују вишу преваленцу бластоцистиса код ИБС пацијената, док неки резултати говоре да нема разлике или чак говоре о нижој преваленци овог микроорганизма код пацијената којима је дијагностикован ИБС. Тако Krogsgaard и сарадници (2014) пријављују нижу преваленцу бластоцистиса код пацијената са ИБС-ом, од 14,5% (n=189) у односу на здраву контролну групу 22% (n=297). Petersen и сарадници (2011; 2013) су установили сигнификантно нижу преваленцу *Blastocystis* код пацијента са ХИБЦ-ом (5/100) у односу на здраву контролну групу (18/96). Leder и сарадници (2005) су посматрањем групе од 2800 индивидуа установили присуство бластоцистиса код 5,8% асимптоматских појединаца и 6,7% симптоматских индивидуа. Аутори су закључили да не постоји значајна разлика у присуству бластоцистиса између симптоматских и асимптоматских носилаца.

Пацијенти са ИБС-ом обично пролазе кроз низ дијагностичких поступака пре постављања коначне дијагнозе. У том процесу налаз бластоцистиса у столици може бити релативно чест, што потом указује да овај микроорганизам може бити узрочник обољења ако нису идентификовани други етиолошки фактори. На тај начин *Blastocystis* се чешће детектује код пацијената са ИБС-ом из простог разлога што су дијагностичке истраге темељније (Stensvold и Clark 2016).

Пост-инфективни ИБС јесте термин, који описује развој ИБС-а након третмана извесне инфекције са неким антимикуробним средством (Beatty и сар., 2014). Пост-инфективни ИБС додатно компликује већ нејасну везу бластоцистиса и

ИБС-а, пошто је могуће да је изворни етиолошки фактор елиминисан терапијом. *Blastocystis* који није реаговао на терапију, остаје као једини који се може окривити за настанак ИБС-а. Са друге стране немогуће је у потпуности искључити *Blastocystis* као иницијалног узрочника ИБС-а, чак иако више није присутан.

Једна од новијих теорија говори о бластоцистису као маркеру гастроинтестиналног здравља а не као о узрочнику болести. Scanlan и сарадници (2014) говоре о бластоцистису као уобичајеном припаднику интестиналне флоре здравог човека, са колонизацијом здраве популације већом од 50%. Ова група аутора је такође описала дуготрајну колонизацију, где су исти сојеви микроорганизама били присутни у једном домаћину у периоду до чак 10 година. Иако Scanlan и сарадници (2014) закључују да разноврсни генетски варијетети *Blastocystis* sp. могу колонизовати здрав интестинални тракт човека без изазивања симптома, према овој групи аутора улога бластоцистиса у интестиналном здрављу је и даље отворено питање. Могуће је да је већина *Blastocystis* sp. апатогена, а да вирулентни представници припадају одређеним генетским варијететима или варијацијама унутар суптипова (Tan и сар., 2010; Scanlan, 2012). Могући сценарио је и да су различите варијанте опортунистичке у различитим домаћинима (интеракција генотип × генотип), или поједини фактори подстичу иницијацију и прогресију обољења (интеракција генотип × генотип × средина).

#### 2.4.2.2. Екстра-интестиналне манифестације

Извештаји о дерматолошким променама везаним за *Blastocystis* су се први пут појавили почетком 1990-их година а након тога је уследио већи број истраживања на ову тему (Armentia и сар., 1993; Biedermann и сар., 2002; Gupta и Parsi, 2006; Pasqui и сар., 2004; Micheloud и сар., 2007). Клиничке студије су потврдиле повезаност осипа на кожи и инфекције бластоцистисом (Özyurt и сар., 2007; Amin и сар., 2006). Giacometti и сарадници (2003) су установили присуство бластоцистиса у сигнификантно већој мери код пацијената са алергијским манифестацијама на кожи.

Gupta и Parsi (2006) приказују случај женске особе старости 24 године са хроничном уртикаријом у трајању од 9 недеља. Први симптоми код пацијенткиње су се појавили након убода комараца на доњим екстремитетима и терапије кремом која је садржавала нестероидне антиинфламаторне компоненте, тада је постављена иницијална дијагноза целулитиса. Пацијенткиња је имала историју благе хроничне дијареје. Након детаљне лабораторијске претраге, сви налази су јој били уредни осим повишеног серумског имуноглобулина А и израженог раста бластоцистиса у култури фецеса. Након терапије бластоцистиса симптоми уртикарије су нестали. Аутори указују на значај прегледа столице код свих пацијената са хроничном уртикаријом непознате етиологије.

Katsarou-Katsari и сарадници (2008) су приказали случај пацијента са акутном уртикаријом, коју су повезали са амeboидном формом бластоцистиса суптипа 3. Bálint и сарадници (2014) су ретроспективном анализом података 80 пацијената позитивних на *Blastocystis* установили да је поред 73,75% пацијената са гастроинтестиналним поремећајима, 11,25% пацијената показивало дерматолошке промене. Аутори на основу ових података препоручују паразитолошки преглед столице код пацијената са променама на кожи, које се непознатог порекла. Vogelberg и сарадници (2010) су дијагностиковали инфекцију бластоцистисом субтипа 2 код пацијента са гастроинтестиналним поремећајима и генерализованом хроничном уртикаријом. Упркос терапији бројним антимикуробним средствима гастроинтестинални и кутани симптоми су се изнова појављивали после извесног асимптоматског периода. Ерадикација паразита и коначна резолуција здравственог стања уследила је након комбиноване терапије метронидазолом и паромомицином.

Неколико студија је описало реактивни артритис повезан са бластоцистисом (Lee, 1991; Lakhanpal и сар., 1991; Krüger и сар., 1994), међутим даља истраживања на ову тему нису спроведена.

### 2.4.2.3. Генетски, морфолошки и остали фактори који утичу на развој инфекције и обољења

Нека истраживања су се фокусирали на повезаност одређених суптипова са ИБС-ом. Установљене су извесне разлике у дистрибуцији субтипова код пацијената са и без дијагнозе ИБС-а, али не постоји конзистентност у погледу суптипова повезаних са ИБС-ом.

Dogutan-A1 и сарадници (2009) су испитивању подвргли узорке фецеса од 105 симптоматских пацијената и 96 асимптоматских пацијената који су чинили контролну групу. Симптоматски пацијенти су сврстани у три групе: 1) пацијенти са хроничном дијарејом у трајању од две и више недеља; 2) пацијенти са хроничном инфламаторном болести црева (ХИБЦ), која обједињује Кронову болест и улцерозни колитис; 3) пацијенти са ИБС-ом који су одговаралиROME II критеријуму. Када је 35 изолата подвргнуто суптипизацији помоћу STS прајмера, суптипови 2 и 3 су пронађени код свих група пацијената док је суптип 1 дијагностикован само код асимптоматске групе. Мешане инфекције су детектоване у групи асимптоматских пацијената (ST1+ST2) и у групи пацијената са хроничном дијарејом (ST2+ST3). Студија је доказала повезаност суптипова 2 и 3 са хроничним инфекцијама и у симптоматским и у асимптоматским случајевима. Недостатак корелације између суптипова и симптома указује на снажну улогу фактора домаћина на испољавање симптома. Сличан феномен је описан код *E. histolytica*, код које идентичан сој може узроковати асимптоматску инфекцију код једне индивидуе и тешко обољење код друге. Наиме, генетски фактори домаћина могу појачати продукцију протеина, који имају улогу борби против инфекције, као што је TNF- $\alpha$  који доводи до испољавања симптома инфекције узрочником *E. histolytica* (Stanley, 2003). Сличан шаблон уочен је и код ИБС-а, где пацијенти који стварају високе нивое TNF- $\alpha$  и ниске нивое интерлеукина-10, чине већину у популацији захваћеној ИБС-ом (van der Veek и сар., 2005). Dogutan-A1 и сарадници (2009) су доказали присуство суптипова 2 и 3 код пацијената са дијарејом, ИБС-ом и ХИБЦ-ом, са највећом преваленцом суптипа 3. На основу ових резултата аутори предлажу



приступ проблему повезаности ових обољења и бластоцистиса, који се заснива на интеракцији домаћин-узрочник која доводи до настанка симптоматске инфекције.

ИБС сам по себи поседује разнолику клиничку манифестацију, са пацијентима који имају дијареју, констипацију, или пак смењивање ова два симптома (Collins, 2014). Мали је број истраживања, која су изучавала везу између бластоцистиса и појединих подгрупа ИБС-а.

Тан и Suresh (2006b) су *in vitro* испитивањем 20 изолата, који су потицали од десет симптоматских и истог броја асимптоматских пацијената, установили присуство неправилних и полиморфних амебоидних форми у свим културама изолата из симптоматских пацијената, док код изолата из асимптоматских пацијената нису уочене амебоидне форме. Детаљном електронском микроскопијом у цитоплазми су уочене грануле налик ендоплазматском ретикулуму, што је указивало на активну синтезу протеина. Аутори закључују да амебоидна форма може бити индикатор патогености бластоцистиса, или пак морфолошка форма која доприноси патогености и развоју симптома код пацијената.

Уакооб и сарадници (2010) су извршили суптипизацију изолата бластоцистиса из асимптоматских носилаца и пацијената са ИБС-ом у чијој клиничкој презентацији је доминирала дијареја (ИБЦ-Д). Испитано је укупно 158 пацијената са ИБС-Д симптомима и 157 припадника контролне групе. ST1 је био најчешћи налаз код пацијената са ИБС-ом, док је ST3 био подједнако присутан у обе групе испитаника. Сличне резултате су добили и Јан и сарадници (2006), са преминацијом суптипа 1 код симптоматских пацијената. Код контролне групе доминирао је ST3, којег је пратио ST1. У истраживању које су спровели Јан и сарадници (2007), ST5 који указује на зоотску трансмисију је био присутан у подједнакој сразмери у контролној групи и групи са дијагнозом ИБС-Д.

Већина истраживања се фокусира на питање повезаности патолошког стања и суптипа бластоцистиса, без података о броју паразита код инфицираних људи (Stensvold и сар., 2009a; Domínguez-Márquez и сар., 2009; Eroglu и сар., 2009). Са друге стране неколико истраживања повезују тежину клиничке слике са бројем

паразита који су доказани микроскопским прегледом столице. Присуство више од пет паразита по видном пољу при прегледу директних размаза на увеличању од 400×, или при прегледу трајних препарата под имерзијом на увеличању од 1000×, често се повезује са акутном презентацијом гастро-интестиналних симптома (Кауа и сар., 2007; Moghaddam и сар., 2005).

Vassalos и сарадници (2011) су испитивању подвргли симптоматске и асимптоматске пацијенте (n=51) позитивне искључиво на *Blastocystis*. Узорке столице су подвргли ксеничној култивацији и суптипизацији. У већини случајева је доминирао ST3, са карактеристичним морфолошким структурама у култури (вакуоларна и амебоидна). Аутори су описали случај једног од асимптоматских пацијената инфицираног са ST3, који је развио симптоме након кратког временског периода по постављању иницијалне дијагнозе. Прогресија из асимптоматског у симптоматско стање се подударала са транзицијом вакуоларних у амебоидне форме. Аутори охрабрују на даље испитивање улоге различитих морфолошких варијација у етиологији симптоматских инфекција.

Стрес, као фактор средине, доводи до промене оксидантне-антиоксидантне равнотеже и целуларног имуног одговора што за последицу има пад одбрамбене способности организма. Chandramathi и сарадници (2014) су демонстрирали ефекте стреса на пријемчивост и патогеност код инфекција бластоцистисом. Wistar пацове узраста 3 недеље су сврстали у четири групе: 1) контролна група; 2) група са индукованим стресом; 3) група инфицирана бластоцистисом; 4) група са индукованим стресом инфицирана бластоцистисом. На основу мерења телесне масе, праћења хематолошких и имунолошких параметара, аутори су закључили да је патогеност бластоцистиса појачана у присуству стреса.

### 2.4.3. Патогенеза

Главна препрека у нашем разумевању патобиологије бластоцистиса јесте одсуство одговарајућег лабораторијског модела. Сprovedено је мноштво *in vitro* студија на разним животињским врстама, укључујући пацове, мишеве, заморце и пилиће. У једном од најранијих радова, Phillips и Zierdt (1976) су доказали

пријемчивост гнотобиотских замораца након оралне и интрацекалне инокулације. Инфекција је довела до дијареје и хиперемичних промена цекума. Нешто касније Мое и сарадници (1997) су експериментално заразили младе BALB/с мишеве. Инфекције су углавном биле спонтано пролазиле, мада су неки мишеви показивали губитак телесне масе, а хистолошки преглед је показао инфламаторне одговоре. Блага природа инфекције може бити последица ниског патогеног потенцијала коришћеног изолата, односно могућности да мишеви нису најпогоднији домаћин за *Blastocystis*. Наиме, истраживања су показала да лабораторијски мишеви генерално нису носиоци бластоцистиса, док су пацови и живина (нарочито пилићи) често инфицирани овим паразитом (Chen и сар., 1997; Lee и Stenzel, 1999). Каснији радови су се фокусирали на експерименталну инфекцију пацова и живине као потенцијалне моделе за изучавање патогенезе (Hussein и сар., 2008; Iguchi и сар., 2007; Tanizaki и сар., 2005; Yoshikawa и сар., 2004a). Ове студије указале на цисту као трансмисибилну форму паразита, односно да је број од 10 до 100 цисти довољан за успостављање инфекције (Tanizaki и сар., 2005; Yoshikawa и сар., 2004a). Yoshikawa и сарадници (2004a) су доказали да су изолати из заморца и пацова инфективни за Wistar пацове, док су Tanizaki и сарадници (2005) приказали да изолати из кокошака, препелица и гусака, лако инфицирају пилиће. Iguchi и сарадници (2007) су тестирали инфективност различитих зоонотских генотипова изолованих из човека на пацовима и пилићима. Приказали су варијабилност у инфективности изолата из глодара (ST4) и живине (ST6). ST3 као највероватнији хумани изолат, није био способан да инфицира пацове и пилиће, док је ST7 инфицирао само живину, што указује на специфичност према домаћину ових изолата. Hussein и сарадници (2008) су изолате из асимптоматских и симптоматских пацијената подвргли генотипизацији и потом су их употребили за експерименталну инфекцију пацова. Изолати из симптоматских пацијената су индуковали умерене до тешке патолошке промене код инфицираних пацова, док су изолати из асимптоматских пацијената узроковали благу патологију. Аутори су закључили да је ST1 патогени суптип (одговоран за морталитет пацова од 25%), док међу суптипovima 3 и 4 постоје патогене и апатогене варијанте. Ово је први рад који указује да пацови могу бити добар експериментални модел. Међутим, ако

се узму у обзир резултати Iguchi-ја и сарадника (2007) о постојању специфичности према домаћину појединих субтипова, могућност примене пацова у експерименталним инфекцијама може бити ограничена. Наиме, недостатак патолошких промена код пацова може бити последица отпорности на колонизацију а не последица апатогене природе паразита. Да би се неки животињски модел прихватио као валидан, неопходно је спровести већи број истраживања.

Неколико студија је испитивало ефекат бластоцистиса на ћелијске културе сисара. Ћелије и лизати бластоцистиса изолованог из асимптоматских носиоца и симптоматских пацијената су индуковали цитопатогени ефекат на оваријалним ћелијама хрчка (СНО: Chinese Hamster Ovary cells), али не и на НТ-29 линији епителних ћелија колоне (Walderich и сар., 1998). Long и сарадници (2001) су потврдили налазе претходне групе аутора, као и одсуство цитопатогеног ефекта на Т-84 линији епителних ћелија. Међутим, ова група аутора је уочила да при инкубацији епителних ћелија инфицираних бластоцистисом у трајању од 24 часа, долази до индукције стварања про-инфламаторног цитокина ИЛ-8. У раној фази инкубације (6 часова) је пак дошло до снижавања продукције ИЛ-8. Аутори су претпоставили механизам у коме *Blastocystis* модулира имуни одговор домаћина, а у раним фазама инфекције смањује имуни одговор у циљу преживљавања паразита.

Puthia и сарадници (2008) су у *in vitro* студији истраживали ефекат бластоцистиса субтипа 4 на интестиналне епителне ћелије пацова (линија: ИЕС-6). Излагањем епителних ћелија бластоцистису је уочена безконтактна апоптоза. Аутори су уочили повећање пермеабилитета, али инхибиција апоптозе није довела до побољшања стања па су аутори закључили да апоптоза не игра битну улогу у компромитовању функције цревне баријере. Терапија метронидазолом је прекинула повећање пермеабилитета, указујући на неопходност присуства живих паразита да би до уопште дошло до оваквог поремећаја. Аутори су такође предложили механизам по којем ИЛ-8, секретован од стране епителних ћелија домаћина као последица инфекције бластоцистисом, узрокује доток инфламаторних ћелија у интестиналну мукозу, које потом узрокују оштећења ткива и гастро-интестиналне сметње. У истраживању Iguchi-ја и сарадника (2009) доказана је експресија ИФН- $\gamma$ ,

IL-12 и TNF- $\alpha$ , што сугерише да инфекција бластоцистисом стимулише локални инфламаторни одговор домаћина, који укључује накупљање моноцита/макрофага, НК ћелија и Т ћелија.

Цистеин протеазе паразитских протозоа су доказано укључене у бројне важне биолошке функције, као што су инвазија ћелија домаћина, избегавање имуног одговора, патогенеза и вируленција (Sajid и McKerrow, 2002). Као и други протозоални паразити *Blastocystis* садржи углавном цистеин протеазе (Puthia и сар., 2008). Sio и сарадници (2006) су установили да су протеазе бластоцистиса рН зависне, и да највишу протеолитичку активност показују при неутралним рН вредностима. Puthia и сарадници (2005) су доказали да протеазе бластоцистиса разграђују хумани секреторни IgA. Лимитирањем нивоа секреторног IgA *in vivo*, протеазе бластоцистиса промовишу преживљавање паразита у гастроинтестиналном тракту. Reed и сарадници (1989) су доказали да патогена *E. histolytica* ствара 10-1000 $\times$  више цистеин протеазе од неинвазивне *E. dispar*. Било би корисно испитати релативне нивое протеаза код различитих суптипова, и утврдити да ли постоји слична корелација између протеазне активности и вируленције (Tan, 2008).

Секреција анти-*Blastocystis* IgA је чест налаз код симптоматских, али не и код асимптоматских случајева бластоцистозе (Mahmoud и сар., 2003). Ови резултати указују да паразит највероватније не напада домаћина, већ домаћин напада паразита, а обољење настаје као резултат одбрамбеног механизма бластоцистиса. Ова теорија би објаснила ситуацију у којој су одређене индивидуе носиоци микроорганизама без испољавања симптома. *In vivo* улога IgA у одбрани од бластоцистиса је непозната. Лонгитудиналне епидемиолошке студије са фокусом на перзистенцији *Blastocystis* инфекција код појединаца са селективном IgA дефицијенцијом би могле помоћи у расветљавању патогенезе овог микроорганизама (Tan, 2008).

Испитивање узорака биопсије колона од пацијената са ИБС-ом и ХИБЦ-ом су доказала да су гастроинтестинални симптоми ових обољења резултат продукције

серин протеазе (Сенас и сар., 2007). Серин протеазе постају неуролошки активне при високим концентрацијама, и тада узрокују абдоминалне болове, мишићне контракције и свеопшти бол. Високи нивои серин протеазе се не проналазе код ентеритиса вирусне или бактеријске етиологије (Gecse и сар., 2008).

Доказано је да инвазија епитела од стране узрочника није неопходна да би се индуковао запаљенски процес (Berkes и сар., 2003). *Blastocystis* као неинвазивни паразит може покренути инфламаторну реакцију активацијом рецептора на површини ћелије. При прегледу хистолошких препарата црева свиња, Faуег и сарадници (2014) су пронашли *Blastocystis* примарно у лумену (углавном у вези са деловима сварене хране), међутим у појединим случајевима паразит се налазио у непосредној близини епитела. Аутори нису уочили пенетрацију у епител и *lamina propria*. Ова посматрања су потврдили Wang и сарадници (2014а), који нису уочили никакве патолошке промене у хистолошким препаратима црева свиња. Ћелије бластоцистиса су уочили у луминалном материјалу или у близини епитела, без доказа за адхезију или инвазију. Приликом посматрања хистолошких препарата треба имати у виду да техничка припрема највероватније елиминише мукозни слој који највероватније раздваја *Blastocystis* од слузокоже у *in vivo* условима.

Dagci и сарадници (2002) пак сугеришу да је пермеабилност интестиналног зида повећана код инфекције бластоцистисом и да паразит може узроковати оштећења цревног зида. Al-Tawil и сарадници (1994) описују инвазивну инфекцију бластоцистисом са улцерацијама колона. Chandramathi и сарадници (2010) су након вештачке инфекције пацова установили доказе о потенцијалним оксидативним оштећењима, која су се могла приписати бластоцистису. Истраживање које су спровели Elwakil и Hewedi (2010) је показало да *Blastocystis* може инвадирати *lamina propria*, субмукозу и мишићни слој црева. Li и сарадници (2013) су након инфекције SPF пацова хуманим изолатом ST1, установили инфламаторну инфилтрацију, одлужљивање мукозног слоја и инвазију *lamina propria*. Наведена истраживања сугеришу да у извесним случајевима *Blastocystis* може имати инвазивну природу, али тек будућа истраживања код људи, морају потврдити ове податке (Roberts и сар, 2014).

Осим интестиналних описани су и екстра-интестинални симптоми бластоцистозе. Katsarou-Katsari и сарадници (2008) су повезали амебоидну форму бластоцистиса (ST3) са акутном уртикаријом и предложили неколико теорија о томе како *Blastocystis* може узроковати кутане симптоме. Једна од теорија је поремећај имунолошке хомеостазе након покретања инфламаторног одговора од стране домаћина као реакције на присуство амебоидне форме паразита. Као могући антигени помињу се угљени хидрати површинског омотача бластоцистиса, који доводе до покретања инфламаторне реакције. Имуноглобулини класе Е такође могу бити медијатори код уртикарија, и то кроз активацију и дегранулацију мастоцита и последично ослобађање медијатора инфламације. Међутим, одговор на питање који механизми тачно учествују у настанку кожних симптома још увек није у потпуности јасан. Идентификација *Blastocystis* специфичних IgE код пацијената са уртикаријама би била од користи у дефинисању механизма помоћу којих паразит узрокује ове лезије.

#### 2.4.4. Терапија

Због контраверзне патогенезе и спонтаног нестанка симптома, терапија бластоцистозе се преписује углавном у оним случајевима када су искључени сви остали етиолошки фактори. Иако је метронидазол лек избора у терапији инфекције бластоцистисом, све је више података који говоре да метронидазол није ефикасан баш у свакој прилици. Према подацима у литератури ефикасност метронидазола се креће између 0% и 100% (Stensvold и сар., 2010).

Иако још увек није у потпуности разјашњено, међу факторе који могу утицати на ефикасност терапије спадају интензитет инфекције, присуство морфолошких форми резистентних на метронидазол, стварање резистенције кроз генетске мутације или суптип зависне варијације отпорности на терапијска средства (Tan, 2010).

Као алтернативе метронидазолу, најчешће се преписују котримоксазол и паромомицин, мада је описана варијабилна ефикасност (Moghaddam и сар., 2005; Ок и сар., 1999), односно резистенција и у клиничким и у студијама *in vitro* (Tan,

2008). Међу терапијска средства која су примењена са варијабилном ефикасношћу, спадају јодоквинол, тинидазол, нитазоксанид, кетоконазол и орнидазол. Према неким ауторима симптоми нестају као последица секундарне ерадикације неког непрепознатог узрочника, а не као последица специфичне терапије бластоцистиса (Markell и Udkow, 1986; Sohail и Fischer, 2005).

Dunn и сарадници (2012) су развили метронидазол резистентан сој бластоцистиса суптип 4 у условима *in vitro*, док јасни докази не постоје о развоју резистенције *in vivo*. Stensvold и сарадници (2010) сматрају да је неуспех терапије бластоцистиса пре последица слабе ефикасности антимикуробних лекова него развоја резистенције. Аутори упућују на молекуларну анализу разних изолата у циљу идентификације гена потенцијално одговорних за развој резистенције. У појединим случајевима брза реинфекција из извора као што је околина, односно посредством контакта са другим инфицираним особама или животињама (Stensvold и сар., 2009b; Parkar и сар., 2007) се може окарактерисати као не-ефикасност терапије. Дискриминаторна молекуларна анализа би омогућила бољи увид у механизме обнављања инфекције, реинфекције и трансмисионе динамике (Stensvold и сар., 2010).

Због све веће забринутости око резистенције микроорганизама на различите антимикуробне терапеутике, све су чешћа истраживања о ефикасности различитих алтернативних средстава. Bremer Christensen и сарадници (2015) су *in vitro* испитивањем припремака од 21 различите биљке, установили сигнификантну анти-*Blastocystis* активност код примене етанолских екстраката шест различитих биљака. *Mallotus oppositifolius* је показивао анти-бластоцистисактивност сличну метронидазолу, који је референтни анти-протозоални лек. Abdel-Hafeez и сарадници (2015) су доказали *in vivo* анти-протозоални ефекат белог лука (*Allium sativum*) и ђумбира (*Zingiber officinale*) на мишевима експериментално инфицираним бластоцистисом.



## 2.5. ЗООНОТСКИ ПОТЕНЦИЈАЛ

### 2.5.1. Присуство бластоцистиса код различитих животињских врста и потенцијални утицај на здравље људи

Један од првих радова који су контакт са животињама повезали са бластоцистозом људи објавили су Rajah Salim и сарадници 1999. године. Аутори су испитали да ли су људи који су у контакту са животињама изложени већем ризику за настанак инфекције бластоцистисом. Преваленца паразита је утврђена код две групе појединаца: 1) група радника у контакту са животињама; 2) група здравих појединаца без контакта са животињама. Прегледано је 105 индивидуалних узорака из прве групе, коју су чинили радници у контакту са животињама из једне истраживачке установе, локалног зоо-врта и кланице. Другу групу испитаника (контролну групу) чинило је 163 појединца из урбане средине без контакта са животињама. *In vitro* култивација је показала преваленцу бластоцистиса од 41% у групи која је била у контакту са животињама, док је преваленца у контролној групи износила 17%. Статистички значајна разлика ( $P = 0.0000313$ ) указује да су људи, који су у блиском контакту са животињама изложени већем ризику за настанак инфекције бластоцистисом.

У бројним паразитолошким истраживањима широм света, *Blastocystis* представља све учесталији налаз у материјалу пореклом од људи и/или животиња. Да ли је то резултат пораста инциденце бластоцистозе или је последица побољшања дијагностичких процедура, за сада остаје нејасно. Међутим, ако се узму у обзир трендови глобализације, светске трговине, доступности путовања и раст популације људи и броја животиња, односно историјски и тренутни подаци о епидемиологији бластоцистиса, разумљиво је посматрати бластоцистозу као убиквитарну зоонозу (Vassalos и сар., 2008). Прави напредак у разумевању зоонотског карактера бластоцистиса донела је примена молекуларних метода дијагностике. Молекуларна дијагностика за сада представља једини валидан начин расветљавања зоонотске трансмисије овог микроорганизма. Низ аутора је молекуларној карактеризацији подвргао изолате из мноштва домаћина. Осим

људских изолата, изучавани су изолати из бројних других сисара, водоземаца, рептила, птица и артропода. Као и код осталих одлика бластоцистиса, као што су морфологија или патогени значај, контроверзе око зоонотског потенцијала су бројне.

Абе и сарадници (2002) су преваленцу бластоцистиса утврдили директним прегледом или култивацијом фекалног материјала говеда, свиња, паса, различитих врста из зоо-врта (примата, карнивора, хербивора, фазана и патака). Фецес говеда и свиња је узоркован по методу случајног избора са 11, односно 12 комерцијалних фарми са територије западног Јапана. Узорци фецеса паса су потицали из прихватилишта за псе из Осаке, док су животиње из зоолошких вртова изабране тако да се могла искључити могућност међусобне трансмисије. Преваленца је варирала у значајној мери код различитих група животиња. Највиша преваленца је установљена код фармских животиња, и то од 95% (58/61) код свиња и 71% (39/55) код говеда. Интересантно, сви узорци фецеса паса су били негативни. Преваленца код животиња из зоо-врта се кретала од 85% (29/34) код примата, преко 80% (8/10) код фазана и 56% (9/16) код патака, док бластоцистис није био доказан код разних карнивора и хербивора. Пошто су изолати из животиња морфолошки не могу разликовати од изолата из људи, аутори указују на неопходност молекуларне анализе у циљу расветљавања зоонотског потенцијала и етиолошког значаја ових изолата. Абе и сарадници (2003а,б,ц) су извршили генетску карактеризацију изолата бластоцистиса из говеда, свиња, примата и птица, применом PCR методе са суптип специфичним прајмерима, као и RFLP анализом SSUrDNA гена. У том истраживању су доказали генетску сличност ових изолата са хуманим изолатима. Међутим, према ауторима, резултати су указали само на сродност хуманих и животињских изолата, али не и на зоонотски потенцијал. Управо из тог разлога аутори су извршили комплетно секвенцирање и филогенетску анализу животињских изолата (Абе, 2004). Филогенетска анализа је утврдила да се 19 испитаних изолата могу класификовати у седам група (I-VII): Групу I су чинили изолати из људи, примата, говеда, свиња и птица; Групу II су чинили изолати људи и примата; Групу III изолати из људи, говеда и свиња; Групу IV изолати из примата, птица и глодара; Групу V изолати из говеда и свиња; док су у Групе VI и

VII сврстани људски и птичији изолати. На основу ових резултата се да закључити да већина животињских изолата поседује зоонотски потенцијал или укрштenu трансмисибилност између хетерологних домаћина.

Thathaisong и сарадници (2003) извештавају о генетској сродности изолата из људи, свиња и коња. Аутори су секвенцирањем дела SSUrRNA гена и филогенетском анализом *Blastocystis* изолата из ова три домаћина установили да су изолати из свиња и коња у блиском сродству са изолатима пореклом од људи, са подударношћу од 92, односно 94%. На основу резултата аутори указују на зоонотски потенцијал бластоцистиса. Noël и сарадници (2005) су анализирали комплетне секвенце SSUrRNA гена од 12 *Blastocystis* изолата из човека, пацова и рептила. Паразити су били култивисани и у аксеничним културама, без присуства других микроорганизама. Упркос морфолошкој сличности у култури, секвенце генома су показивале значајну генетску разноликост. Већина изолата се могла окарактерисати као зоонотска. Аутори су основано предложили могућност трансмисије бластоцистиса на релацијама животиња-животиња, човек-животиња, односно животиња-човек. Међутим, управо због идентификације великог броја зоонотских изолата, тешко је тачно одредити изворног домаћина и трансмисиону руту одређеног изолата. Због недоследности у номенклатури и различитих класификација на генотипове, групе, подгрупе, субтипове итд., Stensvold и сарадници (2007) су предложили да се све врсте изоловане из птица или сисара, укључујући *Blastocystis hominis*, именују као *Blastocystis sp.*, а да тај назив прати ознака субтипа „ST“ са одређеним бројем у зависности којем субтипу врста припада (пример: ST1, ST3, ST5 итд.). Ову номенклатуру је прихватила већина истраживача.

Parkar и сарадници (2007) су директном карактеризацијом бластоцистиса из фекалног материјала покушали да докажу зоонотски потенцијал овог паразита. Испитивању су подвргли узорке фецеса од неколико врста малих торбара (*Dasyurus geoffroii*, *Bettongia penicillata*, *Isoodon obesulus*, *Trichosurus vulpecula*) са територије западне Аустралије. Узорци су прикупљени и од примата (*Papio hamadryas*, *Varecia variegatus*, *Macaca nigra*, *Colobus guereza*, *Pongo pygmaeus abelii*, *Lemur catta*, *Ateles*

*geoffroyi*, *Cercopithecus aethiops*, *Nomascus leucogenys*) из зоолошког врта у Перту (Аустралија) и њихових чувара (радника у зоо врту). Надаље, узорци фецеса су прикупљени од тигра (*Panthera tigris sumatrae*), носорога (*Ceratotherium simum simum*) и мачке риболовца (*Prionailurus viverrinus*), такође из поменутог зоо врта. Узорци фецеса домаћих паса и мачака су сакупљени из ветеринарски клиника и азила за животиње са територије западне Аустралије. Позитивни узорци столица људи на *Blastocystis* су прикупљени из локалних медицинских дијагностичких лабораторија. У истраживање су била укључена и два узорка столице људи и три узорка фецеса паса са подручја Тајланда где је бластоцистога ендемски присутна код људи и животиња. Узорци су прегледани PCR методом, директно из фецеса и након *in vitro* пропагације у Jones-овој подлози (Jones, 1946). Аутори су применили „nested PCR“ реакцију у циљу амплификације 1100 бп региона SSU rDNA. Користили су два сета прајмера које су описали Clark (1997), односно Böhm-Gloning сарадници (1997). Добијени специфични ампликони су потом секвенцирани и филогенетски анализирани. Од укупно 64 узорка, 12 (19%) је било успешно култивисано у условима *in vitro*. Применом PCR методе директно из узорка фецеса, 35% (37/107) узорка је било позитивно на *Blastocystis*. Од 64 узорка који култивисани 27 (42%) је било позитивно применом PCR методе. Аутори осим што су доказали вишу осетљивост PCR методе у односу на *in vitro* култивацију, доказали су и преференцијални раст појединих субтипова у *in vitro* условима, односно идентификовали су извештајни број изолата, који могу имати зоонотски значај. Сва четири узорка столице од чувара из зоо-врта су била позитивна на *Blastocystis*. Два узорка су секвенцирана и окарактерисана као слична изолатима из примата, а припадали су суптипу 1. Постоје извештаји који говоре о блиском контакту људи и животиња као фактору ризика у трансмисији бластоцистиса (Rajah Salim и сар., 1999; Abe и сар., 2002), што су потврдили и Parkar и сарадници у свом раду. Они су такође установили генетску сродност једног људског и псећег изолата из Тајландског руралног насеља, наиме оба изолата су припадала суптипу 5. Такође, ово истраживање је прво које је описало инфекцију човека суптипом 6. Аутори су доказали генетску подударност изолата из човека и торбара *Trichosurus vulpecula*, а ова два изолата су се показали идентичним са изолатима из пацова из

Сингапура и човека из Јапана. Аутори говоре о седам изолата специфичних за домаћина што се подудара са истраживањима осталих аутора (Yoshikawa и сар., 1996, 1998; Clark, 1997; Snowden и сар., 2000; Arisue и сар., 2003; Noel и сар., 2005).

Истраживања су изолате *Blastocystis* sp. суптип 5 повезивали само са свињама, говедима и приматима (Табела 3.). Yan и сарадници (2007) у свом раду описују три случаја бластоцистозе људи. Применом седам STS прајмера доказали инфекцију субтипом 5 код два појединца, и мешану инфекцију суптиповима 3 и 5 код једног пацијента. Молекуларном анализом је доказан суптип 5 и код 16 изолата из свиња из истог руралног подручја из којег су водили порекло позитивни пацијенти. Аутори су RFLP анализом употребом две рестриктивне ендонуклеазе (*HinfI* and *RsaI*) доказали идентичне или сличне RFLP обрасце код људских и свињских изолата, осим код пацијента са мешаном инфекцијом. Аутори својим резултатима поткрепљују могућност зоонотског потенцијала суптипа 5.

Belleza и сарадници (2016) су анализом узорака столице 1271 појединца и 145 паса из урбане заједнице главног града Филипина, Маниле између осталог установили преваленцу суптипа 5 од 4,1% код људи и 13% код паса. Osman и сарадници (2015) анализом узорака фецеса 116 паса, кућних љубимаца са подручја Лиона (Француска), су доказали присуство паразита *Blastocystis* само код четири пса (3,4%). Аутори су идентификовали ST2 који је чест код различитих животињских врста, и ST10 који се среће чешће код преживара. Аутори закључују да пси играју занемарљиву улогу као зоонотски резервоари, пошто према њиховим резултатима они не представљају природне домаћине *Blastocystis* sp.

Табела 3. Дистрибуција суптипова бластоцистиса код различитих домаћина (према Parkar и сар., 2007)

Домаћин	<i>Blastocystis</i> sp. суптипови									
	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10
Примати	×	×	×	×	×			×		×
Свиње	×	×	×		×					
Говеда	×		×		×					×
Коњи, Овце, Пси	×	×	×							×
Глодари, Торбари				×						
Птице	×	×				×	×	×		
Људи	×	×	×	×		×	×	×	×	

Yoshikawa и сарадници (2009) су у циљу испитивања могуће зоонотске трансмисије упоредили суптипове и секвенце *Blastocystis* изолата из деце са гастро-интестиналним симптомима из Катмандуа (Непал) и локалних резус мајмуна. Код деце је утврђена преваленца од 25,6% (21/82), док је свих 10 узорака од резус мајмуна било позитивно на *Blastocystis*. Типизација помоћу STS прајмера је показала суптипове ST1 (20%), ST2 (20%) и ST3 (60%) код деце, док је код су код мајмуна били присутни ST1 (50%) и ST2 (70%) док ST3 није доказан. Један изолат из мајмуна није одговарао нити једном од седам испитиваних суптипова. Виша преваленца ST2 код људи и мајмуна је претпоставила хипотезу о потенцијалној трансмисији *Blastocystis* инфекција на релацији човек-мајмун. Секвенцирање SSU rRNA гена је приказало идентичне секвенце људских и животињских изолата, и тако пружило молекуларни доказ о зоонотској трансмисији.

У свом истраживању 2010. године Parkar и сарадници су молекуларној карактеризацији подвргли *Blastocystis* изолате из животиња из зоолошких вртова и њихових чувара и три зоо-врта из Аустралије (Перт, Мелбурн, предграђе Мелбурна-Werritbee), односно из зоо-вртова из Амстердама (Холандија) и Антверпена (Белгија). У истраживање су укључени и узорци пореклом од жирафа и слонова. Узорци столице и анкетни подаци су прикупљени и од 22 појединца, који нису имали контаката са егзотичним животињама, ова група узорака је служила као контролна. Узорци су прикупљени у истом временском периоду као и узорци из зоо-вртова. Преваленца *Blastocystis* код различитих животињских врста се кретала између 33% и 82%. Од 19 чувара из зоолошких вртова 12 (63%) је било инфицирано бластоцистисом. Код свих случајева је искључено присуство било ког другог паразита. Већина испитаника је (10/12) је пријавила гастро-интестиналне поремећаје у претходном временском периоду. Свега 2 појединца од 22 припадника контролне групе (преваленца од 9%) је било позитивно на *Blastocystis*. И код ових индивидуа је искључено присуство других паразита. Једна од те две особе је указала на гастро-интестиналне симптоме. Резултати потврђују контакт са животињама као фактор ризика у настанку бластоцистозе. Секвенцирање је указало на могућност постојања нових суптипова ST11, ST12 и ST13, док је већина изолата припадала суптиповима 1-4 са високом филогенетском подударношћу хуманих и

животињских изолата. О контакту особља и животиња у зоо-вртovima као фактору ризика говоре и Stensvold и сарадници (2009b), који извештавају о високој преваленци ST8 (25%) код чувара примата у зоо-вртovima. Са обзиром да је овај суптип релативно редак у људској популацији, аутори закључују да је дошло до зоонотске трансмисије паразита.

Тап и сарадници (2012) су са намером да истраже могућност зоонотске трансмисије бластоцистиса, поготово са коза на људе, испитивању подвргли 236 узорака са пет различитих фарми коза са малезијског полуострва. Осим могућности зоонотске трансмисије, аутор је мотивисао и недостатак литерарних података о преваленци бластоцистиса код коза на светском нивоу. Установили су преваленцу од 30,9%, а изолати су припадали суптиповима ST1 (60,3 %), ST7 (41,1 %), ST6 (41,1 %) и ST3 (11,0 %). Пошто су ST1, ST3, ST6 и ST 7 веома чест налаз код инфицираних људи широм свету, па и Малезији, аутори сматрају да се зоонотска природа бластоцистозе не сме занемарити.

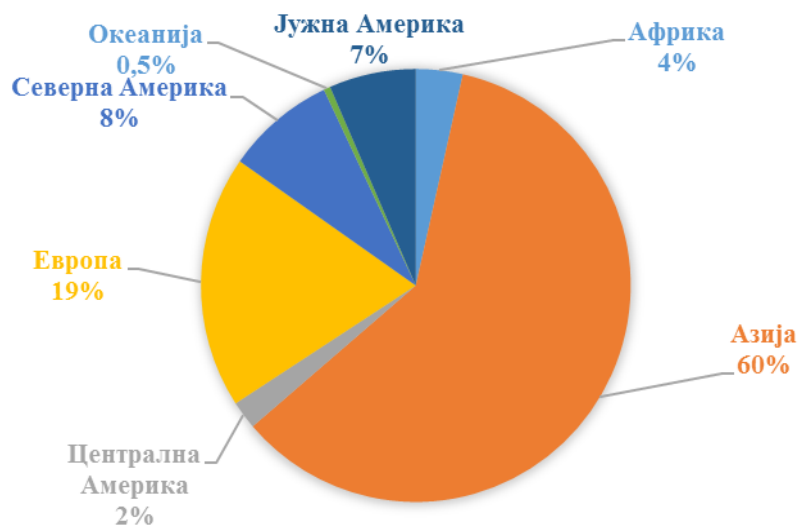
Према другим ауторима и поред присуства бластоцистиса код различитих животињских врста, бластоцистога људи је највероватније последица антропоноотске трансмисије што би објаснило чињеницу да овај паразит колонизује највероватније више од једне милијарде људи широм света (Alfellani и сар., 2013ц). Пошто је зоонотска трансмисија јасно документована само у неколико случајева, када је доказано да се ради о истом соју а не само истом суптипу, односно ако се узме у обзир чињеница о екстремној генетској разноликости бластоцистиса (чак и унутар појединих суптипова) овакве тврдње нису у потпуности неосноване.

### **2.5.2. Свиње као резервоар бластоцистиса**

Свињарство је важан део привреде многих држава, и једна од важнијих сточарских грана глобалне економије. Број свиња у свету у 2014. години износио је 985.673.301 (*Дијаграм 2*). Међу првих пет држава по броју свиња осим две развијене државе (САД, Немачка) налазе се и три земље у развоју: Вијетнам, Бразил и Кина. Чак 480.095.837 свиња, грубо речено, око 50% светске популације свиња налази се у Кини (*Извор: FAOSTAT*). Домаће и дивље свиње су пријемчиве

према великом броју заразних и паразитских обољења. Нека од ових обољења су ограничена само на свиње, док се друге болести лако размењују између свиња и различитих дивљих и домаћих животиња. Како број и географска дистрибуција домаћих и дивљих свиња константно расте, сигурно је да ће се повећати и број контаката између свиња и осталих домаћих животиња, а самим тим доћи ће до повећања вероватноће директне или индиректне експозиције људи на различите паразите свиња. *Blastocystis* је један од паразита свиња, који има потенцијал да инфицира човека па је разумно укључити га у анализу ризика зоонотске трансмисије. Према Stenzel и Boreham-у (1996) *Blastocystis* инфицира значајно више људи у земљама у развоју, него у развијеним земљама. Ако се узму у обзир статистички подаци према којима се више од 70% светске популације свиња налази у неразвијеном делу света, а истраживања о преваленци бластоцистиса код свиња указују на високу стопу инфицираности, разумно је усмерити истраживања на улогу свиња у епидемиологији хумане бластоцистозе.

Дијаграм 2. Дистрибуција светске популације свиња (ФАО, 2014)



Прве податке о инфекцији свиња паразитима *Blastocystis* sp. објавио је Burden (1976). Burden и сарадници (1978/1979) су пронашли *Blastocystis* код свиња са свих пет испитиваних фарми, и пријавили преваленцу од 60%. Rakandl (1991) је култивацијом на хранљивој подлози уз додатак коњског серума, такође утврдио



присуство бластоцистиса код свиња почев од тродневних прасади до одраслих свиња са преваленцом од 68-93%. Pakandl (1992) је доказао инфективност свињских изолата на лабораторијским мишевима и гербилинама (*Meriones unguiculatus*), што указује на ниску специфичност према домаћину.

Quilez и сарадници (1995) су у периоду од јануара 1992. до јула 1993. сакупили укупно 360 узорака фецеса од свиња (са и без ентеричних симптома) са 17 фарми са подручја Арагона (северо-исток Шпаније). Узорке су подвргли концентрацији формалин-етил-ацетатном седиментацијом и посматрали у форми директних или обојених препарата. Инфекцију су окарактерисали на основу броја паразита на видном пољу при увећању од 40×: као јаку (>5 паразита/видном пољу), умерену (1-5 паразита/видном пољу) и слабу (<5 паразита/видном пољу). *Blastocystis* sp. су идентификовали у фецесу 27 свиња, што је представљало преваленцу од 7,5%. *Blastocystis* је био присутан код свиња са девет од укупно 17 фарми (53%). Уочене су углавном вакуоларне форме, са извесном морфолошком хетерогеношћу. Паразити су били просечног дијаметра 7 μм. Инфекција је окарактерисана као јака код једне свиње, као умерена код шест свиња, док је преосталих 27 свиња показивало слабу колонизацију паразитом. Учесталост паразита је била различита код различитих категорија свиња (Табела 4.)

Табела 4. Преваленца и број паразита код свиња различите старости (Quilez и сар., 1995)

Узраст	Преваленца	Број паразита по видном пољу при увећању 40 ×		
		<1	1-5	>5
< 1месећ	0/23 (0%)	0	0	0
1-2 месеца	9/49 (18.4%)	7	2	0
2-6 месеци	12/78 (15.4%)	8	3	1
> 6 месеци	6/210 (28%)	5	1	0
Укупно	27/360 (7.5%)	20	6	1

Између резултата о преваленци Quilez-а и сарадника и резултата претходних аутора (Burden и сар., 1978/1979; Pakandl, 1991; Abe и сар., 2002) постоји сигнификантна разлика. Наиме, ови аутори пријављују преваленцу од 60 до 95%. Ако се узму у обзир литерарни подаци о релативној несензитивности примењеног дијагностичког поступка, преваленца од свега 7,5%, о којој пишу Quilez и сарадници, се мора узети у обзир са оправданом обазривошћу.

Прво свеобухватно истраживање о преваленци, факторима ризика од настанка инфекције и генотиповима бластоцистиса код свиња спровели су Navarro и сарадници 2008. године. На основу популације свиња од 1.129.055 грла на територији Аутономне Покрајине Валенсија (Шпанија) одређен је репрезентативан узорак од минимум 384 узорка. Аутори су сакупили 395 индивидуалних узорка фецеса од свиња са 11 фарми, које су биле организоване по 3 различита система менаџмента: 4 фарме по принципу од прашења до завршног това, 2 фарме по принципу од залучења до завршетка това, и 5 фарми по принципу од прашења до залучења. Узраст животиња је био главни стратум при дизајнирању плана узорковања (*Табела 5.*) Узорци су узимани пропорционално сваком старосном стратуму у периоду од фебруара 2004. до јуна 2005. године.

*Табела 5.* Број испитаних узорка према узрасту животиња и производном систему фарми (Navarro и сар. 2008).

Тип фарме	Број узоркованих фарми	Категорија (узраст)	Број узорка
Прашење – Завршни тов	4	Крмаче (> 6 месеци)	28
		Прасад (< 1 месец)	58
		Залучена прасад (1-2 месеца)	83
		Товљеници (2-4 месеца)	57
		Товљеници (4-6 месеци)	19
Прашење - Залучење	5	Крмаче (> 6 месеци)	15
		Прасад (< 1 месец)	35
Залучење – Завршни тов	2	Товљеници (4-6 месеци)	100

Узорци су прегледани одмах по достављању у лабораторију. Након концентрације узорка фецеса, они су посматрани под светлосним микроскопом при увећавању од 40×. ДНК је изолована директно из фецеса, а у PCR протоколу за амплификацију дела SSU rDNA бластоцистиса примењени су прајмери које су дизајнирали Böhm-Gloning и сарадници (1997). Noël и сарадници (2005) су насумично одабрали 10 узорка PCR позитивних на бластоцистис и извршили њихово секвенцирање и филогенетску анализу, према систему који су објавили и притом су доказали највећу заступљеност ST1. У истом истраживању они су доказали преваленцу бластоцистиса од 44,6%.

Микроскопским прегледом уочене су, углавном вакуоларне и цистичне форме *Blastocystis* sp. у 163 узорка, што је индикувало преваленцу од 41,3%. *Blastocystis* је

пронађен на свакој узоркованој фарми, и код сваке категорије свиња, чак и код прасади узраста до 21 дан. Прегледом нису уочене амебоидне форме, а осим бластоцистиса уочени су и други паразити, међу којима су доминирали *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., *Entamoeba polecki*, *Balantidium coli* и *Iodamoeba butschlii*. У незнатном броју узорака су уочени *Trichuris suis*, *Strongyloides ransomi*, *Eimeria* sp. и *Isospora* sp. Већина прегледаних узорака је била нормалне конзистенције без јасне корелације између конзистенције столице и броја паразита по видном пољу. Три узорка су била полу течне конзистенције, од тих узорка два су садржала велики број бластоцистисана у микроскопском видном пољу, додуше оба узорка су била позитивна и на ооцисте *Cryptosporidium* sp. Мали је број радова, који се баве корелацијом бластоцистиса са клинички манифестованим обољењем свиња. Quilez и сарадници (1995) нису уочили никакву повезаност инфекције бластоцистисом са клиничким симптомима. Pakandl (1994) је детектовао инфекције интензитета од чак осам паразита по видном пољу при увећању од 100×, али није успео да пронађе корелацију између интензитета инфекције и дијареје код свиња. Solaýmani-Mohammadi и сарадници (2004) су изоловали *Blastocystis* sp. из дивљих свиња различите старости, међутим све свиње су биле клинички здраве.

Navarro и сарадници (2008) су узели у разматрање следеће факторе ризика, за које су претпоставили су повезани са бластоцистозом свиња: 1) Време узорковања (датум); 2) Тип фарме; 3) Узраст; 4) Пол. Пол животиња су накнадно искључили из анализе због статистички недовољног броја података. Најзначајнијом променљивом се показао узраст животиња, пошто су сигнификантно већем ризику у односу на остале категорије, били изложени товљеници узраста 2-4 месеца и залучена прасад узраста до 2 месеца. Аутори су већу стопу инфицираности залучене прасади (< 2 месеца) приписали недовољно развијеном имунолошком систему. Већа преваленца паразита код товљеника (2-4 месеца) се може приписати већој густини насељености ових животиња која промовише међусобну трансмисију, односно чињеници да је већина узоркованих животиња у једном запату товљеника водила порекло са више различитих фарми. Значајна разлика је постојала још и код датума узорковања. Наиме, узорци сакупљени у топло

периоду године (април, мај и јун) су показивали већи степен инфицираности у односу на узорке сакупљене у хладном периоду године (децембар, фебруар и март).

Li и сарадници (2007a) су доказали да контакт човека са свињама у сеоским домаћинствима представља ризик од настанка бластоцистозе људи. Стојшић (2016) је у докторској дисертацији, доказала статистички већу учесталост колитиса и хроничне инфламаторне болести црева код деце која су била инфицирана бластоцистисом, као и да је значајно више инфицираних поседовало домаће животиње (између осталог и свиње) и/или кућне љубимце. Stensvold и сарадници (2009a) су у истом истраживању у којем су повезали ИБС са бластоцистисом, доказали јаку повезаност контакта са свињама и живином у *Blastocystis* инфекцијама људи. Из случајног узорка од 126 људи код 19 је дијагностикован *Blastocystis*. Од тих 126 испитаника троје је било у контакту са свињама 7 дана пре узорковања столице, и код сво троје (100%) је доказан *Blastocystis*, док је 11 испитаника било у контакту са живином, од којих се 5 особа (45%) показало позитивним на присуство бластоцистиса. Ниједан одређени изолат из људи није био повезан са контактом са животињама, изоловани су уобичајени суптипови (ST1, ST2, ST3 и/или ST4) који су присутни код људи. Међутим, литерарни докази говоре да су свиње домаћини ST1, ST2, ST3 и потенцијалног зооноског суптипа ST5 (Yan и сар., 2007). Ипак аутори предлажу детаљнију молекуларну анализу, да би се изолати из људи недвосмислено повезали са изолатима из свиња, односно да би се разјаснио правац трансмисије.

Висока преваленца бластоцистиса код свиња, са најчешће присутним суптиповима 1 и 5, указује да су свиње највероватније природни домаћини ових паразита. Иако се суптип 5 сматра релативно ретким код човека, потенцијална зоононска трансмисија је већ доказана (Yan и сар., 2007). У циљу тестирања ове хипотезе Wang и сарадници (2014b) су молекуларној анализи подвргли узорке фецеса од свиња и људи, који су били у контакту са тим свињама. Једну групу су чиниле свиње из интензивног узгоја са фарми југо-источног Квинсленда (Аустралија) и радници са фарми, док су другу групу чиниле свиње и људи из села у руралном делу Камбоце. Преваленца бластоцистиса код свиња из интензивног

узгоја је износила 76,7%, док је преваленца код свиња из руралног подручја Камбоџе износила 45,2%. Код свих свиња је доказано присуство суптипа 5. Међу радницима са фарми свиња проценат позитивних узорака је био чак 83,3%, док су становници камбоџанског села били инфицирани у 55,2% случајева. Код људи су доказани суптипови 1, 2, 3 и 5. Интересантно је да је суптип 5 (иначе редак налаз код људи) био присутан код 13,9% (5/36) радника са фарми, док уопште није доказан код људи из сеоских газдинстава. Аутори закључују да блиски контакт радника са свињама представља ризик од зоонотске трансмисије.

### **3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**

#### **3.1. Утврђивање преваленце бластоцистиса код свиња на територији АП Војводине**

У научној литератури не постоје подаци о епидемиологији бластоцистиса код свиња на територији Републике Србије. Први од циљева истраживања је доказивање присуства и одређивање преваленце бластоцистиса код домаћих свиња на територији Војводине. На основу истраживања других аутора очекивани резултати о преваленци су не мањи од 30%. Добијени резултати о присуству бластоцистиса код свиња ће помоћи у разјашњавању улоге ових животиња у екологији и епидемиологији бластоцистиса. Такође, резултати ће представљати допринос медицинској географији, односно показати присуство новог паразита у популацији свиња на територији Војводине.

#### **3.2. Утврђивање присуства суптипова бластоцистиса код свиња на територији Војводине**

Одређени суптипови бластоцистиса су у литератури недвосмислено окарактерисани као зоонотски. Други циљ истраживања је молекуларна анализа изолата бластоцистиса код свиња, односно утврђивање њихове припадности одређеним суптиповима. Очекивани резултат молекуларне анализе је у расветљавању зоонотског потенцијала бластоцистиса код свиња и утврђивање природног резервоара инфекције за људе на територији Војводине.

#### **3.3. Упоредивање различитих дијагностичких метода у детекцији *Blastocystis* sp. код свиња**

У научној литератури постоји велики број истраживања које се баве оценом перформанси и компарацијом појединих дијагностичких поступака. Већина ових истраживања је спроведена на хуманим узорцима, док не постоје упоредна истраживања различитих дијагностичких метода када је предмет истраживања фецес свиња. Трећи циљ истраживања је управо упоређивање перформанси различитих дијагностичких поступака у доказивању бластоцистиса код свиња.

## 4. ХИПОТЕЗА

### Основне хипотезе од којих се полази у истраживању:

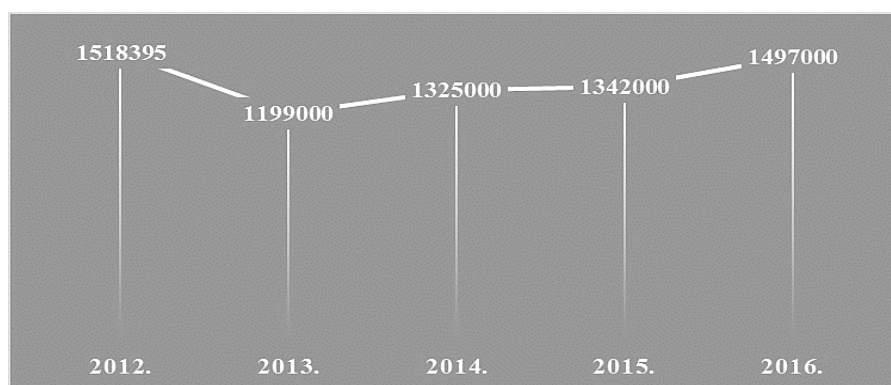
- Дијагностичке перформансе молекуларних техника у дијагностици *Blastocystis* sp. код свиња су супериорне у односу на традиционалне паразитолошке технике.
- Стопа преваленце *Blastocystis* sp. у популацији свиња на територији АП Војводине није мања од 30%.
- Свиње су резервоар одређених зоонотских суптипова *Blastocystis* sp. и представљају фактор ризика у ширењу инфекције на људе.

## 5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 5.1. Избор и структура узорка

Бројно стање популације свиња на територије Аутономне Покрајине Војводине за период од 2012. до 2016. године приказано је на *Дијаграму 3*, на основу података Републичког Завода за Статистику (РЗС).

*Дијаграм 3.* Бројно стање популације свиња у АП Војводини за период 2012-2016.



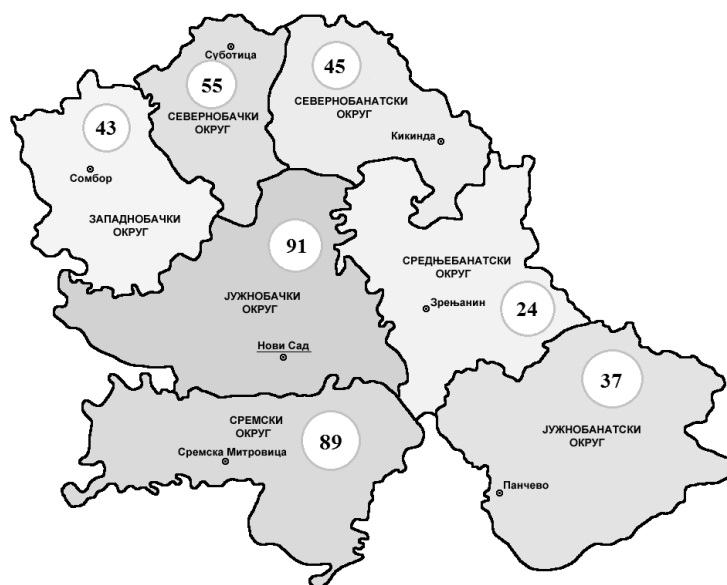
На основу дијаграма се јасно види да је број свиња за период од три године (2013-2016) заснован на процени, док је податак од 1.518.395 свиња заснован на попису пољопривреде, који је спроведен 2012. године. Од тог броја свиња у региону Бачке се налазило 747.555 (49%), у региону Баната 415.844 (28%), док је у Срему број свиња износио 354.996 грла (23%). Дистрибуција популације свиња по окрузима појединих региона АП Војводине приказана је у *Табели 6* (према попису пољопривреде 2012.).

*Табела 6.* Дистрибуција свиња по окрузима АП Војводине

Округ	Број свиња у округу	Удео у укупној популацији на нивоу региона	Удео у укупној популацији на нивоу покрајине
Западно-Бачки округ	170.350	22,8 %	11,2%
Јужно-Бачки округ	360.976	48,3 %	23,8%
Северно-Бачки округ	216.229	28,9 %	14,2%
Јужно-Банатски округ	145.529	35,0 %	9,6%
Северно-Банатски округ	177.223	42,6 %	11,7%
Средње-Банатски округ	93.092	22,4 %	6,1%
Сремски округ	354.996	100,0 %	23,4%



Републички Завод за Статистику дана 23.05.2016 године објавио податак, на основу кога је број свиња на територији АП Војводине датог дана износио 1.497.000. На основу тог броја је израчунат минимални броја узорака неопходних за одређивање стварне преваленце бластоцистиса. Од укупног броја свиња око 7.000 су чинили нерастови, који су били искључили из истраживања због релативно малог броја у укупној популацији и оправданих техничких и ветеринарско-санитарних фактора који би отежавали узорковање. Искључење нерастова није утицало на број неопходних узорака за одређивање преваленце.



Слика 3. Број неопходних узорака, за приказивање праве преваленце паразита, по окрузима АП Војводине

Неопходан број узорака је израчунат на основу метода којег су описали Hsieh и сарадници (1998). Да би се добила права слика о преваленци бластоцистиса у популацији од 1.490.000 свиња, неопходно је било узорковати  $n=384$  индивидуална узорка фецеса.

Минимална величина узорка, одређена је применом следеће формуле:

$$n = Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 \frac{P(1-P)}{d^2}$$

где је  $n$  - обим (величина) узорка,  $Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2$  интервал поверења,  $P$  - процењена вероватноћа догађаја,  $d$  – стандардна грешка. За 95% интервал поверења  $Z_{1-\frac{\alpha}{2}} = 1.96$  ( $Z$  има нормалну расподелу са математичким очекивањем 0 и стандардном девијацијом 1). Пошто је 95% интервал поверења, стандардна грешка је 5%. Одатле је  $d = 0.05$ .  $P = 0.50$  јер је исход догађаја бинарна променљива (0-негативан резултат, 1-позитиван резултат). Ако се наведене вредности замене у дату формулу, следи:

$$n = Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 \frac{P(1-P)}{d^2}$$

$$n = 1.96^2 \frac{0.50(1-0.50)}{0.05^2}$$

$$n = 384$$

Пропорционално броју свиња у три региона Војводине, неопходно је било сакупити 189 узорака са територије Бачке, 106 узорака са територије Баната, односно 89 узорака са територије Срема. На основу удела у укупној популацији на нивоу појединих региона, одређен је број неопходних узорака из сваког округа АП Војводине (*Слика 3*).

Према подацима РСЗ свиње су категоризоване у 8 различитих категорија. На основу удела различитих категорија у укупној популацији свиња, одређен је пропорционалан број потребних узорака од сваке категорије. (*Табела 7*).

*Табела 7.* Категорије свиња и потребан број узорака по категорији за одређивање преваленце.

Категорија свиња	Број свиња	% од укупног броја свиња	Неопходан минималан број узорака
Прасад масе до 20 кг	531.000	35.6%	136
Свиње масе 20-49 кг	369.000	24.8%	95
Товљеници масе 50-79 кг	229.000	15.4%	60
Товљеници масе 80-110 кг	131.000	8.8%	34
Товљеници масе преко 110 кг	48.000	3.2%	12
Приплодне назимице	44.000	2.9%	11
Приплодне крмаче	138.000	9.3%	36
Нерастови	7.000	0.47%	* искључени из узорковања
<b>Укупно:</b>	<b>1.497.000</b>	<b>100%</b>	<b>384</b>

У периоду од 23.08.2016 до 04.11.2016 укупно је сакупљено 403 индивидуална узорка фецеса свиња. Узорковање је извршено на укупно 10 фарми, од којих је пет фарми било на територији Бачке, две фарме су биле на територији Срема и три фарме на територији Баната (*Табела 8*). Узорци су били распоређени пропорционално броју свиња одређене категорије (*Табела 9*).

*Табела 8.* Планиран и остварен број узорака по регионима и окрузима АП Војводине

Регион	Планиран број узорака	Остварен број узорака	Округ	
Бачка	189	220	Северно-Бачки	64
			Западно-Бачки	50
			Јужно-Бачки	106
Банат	106	94	Северно-Банатски	40
			Средње-Банатски	21
			Јужно-Банатски	33
Срем	89	89	Сремски	89
			Укупно:	403

*Табела 9.* Број узорака по категоријама

Категорија свиња	Планиран број узорака	Остварен број узорака
Прасад масе до 20 кг	136	137
Свиње масе 20-49 кг	95	95
Товљеници масе 50-79 кг	60	60
Товљеници масе 80-110 кг	34	34
Товљеници масе преко 110 кг	12	12
Приплодне назимице	11	29
Приплодне крмаче	36	36
	Укупно: 384	403

## 5.2. Нативни преглед

Индивидуални ректални узорци фецеса су уз помоћ стерилних рукавица сакупљени у стерилне пластичне посуде. Посуде су прописно обележене ознаком фарме, редним бројем узорка и категоријом свиња од које је потицао узорак. Узорци су достављени у лабораторију у року од три сата од момента узорковања. Сваки узорак је подељен на три дела:

- 1) око 300 ml узорка је одвојено у PCR епрувете од 1.5 ml (Eppendorf® Safe-Lock microcentrifuge tubes). Узорци су чувани на -20°C до момента екстракције ДНК.

- 2) 50-100 ml узорка је одвојено за *in vitro* култивацију
- 3) остатак фецеса је хомогенизован и употребљен за нативни преглед

Фецес је у посуду у којој је допремљен у лабораторију хомогенизован (након одвајања довољне количине за молекуларну дијагностику и култивацију) уз помоћ стерилног дрвеног штапића. Мања количина хомогенизованог фецеса је уз помоћ штапића пренета на предметно стакло. На размаз фекалног материјала је потом капалком додата једна кап физиолошког раствора. Предметно стакло је покривено покровном лъуспицом. Препарат је потом посматран под светлосним микроскопом при увеличању од 10× и 40×.

### 5.3. *In vitro* култивација

За умножавање паразита у циљу лакше лабораторијске дијагностике примењена је ксенична (не-стерилна) метода *in vitro* култивације. Као подлога за умножавање паразита употребљен је модификован Jones-ов медијум уз додатак коњског серума.

Припрема медијума почиње тако што се направе следећи раствори:

- 1) 9,46 грама  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  се раствори у 1 литри дестиловане воде
- 2) 9,08 грама  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  се раствори у 1 литри дестиловане воде
- 3) 9,00 грама  $\text{NaCl}$  се раствори у 1 литри дестиловане воде.

Да би се добио модификовани Jones-ов медијум помеша се:

- 1) 93,8 ml раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 2) 31,3 ml раствора  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$
- 3) 562,5 ml раствора  $\text{NaCl}$

Добијена мешавина раствора се аутоклавира на температури од 120° С у трајању од 15 минута. Подлога се чува у фрижидеру на температури од +4 до +8° С. Коњски серум, који се претходно инактивира на температури од 56° С у трајању од 30 минута, се додаје подлози непосредно пре употребе.

У првом кораку смо добијену подлогу разлили у прописно обележене стерилне епрувете за једнократну употребу. У сваку епрувету је додато 2,7 мл модификованог Jones-ов медијума а потом је у сваку епрувету додато 0., мл инактивисаног коњског серума (Horse Serum, Heat inactivated, Sterile-filtered, Sigma-Aldrich® , USA).

У сваку епрувету је уз помоћ стерилног дрвеног штапића додато отприлике 50-100 мг фецеса. Епрувете су затворене одговарајућим чепом. Засејана култура се потом инкубисала у трајању од 48 до 72 сата, на температури од 37° С. Присуство бактерија у фекалном материјалу је довољно за стварање анаеробних услова, који омогућавају раст и умножавање бластоцистиса. Након периода инкубације узорци су прегледани тако што је кап седимента пренета на предметно стакло и покривена љуспицом, а тако припремљени препарати су посматрани под светлосним микроскопом при увећању од 400 пута. Пажња је била усмерена ка уочавању вакуоларне форме паразита, која доминира у култури, али и других морфолошких облика бластоцистиса. Ради лакшег уочавања морфолошких форми, одређени број препарата је обојен Луголовим раствором.

## 5.4. Молекуларна дијагностика

### 5.4.1. Екстракција ДНК

Екстракција ДНК је извршена директно из фецеса комерцијалним китом **QIAamp DNA Stool Mini Kit** (QIAGEN) према упутству произвођача (*Слика 4.*). Протокол за екстракцију ДНК из фецеса у циљу доказивања присуства паразита, обухвата следеће кораке:

- 1) Припреми се довољна количина уситњеног леда у који се смештају узорци све до момента додавања првог пуфера. Ако би дозволили отапање фецеса

дошло би до деградације ДНК у узорку. Након додавања првог пуфера сви остали кораци екстракције се изводе на собној температури (15-25° С).

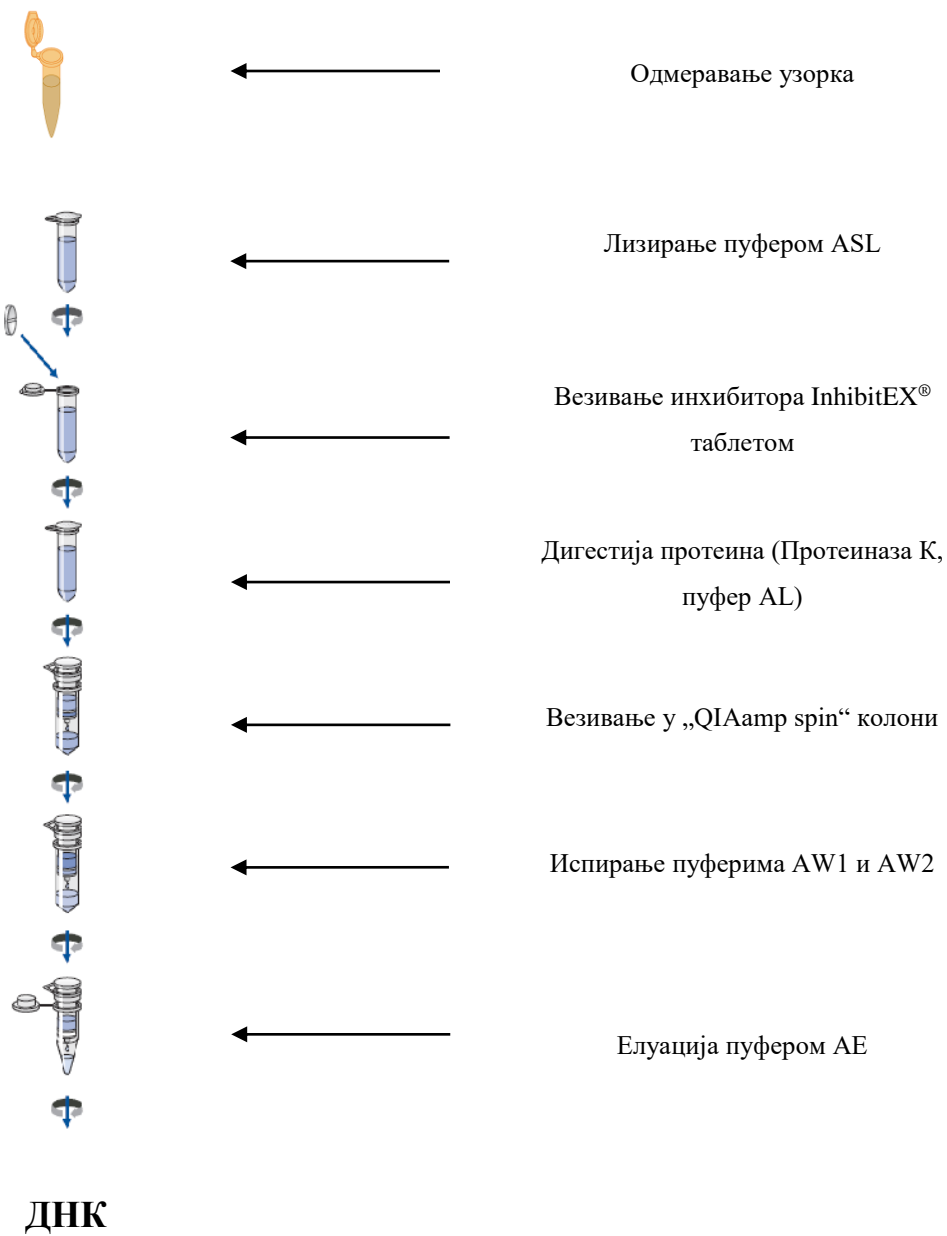
- 2) Око 180-220 mg фецеса се одмери у епрувете запремине 2 ml погодне за микро-центрифугирање. Епрувете у које је одмерен фецес се забадају у уситњен лед.
- 3) Додаје се 1,4 ml пуфера ASL у сваки узорак. Пуфер ASL има улогу у лизирању ћелија, и дизајниран је тако да одстрањује инхибиторне компоненте из столице. Узорци се затим хомогенизују у трајању од 1 минута уз помоћ „Vortex“ апарата. Узорци морају бити добро хомогенизовани да би се на крају екстракције добила максимална концентрација ДНК.
- 4) Узорци у које је додат пуфер се инкубишу на температури од 70° С у трајању од 5 минута. Загревање узорка повећава коначну концентрацију ДНК за 3-5 пута, односно помаже у лизи бактерија и паразита.
- 5) Након инкубирања узорци се хомогенизују у трајању од 15 секунди уз помоћ „Vortex“ апарата. Затим се центрифугирају на максималном броју обртаја у трајању од 1 минута.
- 6) У следећем кораку се 1,2 ml супернатанта пипетом пренесе у нове епрувете запремине 2 ml, а седимент се одбацује. Пребацивање мале количине седимента приликом пипетирања супернатанта не ремети процедуру екстракције.
- 7) У следећем кораку се у сваки узорак додаје по једна InhibitEX<sup>®</sup> таблета. Узорци столице садрже много компоненти које разлажу ДНК, односно инхибирају ензимске реакције. InhibitEX<sup>®</sup> таблете ефикасно везују ове компоненте и уклањају их из узорка у раној фази екстракције. Након додавања таблете узорак се хомогенизује уз помоћ „Vortex“-а у трајању од 1 минута, односно све док се таблета у потпуности не раствори. Након хомогенизације следи инкубирање на собној температури у трајању од 1 минута, да би се инхибитори везали за InhibitEX<sup>®</sup> матрикс.

- 8) Узорак се центрифугира на максималном броју обртаја у трајању од 3 минута што омогућава седиментацију инхибитора везаних за InhibitEX<sup>®</sup> матрикс.
- 9) У следећем кораку се супернатант пипетира у епрувете запремине 1,5 ml, док се седимент одбацује. Пребацивање мале количина седимента приликом пипетирања супернатанта не ремети процедуру екстракције. Потом се епрувете са супернатантом центрифугују на максималном броју обртаја у трајању од 3 минута.
- 10) У овом кораку се 15 µl Протеиназе К одмери у празне епрувете запремине 1,5 ml. Протеиназа К инаktivира нуклеазе које доводе до деградације ДНК (или РНК) у процесу пурификације.
- 11) У наредном кораку се 200 µl супернатанта из корака 9 пипетира у епрувете од 1,5 ml, које садрже Протеиназу К.
- 12) У овом кораку се у сваки узорак додаје 200 µl пуфера AL, који има улогу у лизирању. Узорци се хомогенизују уз помоћ „Vortex“ апарата у трајању од 15 секунди. Важно је темељно хомогенизовати узорке.
- 13) Потом се врши инкубисање на температури од 70° C у трајању 10 минута.
- 14) У овом кораку се додаје 200 µl етанола (96-100%) у лизат, који се затим меша уз помоћ „Vortex“ апарата.
- 15) Прописно обележена „QIAamp spin“ колона се смешта у епрувете од 2 ml, које су саставни део кита за екстракцију. Комплетни лизат из корака 14 се пипетом пажљиво пребацује у колону без додиривања руба и мембране „QIAamp spin“ колоне. Колона се затвара и центрифугује на максималном броју обртаја у трајању од 1 минута. Након центрифуговања колона се пребацује у нову епрувету од 2 ml, док се епрувета са филтратом одбацује.
- 16) Након пажљивог отварања у колоне се додаје 500 µl пуфера AW1. Након затварања колоне, она се центрифугује на максималном броју обртаја у

трајању од 1 минута. Колоне се пребацују у нове епрувете од 2 ml а филтрат се одбацује.

- 17) Након пажљивог отварања у колоне се додаје 500  $\mu$ l пуфера AW2. Узорак се центрифугира на максималном броју обртаја у трајању од 3 минута. Епрувета у којој се налази филтрат се одбацује. Пуфери AW1 и AW2 омогућавају испирање мембране QIAamp spin“ колоне. Важно је да пуфери у потпуности прођу кроз мембрану, пошто заостали пуфери могу узроковати проблеме у ензимским реакцијама.
- 18) Колоне се пребацују у епрувете запремине 1,5 ml. Након пажљивог отварања у колоне се додаје 200  $\mu$ l пуфера АЕ. Након инкубисања од 1 минута на собној температури, узорак се центрифугује на максималном броју обртаја у трајању од 1 минута у циљу елуације ДНК. Добијена екстрахована ДНК се чува на температури од  $-20^{\circ}$  C до момента извођења PCR реакције.





Слика 4. Шематски приказ екстракције ДНК из узорка фецеса

#### 5.4.2. Ланчана Реакција Полимеразе (PCR)

У циљу молекуларне дијагностике *Blastocystis* sp. примењен је PCR метод по протоколу који су описали Scicluna и сар. (2006). Овај протокол амплификује регион 600 базних парова *SSU-rDNA* гена бластоцистиса. У PCR реакцији примењени су следећи прајмери:

1) BhRD<sub>r</sub> (5' – GAGCTTTTТААСТGCAACAACG –3')

2) RD5 (5' – АТСТGGTTGATCCTGCCAGT –3')

Састав PCR реакције је био следећи:

10 µl HotStarTaq *Plus* Master Mix (Qiagen),

25 µl оба прајмера,

2 µl CoralLoad концентрата,

5,5 µl PCR воде,

и 2 µl ДНК екстраховане из фецеса свиња, у укупној количини од 20 µl.

Услови PCR реакције су били следећи: иницијална денатурација на температури 95° C у трајању од 5 минута, 30 амплификационих циклуса у трајању од 1 минута на температурама од 94°, 59°, 72° C, уз финалну екстензију на 72° C у трајању од 2 минута. За извођење PCR реакције коришћен је ThermoCycler Techne TC-412. Из описане PCR реакције, добијени PCR продукти су раздвојени у 2%-ном агарозном гелу у 1x Tris-Borate-EDTA пуферу (Gibco® UltraPure™ TBE Buffer, pH 8.3), применом електрофорезе у следећим условима: 110V, 500mA, 20°C. У сваки гел је укључен и маркер молекуларне тежине (ThermoScientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder). Након бојења етидијум бромидом гел анализиран уз помоћ документационог система Serva BlueCube 300.

#### 5.4.3. Молекуларна суптипизација

Молекуларна суптипизација спроведена је применом STS прајмера које су дизајнирали Yoshikawa и сарадници (2004б). Употребљени су прајмери за доказивање суптипова за које се очекивало да су најприсутнији у популацији свиња (Табела 10.).

Састав PCR реакције је био следећи:

12.5  $\mu$ l HotStarTaq *Plus* Master Mix (Qiagen),

1  $\mu$ l оба прајмера,

2.5  $\mu$ l CoralLoad концентрата,

5  $\mu$ l PCR воде,

и 3  $\mu$ l ДНК екстраховане из фецеса свиња, у укупној количини од 25  $\mu$ l.

PCR протокол који је примењен описали су Yan и сарадници (2007). Услови PCR реакције су били следећи: 1 циклус денатурације на температури 94° C у трајању од 3 минута, 30 циклуса амплификације (59° C / 30 секунди, 72° C / 60 секунди, 94° C / 30 секунди), уз додатни циклус у трајању од 5 минута на температури од 72° C. За извођење PCR реакције коришћен је ThermoCycler Techne TC-412. Добијени PCR продукти су раздвојени у 2%-ном агарозном гелу у 1x Tris-Borate-EDTA пуферу (Gibco® UltraPure™ TBE Buffer, pH 8.3), применом електрофорезе у следећим условима: 110V, 500mA, 20°C. У сваки гел је укључен и маркер молекуларне тежине (ThermoScientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder). Гел је након бојења етидијум бромидом анализиран уз помоћ документационог система Serva BlueCube 300.

Табела 10. STS прајмери за суптипизацију (Yoshikawa и сар. 20046).

Суптип	Ознака сета прајмера	Величина PCR продукта (bp)	Секвенце прајмера
1	<b>SB83</b>	351	<i>F</i> 5' – GAA GGA CTC TCT GAC GAT GA – 3' <i>R</i> 5' – GTC CAA ATG AAA GGC AGC – 3'
2	<b>SB340</b>	704	<i>F</i> 5' – TGT TCT TGT GTC TTC TCA GCT C – 3' <i>R</i> 5' – TTC TTT CAC ACT CCC GTC AT – 3'
3	<b>SB227</b>	526	<i>F</i> 5' –AGG ATT TGG TGT TTG GAG A– 3' <i>R</i> 5' – TTA GAA GTG AAG GAG ATG GAA G – 3'
5	<b>SB336</b>	317	<i>F</i> 5' – GTG GGT AGA GGA AGG AAA ACA – 3' <i>R</i> 5' – AGA ACA AGT CGA TGA AGT GAG AT – 3'

### 5.5. Статистичка анализа података

Минимална величина узорка одређена је применом формуле:  $n = Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 \frac{P(1-P)}{d^2}$ , где је  $n$  - обим (величина) узорка,  $Z_{1-\frac{\alpha}{2}}$  - интервал поверења,  $P$  - процењена вероватноћа догађаја,  $d$  - стандардна грешка (Hsieh и сар., 1998).

Преваленца, односно проценат заражених јединки израчуната је према формули:  $\Pi = \text{број инфицираних јединки} / \text{укупан број јединки у узорку} * 100 (\%)$ .

Повезаност резултата добијених применом нативног прегледа и *in vitro* култивације са категоријама свиња, регионима, односно различитим фармама испитана је користећи  $\chi^2$  тест независности (Pearsonov  $\chi^2$ ).

Осетљивост различитих дијагностичких поступака испитана је применом епидемиолошког калкулатора *EpiTools* (AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease, <http://epitools.ausvet.com.au>), а резултати су приказани у процентима.

Статистичка анализа и обрада података је вршена у програмском језику **RStudio** (верзија R i386 3.3.2).

## 6. РЕЗУЛТАТИ

### 6.1. Резултати нативног прегледа и *in vitro* култивације

Укупан број од 403 индивидуална узорка фецеса свиња је био нативно прегледан и култивисан у условима *in vitro*. Резултати ове две дијагностичке методе приказани су у *Табели 11*.

*Табела 11.* Резултати нативног прегледа и *in vitro* култивације фецеса свиња (СБ: Северна Бачка; ЗБ: Западна Бачка; ЈБ: Јужна Бачка; СБн: Северни Банат; СрБн: Средњи Банат; ЈБн: Јужни Банат; Ср: Срем)

Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе	Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе	Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе
ЗБ/01	нег	нег	ЗБ/34	нег	поз	ЈБ/25	нег	поз
ЗБ/02	нег	нег	ЗБ/35	нег	поз	ЈБ/26	нег	нег
ЗБ/03	поз	поз	ЗБ/36	нег	поз	ЈБ/27	поз	нег
ЗБ/04	нег	поз	ЗБ/37	нег	поз	ЈБ/28	нег	нег
ЗБ/05	поз	поз	ЗБ/38	нег	поз	ЈБ/29	нег	нег
ЗБ/06	нег	поз	ЗБ/39	нег	поз	ЈБ/30	нег	нег
ЗБ/07	нег	поз	ЗБ/40	нег	нег	ЈБ/31	нег	нег
ЗБ/08	нег	поз	ЗБ/41	нег	поз	ЈБ/32	нег	нег
ЗБ/09	нег	поз	ЗБ/42	нег	нег	ЈБ/33	нег	нег
ЗБ/10	нег	поз	ЈБ/01	нег	поз	ЈБ/34	нег	нег
ЗБ/11	нег	нег	ЈБ/02	поз	поз	ЈБ/35	нег	поз
ЗБ/12	поз	поз	ЈБ/03	нег	поз	ЈБ/36	нег	поз
ЗБ/13	нег	поз	ЈБ/04	нег	нег	ЈБ/37	нег	поз
ЗБ/14	нег	поз	ЈБ/05	нег	поз	ЈБ/38	нег	поз
ЗБ/15	нег	нег	ЈБ/06	нег	поз	ЈБ/39	нег	поз
ЗБ/16	поз	поз	ЈБ/07	нег	поз	ЈБ/40	нег	поз
ЗБ/17	нег	нег	ЈБ/08	нег	нег	ЈБ/41	поз	поз
ЗБ/18	нег	поз	ЈБ/09	нег	нег	ЈБ/42	нег	нег
ЗБ/19	нег	нег	ЈБ/10	нег	поз	ЈБ/43	нег	нег
ЗБ/20	нег	нег	ЈБ/11	нег	поз	ЈБ/44	нег	нег
ЗБ/21	нег	поз	ЈБ/12	поз	поз	ЈБ/45	нег	нег
ЗБ/22	нег	нег	ЈБ/13	нег	поз	ЈБ/46	нег	поз
ЗБ/23	нег	поз	ЈБ/14	поз	поз	ЈБ/47	нег	нег
ЗБ/24	нег	нег	ЈБ/15	нег	поз	ЈБ/48	нег	нег
ЗБ/25	нег	поз	ЈБ/16	нег	нег	ЈБ/49	поз	поз
ЗБ/26	нег	нег	ЈБ/17	нег	поз	ЈБ/50	поз	поз
ЗБ/27	нег	поз	ЈБ/18	нег	поз	ЈБ/51	нег	поз
ЗБ/28	нег	поз	ЈБ/19	нег	поз	ЈБ/52	поз	поз
ЗБ/29	нег	поз	ЈБ/20	нег	поз	ЈБ/53	поз	поз
ЗБ/30	нег	поз	ЈБ/21	поз	поз	ЈБ/54	нег	поз
ЗБ/31	нег	поз	ЈБ/22	поз	нег	ЈБ/55	нег	поз

Наставак табеле са стране 78.

Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе	Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе	Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе
ЗБ/32	нег	поз	ЈБ/23	нег	поз	ЈБ/56	нег	поз
ЗБ/33	нег	поз	ЈБ/24	нег	поз	ЈБ/57	нег	нег
ЈБ/58	поз	поз	ЈБ/100	поз	поз	СБ/36	нег	поз
ЈБ/59	поз	поз	ЈБ/101	поз	поз	СБ/37	нег	поз
ЈБ/60	поз	поз	ЈБ/102	поз	поз	СБ/38	нег	поз
ЈБ/61	поз	поз	ЈБ/103	нег	поз	СБ/39	поз	поз
ЈБ/62	поз	поз	ЈБ/104	нег	нег	СБ/40	поз	поз
ЈБ/63	нег	поз	ЈБ/105	поз	поз	СБ/41	поз	поз
ЈБ/64	нег	поз	ЈБ/106	нег	нег	СБ/42	нег	поз
ЈБ/65	нег	поз	СБ/01	поз	нег	СБ/43	нег	поз
ЈБ/66	поз	поз	СБ/02	поз	нег	СБ/44	нег	нег
ЈБ/67	нег	нег	СБ/03	поз	нег	СБ/45	поз	поз
ЈБ/68	нег	нег	СБ/04	нег	поз	СБ/46	поз	поз
ЈБ/69	поз	поз	СБ/05	нег	поз	СБ/47	нег	нег
ЈБ/70	поз	поз	СБ/06	нег	поз	СБ/48	нег	поз
ЈБ/71	поз	поз	СБ/07	нег	нег	СБ/49	нег	поз
ЈБ/72	нег	нег	СБ/08	нег	поз	СБ/50	поз	поз
ЈБ/73	нег	поз	СБ/09	нег	поз	СБн/01	нег	нег
ЈБ/74	нег	нег	СБ/10	поз	поз	СБн/02	нег	поз
ЈБ/75	поз	поз	СБ/11	поз	поз	СБн/03	нег	поз
ЈБ/76	поз	поз	СБ/12	нег	поз	СБн/04	поз	поз
ЈБ/77	поз	поз	СБ/13	нег	поз	СБн/05	поз	поз
ЈБ/78	нег	нег	СБ/14	поз	поз	СБн/06	нег	нег
ЈБ/79	поз	поз	СБ/15	нег	поз	СБн/07	поз	поз
ЈБ/80	поз	поз	СБ/16	нег	поз	СБн/08	нег	нег
ЈБ/81	поз	поз	СБ/17	поз	поз	СБн/09	поз	поз
ЈБ/82	нег	нег	СБ/18	поз	поз	СБн/10	нег	нег
ЈБ/83	нег	нег	СБ/19	нег	поз	СБн/11	нег	поз
ЈБ/84	нег	поз	СБ/20	нег	поз	СБн/12	нег	поз
ЈБ/85	нег	нег	СБ/21	поз	поз	СБн/13	поз	поз
ЈБ/86	нег	нег	СБ/22	поз	поз	СБн/14	поз	поз
ЈБ/87	поз	поз	СБ/23	нег	поз	СБн/15	нег	поз
ЈБ/88	нег	нег	СБ/24	нег	нег	СБн/16	поз	поз
ЈБ/89	нег	нег	СБ/25	нег	поз	СБн/17	поз	поз
ЈБ/90	поз	поз	СБ/26	нег	поз	СБн/18	нег	поз
ЈБ/91	поз	поз	СБ/27	поз	поз	СБн/19	поз	поз
ЈБ/92	поз	поз	СБ/28	поз	поз	СБн/20	поз	поз
ЈБ/93	нег	нег	СБ/29	нег	нег	СБн/21	поз	поз
ЈБ/94	нег	поз	СБ/30	нег	нег	СБн/22	поз	поз
ЈБ/95	поз	поз	СБ/31	поз	поз	СБн/23	нег	поз
ЈБ/96	нег	нег	СБ/32	нег	поз	СБн/24	нег	поз
ЈБ/97	поз	поз	СБ/33	нег	нег	СБн/25	поз	поз

Наставак табеле са стране 79.

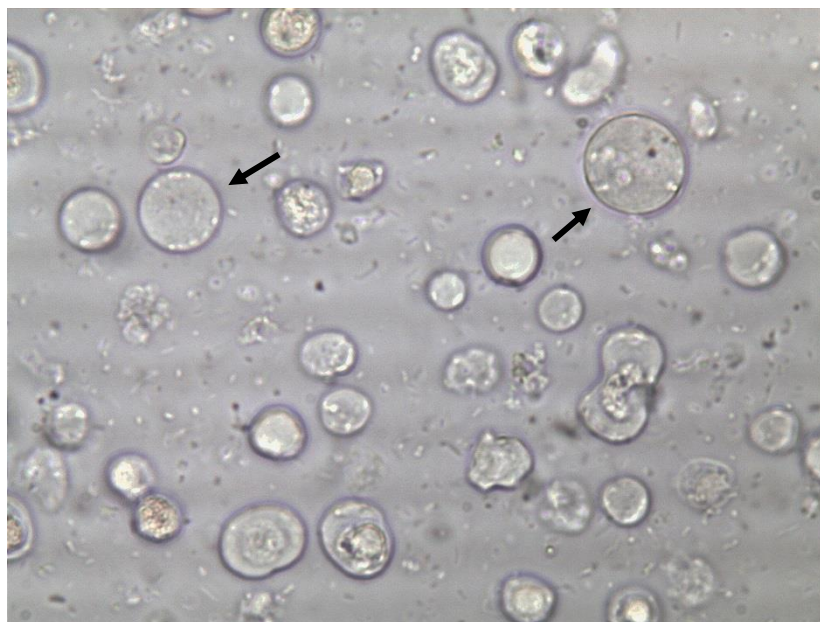
Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе	Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе	Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе
ЈБ/98	поз	поз	СБ/34	нег	поз	СБн/26	нег	поз
ЈБ/99	нег	поз	СБ/35	поз	поз	СБн/27	нег	поз
СБн/28	нег	поз	СрБн/30	нег	нег	ЈБн/36	нег	поз
СБн/29	поз	поз	СрБн/31	нег	поз	ЈБн/37	поз	поз
СБн/30	поз	поз	СрБн/32	нег	поз	ЈБн/38	нег	нег
СБн/31	поз	поз	СрБн/33	поз	поз	ЈБн/39	поз	поз
СБн/32	поз	поз	СрБн/34	поз	поз	ЈБн/40	нег	нег
СБн/33	нег	нег	СрБн/35	поз	нег	Ср/01	нег	поз
СБн/34	поз	поз	СрБн/36	нег	поз	Ср/02	поз	поз
СБн/35	нег	поз	ЈБн/01	нег	нег	Ср/03	поз	поз
СБн/36	поз	поз	ЈБн/02	поз	поз	Ср/04	поз	поз
СБн/37	нег	поз	ЈБн/03	поз	поз	Ср/05	поз	поз
СБн/38	поз	поз	ЈБн/04	нег	нег	Ср/06	нег	нег
СБн/39	нег	поз	ЈБн/05	поз	поз	Ср/07	поз	поз
СБн/40	поз	поз	ЈБн/06	поз	поз	Ср/08	нег	поз
СрБн/01	нег	поз	ЈБн/07	нег	поз	Ср/09	поз	поз
СрБн/02	нег	поз	ЈБн/08	нег	нег	Ср/10	поз	поз
СрБн/03	нег	нег	ЈБн/09	нег	нег	Ср/11	поз	поз
СрБн/04	нег	поз	ЈБн/10	нег	нег	Ср/12	нег	поз
СрБн/05	нег	нег	ЈБн/11	поз	поз	Ср/13	поз	поз
СрБн/06	нег	нег	ЈБн/12	поз	поз	Ср/14	нег	поз
СрБн/07	поз	поз	ЈБн/13	нег	нег	Ср/15	нег	поз
СрБн/08	поз	нег	ЈБн/14	поз	поз	Ср/16	нег	нег
СрБн/09	нег	поз	ЈБн/15	поз	поз	Ср/17	поз	поз
СрБн/10	поз	нег	ЈБн/16	нег	поз	Ср/18	поз	поз
СрБн/11	поз	поз	ЈБн/17	нег	нег	Ср/19	поз	поз
СрБн/12	нег	поз	ЈБн/18	поз	поз	Ср/20	нег	нег
СрБн/13	нег	поз	ЈБн/19	поз	поз	Ср/21	поз	поз
СрБн/14	нег	поз	ЈБн/20	нег	нег	Ср/22	нег	нег
СрБн/15	нег	поз	ЈБн/21	нег	нег	Ср/23	нег	поз
СрБн/16	поз	поз	ЈБн/22	поз	поз	Ср/24	нег	нег
СрБн/17	поз	нег	ЈБн/23	поз	поз	Ср/25	нег	нег
СрБн/18	поз	нег	ЈБн/24	поз	поз	Ср/26	нег	поз
СрБн/19	поз	поз	ЈБн/25	поз	поз	Ср/27	поз	поз
СрБн/20	поз	поз	ЈБн/26	нег	нег	Ср/28	нег	нег
СрБн/21	нег	поз	ЈБн/27	поз	поз	Ср/29	поз	поз
СрБн/22	нег	поз	ЈБн/28	поз	поз	Ср/30	поз	поз
СрБн/23	нег	нег	ЈБн/29	нег	нег	Ср/31	нег	нег
СрБн/24	поз	нег	ЈБн/30	поз	поз	Ср/32	поз	поз
СрБн/25	нег	поз	ЈБн/31	поз	поз	Ср/33	поз	поз
СрБн/26	нег	нег	ЈБн/32	нег	нег	Ср/34	поз	поз
СрБн/27	поз	поз	ЈБн/33	поз	поз	Ср/35	поз	поз

Наставак табеле са стране 80.

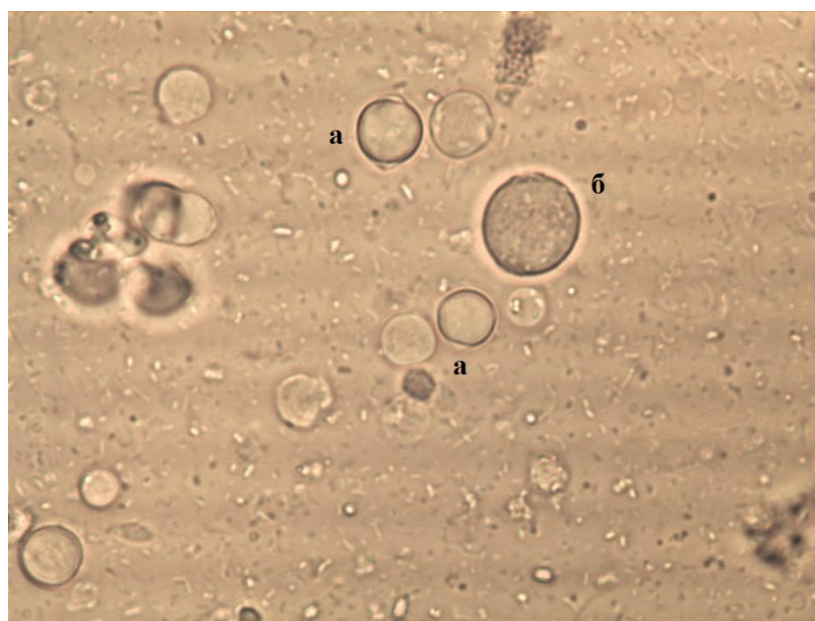
Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе	Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> културе
СрБн/28	поз	поз	СрБн/29	поз	поз
Ср/36	нег	поз	ЈБн/34	поз	поз
Ср/37	нег	поз	ЈБн/35	поз	поз
Ср/38	поз	поз	Ср/80	нег	нег
Ср/39	нег	нег	Ср/81	поз	поз
Ср/40	нег	нег	Ср/82	поз	поз
Ср/41	нег	нег	Ср/83	поз	нег
Ср/42	нег	нег	Ср/84	поз	поз
Ср/43	поз	поз	Ср/85	нег	поз
Ср/44	поз	нег	Ср/86	поз	поз
Ср/45	поз	нег	Ср/87	нег	поз
Ср/46	нег	нег	Ср/88	поз	поз
Ср/47	нег	нег	Ср/89	нег	нег
Ср/48	нег	нег	Ср/76	поз	поз
Ср/49	нег	нег	Ср/77	поз	поз
Ср/50	нег	нег	Ср/78	поз	поз
Ср/51	поз	поз	Ср/79	нег	нег
Ср/52	поз	поз	$\Sigma=403$		
Ср/53	поз	поз			
Ср/54	нег	нег			
Ср/55	нег	нег			
Ср/56	поз	поз			
Ср/57	поз	поз			
Ср/58	нег	поз			
Ср/59	нег	поз			
Ср/60	нег	поз			
Ср/61	поз	поз			
Ср/62	поз	поз			
Ср/63	нег	нег			
Ср/64	поз	поз			
Ср/65	поз	нег			
Ср/66	поз	поз			
Ср/67	поз	нег			
Ср/68	нег	поз			
Ср/69	нег	поз			
Ср/70	поз	поз			
Ср/71	поз	поз			
Ср/72	нег	нег			
Ср/73	нег	нег			
Ср/74	поз	поз			
Ср/75	нег	нег			



При микроскопирању *in vitro* култура на увељичању од 400 $\times$  јасно су биле видљиве различите морфолошке форме блатоцистиса, од којих су доминирале вакуоларна и грануларна форма. Код појединих узорака могао се уочити паразит у форми цисте, док је на већем броју препарата јасно био видљив процес бинарне деобе микроорганизама (Слика 5, 6 и 7).



Слика 5. *Blastocystis* sp. у култури (400 $\times$ ), грануларна форма (стрелица)

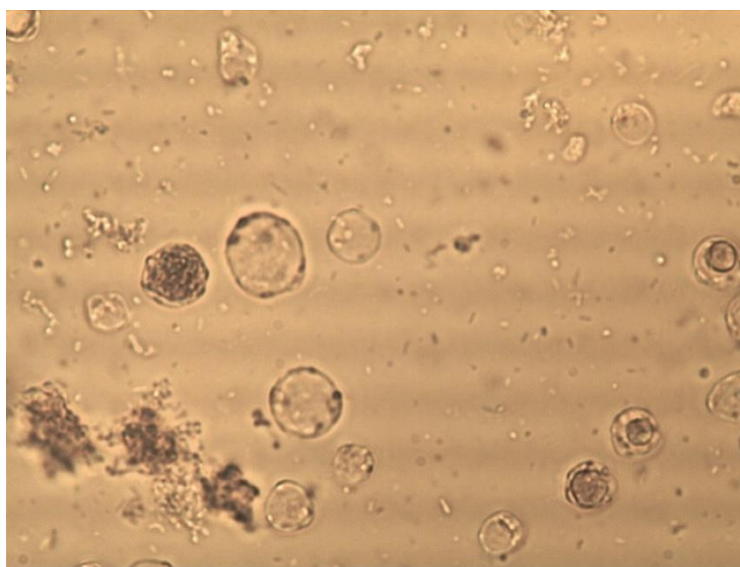


Слика 6. *Blastocystis* sp. у култури (400 $\times$ ), вакуоларна форма (а), грануларна форма (б)



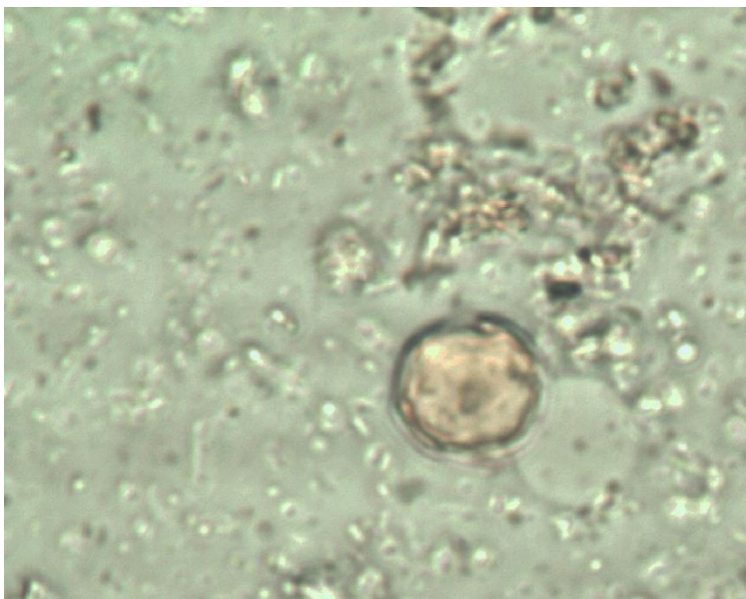
Слика 7. *Blastocystis* sp. у култури (400×), бинарна деоба ћелија

Додавањем Луголовог раствора јода лакше је било уочити структуру блатоцистиса. Наиме, на обојеним узорцима јасно су се видели поједини делови ћелије, као што су централна вакуола, цитоплазматски појас, једра и ћелијски омотач (Слика 8).



Слика 8. *Blastocystis* sp. у култури (400×), препарат обојен Луголовим раствором.

У свежем фекалном материјалу детектоване морфолошке форме су се у извесној мери разликовале од морфолошких форми у култури. Чешће су се уочавале форме цисте (*Слика 9*) и грануларне форме, док су ређи налаз представљале класичне лако препознатљиве вакуларне форме.



*Слика 9.* Циста *Blastocystis* sp. у свежем фекалном материјалу (400 ×)

## 6.2. Преваленца *Blastocystis* sp. код свиња на основу резултата различитих дијагностичких метода

Сви узорци фецеса (n=403) су подвргнути прегледу са две стандардне методе (нативни преглед и *in vitro* култивација), на основу којих се добија проценат заражених јединки односно преваленца. Од укупног броја узорака, 48 узорака је осим стандардним методама подвргнуто и молекуларној дијагностици (PCR).

Табела 12. Фреквенција и проценат резултата нативног прегледа

Нативни преглед	
Негативни (0)	Позитивни (1)
235 (58,31%)	168 (41,69%)

Из *Табеле 12* се види да преваленца бластоцистиса код свиња на основу резултата нативног прегледа износи 41,69%.

Табела 13. Фреквенција и проценат резултата *in vitro* култивације

<i>In vitro</i> култивација	
Негативни (0)	Позитивни (1)
120 (29,78%)	283 (70,22%)

Из *Табеле 13*. се види да преваленца бластоцистиса код свиња на основу резултата *in vitro* култивације износи 70,22%.

Ако се посматра само оних 48 узорака који су насумице изабрани и подвргнути молекуларној дијагностици, резултати су следећи:

- Од 48 узорака, 21 узорак је био позитиван при нативном прегледу размаза фецеса, што представља преваленцу од 43,45%,
- од 48 узорака, 38 је било позитивно при *in vitro* култивацији, што представља преваленцу од 79,16%,

- док је од истих 48 узорака, 39 било позитивно при PCR анализи, што представља преваленцу од 81,25%.

### 6.3. Присуство бластоцистиса код различитих категорија свиња

Повезаност резултата добијених применом нативног прегледа са различитим категоријама свиња испитана је користећи  $\chi^2$  тест независности  $k \times 2$  табеле контингенције (Табела 14).

Табела 14. Преваленца бластоцистиса код различитих категорија свиња на основу резултата нативног прегледа.

Категорије свиња	Резултат нативног прегледа		Укупно
	Негативни (0)	Позитивни (1)	
Прасад масе до 20 кг	79 (57.7%)	58 (42.3%)	137 (100%)
Свиње масе 20 – 49 кг	54 (56.8%)	41 (43.2%)	95 (100%)
Товне свиње масе 50 – 79 кг	37 (61.7%)	23 (38.3%)	60 (100%)
Товне свиње масе 80 – 110 кг	18 (52.9%)	16 (47.1%)	34 (100%)
Товне свиње масе преко 110 кг	8 (66.7%)	4 (33.3%)	12 (100%)
Приплодне крмаче	24 (66.7%)	12 (33.3%)	36 (100%)
Приплодне назимице	15 (51.7%)	14 (48.3%)	29 (100%)
Укупно	235 (58.31%)	168 (41.69%)	403 (100%)

Из Табеле 14 се види да на основу резултата нативног прегледа, преваленца бластоцистиса код прасади до 20 кг износи 42,3% (58/137), код свиња масе 20 – 49 кг преваленца је 43,2% (41/95), код товних свиња 50 – 79 кг износи 38,3% (23/60), код товних свиња масе 80 – 110 кг 47,1% (16/34), код товних свиња масе преко 110 кг 33,3% (4/12), код приплодних крмача износи 33,3% (12/36), док је код приплодних назимица преваленца била 48,3% (14/29). На основу  $\chi^2$  теста независности (Pearson  $\chi^2$ ) може се закључити да не постоји статистички значајна повезаност у преваленци бластоцистиса код различитих категорија свиња на основу резултата нативног прегледа,  $\chi^2(6, 403) = 2.68, p = 0.85$ .

Као и код нативног прегледа, повезаност резултата добијених применом *in vitro* култивације са различитим категоријама свиња испитана је користећи  $\chi^2$  тест независности  $k \times 2$  табеле контингенције (Табела 15).

**Табела 15.** Преваленца бластоцистисакод различитих категорија свиња на основу резултата *in vitro* култивације.

Категорије свиња	Резултат <i>in vitro</i> култивације		Укупно
	Негативни (0)	Позитивни (1)	
Прасад масе до 20 кг	32 (23.4%)	105 (76.6%)	137 (100%)
Свиње масе 20 – 49 кг	30 (31.6%)	65 (68.4%)	95 (100%)
Товне свиње масе 50 – 79 кг	20 (33.3%)	40 (66.7%)	60 (100%)
Товне свиње масе 80 – 110 кг	11 (32.4%)	23 (67.6%)	34 (100%)
Товне свиње масе преко 110 кг	2 (16.7%)	10 (83.3%)	12 (100%)
Приплодне крмаче	19 (52.8%)	17 (47.2%)	36 (100%)
Приплодне назимице	6 (20.7%)	23 (79.3%)	29 (100%)
Укупно	120 (29.78%)	283 (70.22%)	403 (100%)

Из *Табеле 15* се види да на основу резултата *in vitro* култивације, преваленца бластоцистиса код прасади до 20 кг износи 76,6% (105/137), код свиња масе 20 – 49 кг преваленца је 68,4% (65/95), код товних свиња 50 – 79 кг 66,7% (40/60), код товних свиња масе 80 – 110 кг 67,6% (23/34), код товних свиња масе преко 110 кг 83,3% (10/12), код приплодних крмача износи 47,2% (17/36), док је код приплодних назимица преваленца 79,3% (23/29). На основу  $\chi^2$  теста независности (Pearson  $\chi^2$ ) може се закључити да постоји статистички значајна повезаност у преваленци бластоцистиса код различитих категорија свиња на основу резултата *in vitro* култивације,  $\chi^2(6, 403) = 14.56, p = 0.02$ .

#### 6.4. Дистрибуција *Blastocystis* sp. по различитим регионима и окрузима у Војводини

Од 198 узорка са територије Бачке, 61 (30,8%) узорак је био позитиван при нативном микроскопском прегледу, док је 140 (70,7%) узорака било позитивно при *in vitro* култивацији. Од 116 узорака са територије Баната, 60 (51,7%) узорака је било позитивно при нативном прегледу, док је 85 (73,3%) узорака било позитивно при *in vitro* култивацији. Од 89 узорака са територије Срема, 47 (52,8%) узорака је било позитивно при нативном прегледу, док је 58 (65,2%) узорака било позитивно при *in vitro* култивацији. Повезаност резултата добијених применом нативног прегледа по регионима испитана је користећи  $\chi^2$  тест независности  $k \times 2$  табеле контингенције (Табела 16).

Табела 16. Резултати нативног прегледа по регионима.

Регион	Резултат нативног прегледа		Укупно
	Негативни (0)	Позитивни (1)	
Бачка	137 (69.2%)	61 (30.8%)	198 (100%)
Банат	56 (48.3%)	60 (51.7%)	116 (100%)
Срем	42 (47.2%)	47 (52.8%)	89 (100%)
Укупно	235 (58.31%)	168 (41.69%)	403 (100%)

$\chi^2$  тест независности (Pearson  $\chi^2$ ) показао је статистички значајну везу између резултата нативног прегледа и региона,  $\chi^2(2, 403) = 18.98, p < 0.0005$ .

Повезаност резултата добијених применом *in vitro* култивације са регионима испитана је користећи  $\chi^2$  тест независности  $k \times 2$  табеле контингенције (Табела 17).

Табела 17. Резултати *in vitro* култивације по регионима.

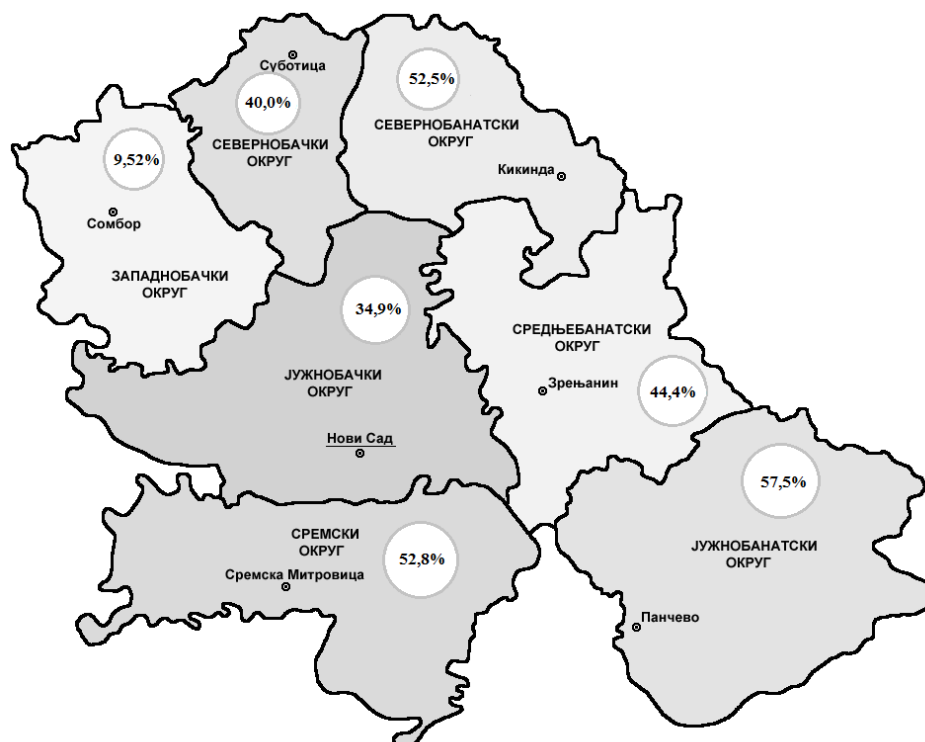
Регион	Резултат <i>in vitro</i> култивације		Укупно
	Негативни (0)	Позитивни (1)	
Бачка	58 (29.3%)	140 (70.7%)	198 (100%)
Банат	31 (26.7%)	85 (73.3%)	116 (100%)
Срем	31 (34.8%)	58 (65.2%)	89 (100%)
Укупно	120 (29.78%)	283 (70.22%)	403 (100%)

$\chi^2$  тест независности (Pearson  $\chi^2$ ) није показао је статистички значајну везу између резултата *in vitro* култивације и региона,  $\chi^2(2, 403) = 1.63, p = 0.44$ .

Резултати различитих дијагностичких поступака по окрузима су приказани у Табели 18. Преваленце *Blastocystis* sp. по окрузима су приказане на Слици 10 и 11.

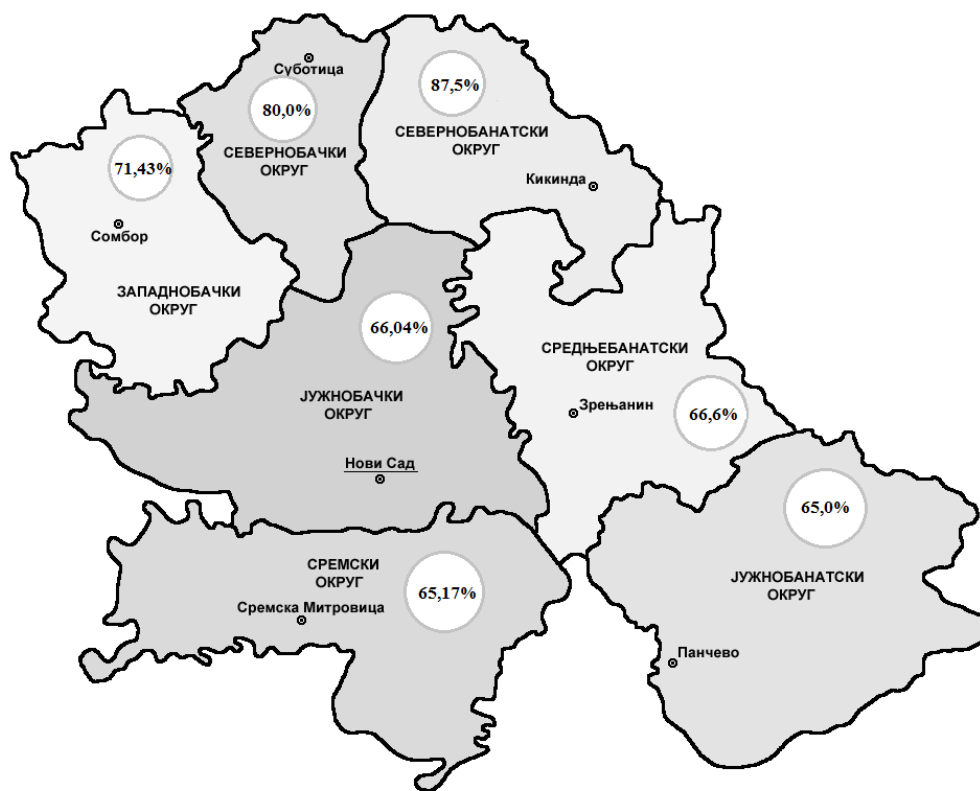
Табела 18. Резултати различитих дијагностичких поступака по окрузима у АП Војводини.

Регион	Број узорака по округу	Број позитивних узорака при нативном прегледу	Број позитивних узорака при <i>in vitro</i> култивацији
Бачка	Северно-Бачки	50	20
	Западно-Бачки	42	4
	Јужно-Бачки	106	37
Банат	Северно-Банатски	40	21
	Средње-Банатски	36	16
	Јужно-Банатски	40	23
Срем	Сремски	89	47



Слика 10. Преваленца бластоцистиса по окрузима у АП Војводини на основу резултата нативног микроскопског прегледа.





Слика 11. Преваленца бластоцистиса по окрузима у АП Војводини на основу резултата *in vitro* култивације.

### 6.5. Дистрибуција *Blastocystis* sp. по различитим фармама за узгој свиња

Повезаност резултата добијених применом нативног прегледа са различитим фармама испитана је користећи  $\chi^2$  тест независности  $k \times 2$  табеле контингенције (Табела 19).

Табела 19. Резултати нативног прегледа по фармама

Фарма	Резултат нативног прегледа		Укупно
	Негативни (0)	Позитивни (1)	
Ф1	38 (90.5%)	4 (9.5%)	42 (100%)
Ф2	35 (83.3%)	7 (16.7%)	42 (100%)
Ф3	20 (55.6%)	16 (44.4%)	36 (100%)
Ф4	30 (60%)	20 (40%)	50 (100%)
Ф5	25 (51%)	24 (49%)	49 (100%)
Ф6	17 (42.5%)	23 (57.5%)	40 (100%)
Ф7	17 (42.5%)	23 (57.5%)	40 (100%)
Ф8	27 (54%)	23 (46%)	50 (100%)
Ф9	19 (47.5%)	21 (52.5%)	40 (100%)
Ф10	7 (50%)	7 (50%)	14 (100%)
Укупно	235 (58.31%)	168 (41.69%)	403 (100%)

Из Табеле 19 се види да преваленца бластоцистиса по фармама на основу резултата нативног прегледа износи 9,5% (4/42) на фарми Ф1, 16,7% (7/42) на фарми Ф2, 44,4% (16/36) на фарми Ф3, 40% (20/50) на фарми Ф4, 49% (24/49) на фарми Ф5, 57,5% (23/40) на фарми Ф6, 57,5% (23/40) на фарми Ф7, 46% (23/50) на фарми Ф8, 52,5% (21/40) на фарми Ф9, односно 50% (7/14) на фарми Ф10. На основу  $\chi^2$  теста независности (Pearson  $\chi^2$ ) може се закључити да постоји статистички значајна повезаност у преваленци бластоцистиса и различитих фарми на основу резултата нативног прегледа,  $\chi^2(9, 403) = 40.86, p < 0.0005$ .

Повезаност резултата добијених применом *in vitro* култивације са различитим фармама испитана је користећи  $\chi^2$  тест независности  $k \times 2$  табеле контингенције (Табела 20).

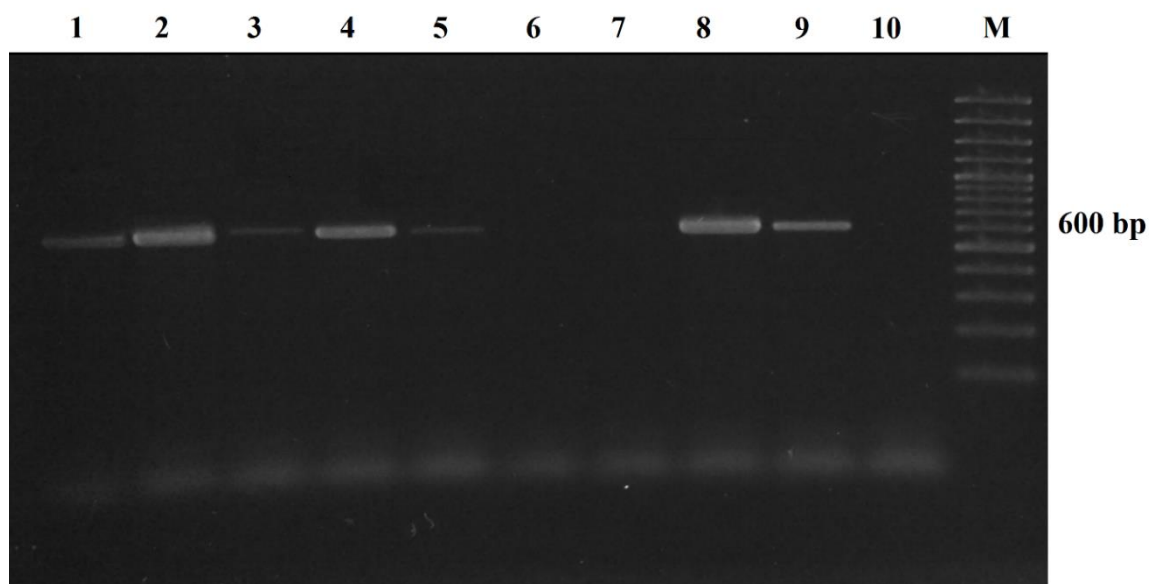
Табела 20. Резултати *in vitro* култивације по фармама.

Фарма	Резултат <i>in vitro</i> култивације		Укупно
	Негативни (0)	Позитивни (1)	
Ф1	12 (28.6%)	30 (71.4%)	42 (100%)
Ф2	15 (35.7%)	27 (64.3%)	42 (100%)
Ф3	12 (33.3%)	24 (66.7%)	36 (100%)
Ф4	10 (20%)	40 (80%)	50 (100%)
Ф5	18 (36.7%)	31 (63.3%)	49 (100%)
Ф6	13 (32.5%)	27 (67.5%)	40 (100%)
Ф7	14 (35%)	26 (65%)	40 (100%)
Ф8	17 (34%)	33 (66%)	50 (100%)
Ф9	5 (12.5%)	35 (87.5%)	40 (100%)
Ф10	4 (28.6%)	10 (71.4%)	14 (100%)
Укупно	120 (29.78%)	283 (70.22%)	403 (100%)

Из Табеле 20 се види да преваленца бластоцистиса по фармама на основу резултата *in vitro* култивације износи 71,4% (30/42) на фарми Ф1, 64,3% (27/42) на фарми Ф2, 66,7% (24/36) на фарми Ф3, 80% (40/50) на фарми Ф4, 63,3% (31/49) на фарми Ф5, 67,5% (27/40) на фарми Ф6, 65% (26/40) на фарми Ф7, 66% (33/50) на фарми Ф8, 87,5% (35/40) на фарми Ф9, односно 71,4% (10/14) на фарми Ф10. На основу  $\chi^2$  теста независности (Pearson  $\chi^2$ ) може се закључити да не постоји статистички значајна повезаност у преваленци бластоцистиса и различитих фарми на основу резултата *in vitro* култивације,  $\chi^2(9, 403) = 11.18, p = 0.26$ .

### 6.6. Резултати ланчане реакције полимеразе (PCR)

Применом ланчане реакције полимеразе (PCR) је прегледано 48 насумице изабраних узорака са свих десет фарми. Узорци су одабрани пропорционално од сваке категорије свиња. Од 48 узорака, девет је било негативно, док је преосталих 39 било недвосмислено позитивно на *Blastocystis* sp. PCR реакција је сматрана позитивном уколико је дошло до амплификације продукта величине 600 базних парова (Слика 12).



**Слика 12.** Приказ електрофоретски раздвојених PCR продуката у обојеном 2% агарозном гелу. Ампликони карактеристични за бластоцистис имају молекулску масу од 600 бп. Позитивни узорци 1-5, 8 и 9; Негативни узорци 6 и 7; Број 10 је негативна контрола (no template control (NTC), контрола са водом степена чистоће за PCR).

### 6.7. Резултати молекуларне субтипизације изолата

За 38 насумично одабраних узорака, који су били позитивни при *in vitro* култивацији, урађена је суптипизација са STS прајмерима специфичним за суптипове очекиване код свиња: ST1, ST2, ST3 и ST5. Неки од ова четири суптипа су идентификовани у укупно 25 узорака. У преосталих 13 узорака није било доказано присуство тражених суптипова. Од 25 узорака позитивних са неким од суптип специфичних прајмера у 8 узорака је био присутан само један суптип, у 10 узорака је установљена мешана инфекција са два суптипа, док је у преосталих 7 узорака дијагностикована мешана инфекција са 3 суптипа (**Табела 21.**)

**Табела 21.** Дистрибуција суптипова у узорцима фецеса

Суптип	Број узорака
ST1	7
ST2	0
ST3	0
ST5	1
ST1 + ST5	9
ST1 + ST3	1
ST1 + ST3 + ST5	5
ST1 + ST2 + ST5	2

ST1 је идентификован у 24 узорка (24/25; 96%), ST2 је идентификован у два узорка (2/25; 8%), ST3 је идентификован у шест узорака (6/25; 24%), док је ST5 био присутан у 16 узорака (16/25; 64%).

## 6.8. Упоредивање различитих дијагностичких метода у детекцији *Blastocystis* ср. код свиња

Табела 22. Упоредни приказ резултата нативног прегледа, *in vitro* култивације и молекуларне дијагностике код 48 различитих насумице одабраних узорака.

Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> култивације	Резултат молекуларне дијагностике
ЗБ/01	Нег	Нег	Нег
ЗБ/02	Нег	Нег	Поз
ЗБ/03	Поз	Поз	Поз
ЗБ/04	Нег	Поз	Поз
ЗБ/06	Нег	Поз	Поз
ЗБ/12	Поз	Поз	Нег
ЗБ/13	Нег	Поз	Нег
ЗБ/14	Нег	Поз	Поз
ЗБ/18	Нег	Поз	Поз
ЗБ/21	Нег	Поз	Поз
ЈБ/10	Нег	Поз	Поз
ЈБ/21	Поз	Поз	Поз
ЈБ/36	Нег	Поз	Поз
ЈБ/41	Поз	Поз	Поз
ЈБ/31	Нег	Нег	Нег
СрБн/04	Нег	Поз	Поз
СрБн/12	Нег	Поз	Поз
СрБн/29	Поз	Поз	Поз
СрБн/39	Поз	Поз	Поз
СрБн/23	Нег	Нег	Поз
СБ/10	Поз	Поз	Поз
СБ/21	Поз	Поз	Поз
СБ/35	Поз	Поз	Поз
СБ/47	Нег	Нег	Поз
СБ/33	Нег	Нег	Поз
ЈБ/49	Поз	Поз	Поз
ЈБ/60	Поз	Поз	Поз
ЈБ/70	Поз	Поз	Поз
Ср/63	Нег	Нег	Поз
ЈБн/05	Поз	Поз	Нег
ЈБн/15	Поз	Поз	Нег
ЈБн/22	Поз	Поз	Поз
ЈБн/36	Нег	Поз	Поз
ЈБ/87	Поз	Поз	Поз
ЈБ/85	Нег	Нег	Поз
Ср/04	Поз	Поз	Поз
Ср/21	Поз	Поз	Поз
Ср/26	Нег	Поз	Поз
Ср/33	Поз	Поз	Поз
Ср/47	Нег	Нег	Нег
СБн/12	Нег	Поз	Поз
СБн/18	Нег	Поз	Нег
СБн/20	Поз	Поз	Поз
СБн/39	Нег	Поз	Поз

Наставак табеле са стране 95.

Ознака узорка	Резултат нативног прегледа	Резултат <i>in vitro</i> култивације	Резултат молекуларне дијагностике
СБн/08	Нег	Нег	Нег
Ср/69	Нег	Поз	Поз
Ср/76	Поз	Поз	Поз
Ср/87	Нег	Поз	Поз

Осетљивост различитих дијагностичких поступака испитана је применом епидемиолошког калкулатора *Epitools* (AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease, <http://epitools.ausvet.com.au>). Примењен је 95%-ни ниво поузданости, а резултати су приказани у процентима.

**Табела 23.** 2×2 табела позитивних и негативних резултата на *Blastocystis* sp. применом два дијагностичка поступка: PCR и нативни преглед.

Нативни преглед	PCR	
	Позитивни	Негативни
Позитивни	18	3
Негативни	21	6

Осетљивост нативног прегледа у поређењу са PCR методом, као златним стандардом, износи 46,15%.

**Табела 24.** 2×2 табела позитивних и негативних резултата на *Blastocystis* sp. применом два дијагностичка поступка: PCR и *in vitro* култивација.

<i>In vitro</i> култивација	PCR	
	Позитивни	Негативни
Позитивни	33	5
Негативни	6	4

Осетљивост *in vitro* култивације у поређењу са PCR методом, као златним стандардом, износи 84,62%.

**Табела 25.** 2×2 табела позитивних и негативних резултата на *Blastocystis* sp. применом два дијагностичка поступка: нативни преглед и PCR.

PCR	Нативни преглед	
	Позитивни	Негативни
Позитивни	18	21
Негативни	3	6

Осетљивост PCR методе у поређењу са нативним прегледом, као златним стандардом, износи 85,71%.

**Табела 26.** 2×2 табела позитивних и негативних резултата на *Blastocystis* sp. применом два дијагностичка поступка: нативни преглед и *in vitro* култивација.

<i>In vitro</i> култивација	Нативни преглед	
	Позитивни	Негативни
Позитивни	21	17
Негативни	0	10

Осетљивост *in vitro* култивације у поређењу са нативним прегледом, као златним стандардом, износи 100%.

**Табела 27.** 2×2 табела позитивних и негативних резултата на *Blastocystis* sp. применом два дијагностичка поступка: *in vitro* култивација и PCR.

PCR	<i>In vitro</i> култивација	
	Позитивни	Негативни
Позитивни	33	6
Негативни	5	4

Осетљивост PCR методе у поређењу са *in vitro* култивацијом, као златним стандардом, износи 86,84%.

**Табела 28.** 2×2 табела позитивних и негативних резултата на *Blastocystis* sp. применом два дијагностичка поступка: *in vitro* култивација и нативни преглед.

Нативни преглед	<i>In vitro</i> култивација	
	Позитивни	Негативни
Позитивни	21	0
Негативни	17	10

Осетљивост нативног прегледа у поређењу са *in vitro* култивацијом, као златним стандардом, износи 55,26%.



## 7. ДИСКУСИЈА

*Blastocystis* је паразитска протозоа гастро-интестиналног тракта људи и мноштва животиња (Stenzel и Boreham, 1996; Tan, 2004). *Blastocystis* је први пут описан почетком 20. века (Alexeieff, 1911; Brumpt, 1912), али је тек почетак 21. века донео значајнији помак у разумевању овог једноћелијског организма. Међутим, особености паразита су у значајној мери отежале лабораторијску дијагностику и успорили напоре у разумевању биологије овог паразита.

Иако је *Blastocystis* први пут описан пре више од 100 година, и поред напора бројних истраживача још увек постоје бројне непознанице око овог микроорганизама. Најважнија питања која и дан данас изазивају расправе научне јавности, која се бави овим паразитом, јесу да ли *Blastocystis* узрокује обољења људи и која је улога животиња, односно контакта човек-животиња у епидемиологији хумане бластоцистозе.

*Blastocystis* се може изоловати из пацијената са гастро-интестиналним поремећајима (дијареја, мучнина, абдоминални болови, надутост, повраћање), односно екстра-интестиналним симптомима, као што су артритис, уртикарије и ангиоедем. Међутим, не постоји опште прихваћени консензус о патогености ове протозое (Stensvold и Clark, 2016). Асимптоматске инфекције код људи се доказују са скоро идентичном преваленцом као и код симптоматских инфекција, што оставља отворено питање о патогеном значају бластоцистиса. Све већи број епидемиолошких истраживања, *in-vivo* и *in-vitro* експеримента као закључак има јасну патогену природу бластоцистиса. *Blastocystis* се у литератури најчешће доводи у везу са клиничком манифестацијом синдрома иритабилног колона (ИБС) (Poirier и сар., 2012).

*Blastocystis* је осим код људи изолован из мноштва животиња. Осим дивљих и зоолошких животиња, домаће животиње као што су свиње, живина, преживари и коњи, такође представљају домаћине овог паразита (Alfellani и сар., 2013). *Blastocystis* представља све учесталији налаз у паразитолошким истраживањима широм света. То може бити резултат пораста инциденце бластоцистозе али и

последица побољшања дијагностичких процедура. Међутим, ако се узму у обзир глобализација, интензитет светске трговине, доступности путовања и тренд раста популације људи и животиња, односно подаци о епидемиологији бластоцистиса, бластоцистозу можемо сматрати свеприсутном зоонозом (Vassalos и сар., 2008). Ипак, за недвосмислен закључак о зооноском потенцијалу бластоцистиса неопходна је карактеризација овог паразита на молекуларном нивоу.

Највећу препреку у разумевању биологије бластоцистиса представља одсуство стандардизованих метода лабораторијске дијагностике. Као и код већине микроорганизама, за доказивање бластоцистиса постоје директне и индиректне дијагностичке методе (Verweij и Stensvold, 2014).

Традиционална дијагностичка метода и примарни избор у дијагностици бластоцистиса широм света је микроскопски преглед фекалног материјала. Ипак, ова метода дијагностике има значајна ограничења у клиничким паразитолошким лабораторијама, клиничким и епидемиолошким студијама. Пре свега микроскопија показује ниску осетљивост у детекцији бластоцистиса (Stensvold и сар., 2007а; Roberts и сар., 2011). Такође, не постоји консензус о значају броја или присуству различитих морфолошких форми. Поједини суптипови могу у великој мери варирати по свом клиничком значају, а микроскопија не може разликовати генетски различите варијетете.

Микроскопски преглед свежег фекалног материјала у нативној форми захтева изузетну обученост лабораторијског особља и може представљати изазов и за најiskusније паразитологе. Мали број паразита некарактеристичне морфологије може веома лако довести до превида приликом микроскопирања. Фекални материјал се може подвргнути микроскопском прегледу и након примене различитих техника концентрације и метода бојења препарата. Међутим, ни овако обрађени узорци не утичу сигнификантно на пораст осетљивости микроскопије као дијагностичке методе у доказивању бластоцистиса. Треба имати у виду и одсуство консензуса по питању различитих морфолошких облика. Не постоје тачне одреднице за идентификацију различитих морфолошких форми паразита, а постоји

и могућност да су неке од ових форми вештачке творевине настале као последица разних фактора унутрашње или спољне средине (Stensvold, 2015). Преглед трајно обојених препарата фекалног размаза такође изискује извесне вештине и рутину. Бојење трихромом је рутинска техника која се користи у многим паразитолошким лабораторијама. У дијагностици интестиналних протозоа трихром техника бојења трајних препарата је сензитивнија од бојења свежих фекалних размаза, што је случај и са бластоцистисом (Özçakır и сар., 2007; Termmathurapoj и сар. 2004).

Ксенична *in vitro* култура (XIVC) је метода култивације уз присуство неидентификоване бактеријске флоре. Култивација бластоцистиса могућа је у великом броју ксеничних култура (Clark и Diamond, 2002; Leelayoova и сар., 2002). Једноставни састав и економичност су само неки од разлога због којих је Jones-ов медијум популаран у детекцији и одржавању културе бластоцистиса. У поређењу са real-time PCR протоколима, култивација у Jones-овом медијуму има осетљивост између 52% и 79% (Poirier и сар., 2011; Stensvold и сар., 2012).

Бројни фактори потенцијално утичу на осетљивост културе као дијагностичког метода. Међу ове факторе се убрајају време протекло од узорковања до култивације, врста медијума за култивацију, односно да ли у медијуму долази до ексцистације и подједнаке амплификације различитих субтипова. У принципу све подлоге које су развијене за култивацију *Entamoeba* spp., су погодне за изолацију и култивацију бластоцистиса, па тако и Jones-ов медијум. Ова предност се може претворити у потешкоћу у случају када желимо изоловати само један од ова два микроорганизма. Тада, се раст *Entamoeba* spp. подстиче додавањем пиринчаног скроба, који није неопходан за раст бластоцистиса. Поједини еукариотски микроорганизми, разне цилиате или флагелате, односно гљивице могу бити присутни у Jones-ов медијум на самом почетку култивације, нарочито ако је фекални материјал животињског порекла, и на тај начин отежати дијагностиковање бластоцистиса. Према Clark и Stensvold (2016) након неколико пасажа из културе се губе ови микроорганизми. Такође, аутори у случају негативног налаза при *in vitro* култивацији, препоручују додатну пасажу, пре него што се узорак коначно прогласи негативним. Са друге стране,

дуготрајна култивација може фаворизовати одређени суптип ако се ради о мешаној инфекцији, међутим искуства по том питању су ограничена (Parkar и сар., 2007).

Употреби култивације као дијагностичке методе у прилог иде и то, што се вакуоларна морфолошка форма која је доминантна у *in vitro* условима тешко може погрешно класификовати (Zhang и сар., 2012б). Приликом *in vitro* култивације атипичне форме које се често могу помешати са другим паразитима прелазе у лако препознатљиве вакуоларне форме (Zhang и сар., 2007).

Генетска разноликост бластоцистиса (Alfellani и сар., 2013с; Parkar и сар., 2007; Clark, 1997) усмерила је истраживаче као развоју великог броја метода за идентификацију подтипова овог микроорганизма. Две методе су нарочито заступљене. Прва је PCR протокол који користи STS прајмере (sequence-tagged-site). (Yoshikawa и сар., 2004б). Протокол подразумева примену седам PCR реакција, по једну за сваки суптип од 1 до 7. Свака реакција амплификује одређени субтип, што омогућава идентификацију без секвенцирања. Други метод подразумева анализу варијација SSU rDNA гена. Неколико истраживачких група је развијало ову методу, користећи различите регионе SSU rRNA гена као маркере (Stensvold и сар., 2007а; Stensvold и сар., 2006; Stensvold и сар., 2010; Özyurt и сар., 2008; Stensvold и сар., 2009б; Parkar и сар., 2007; Parkar и сар., 2010; Santín и сар., 2011; Wong и сар., 2008). Такозвани „barcoding“ протокол (Scicluna и сар., 2006) је један од примера, који амплификују 600 базних парова SSU rRNA гена. „Barcoding“ омогућава детекцију других суптипова осим ST1-7 и представља валидовани маркер генетске разноликости бластоцистиса (Parkar и сар., 2007). Међутим, „barcoding“ у односу на STS методу подразумева и секвенцирање, односно носи и одређене потешкоће при дијагностиковању мешаних инфекција (Stensvold, 2013б).

И поред све приступачнијих метода молекуларне дијагностике, овај вид дијагностиковања бластоцистозе је још увек релативно скуп и захтеван по питању уложеног рада. Развој једноставних, јефтиних метода које лако диференцирају различите суптипове и омогућавају обраду великог броја узорака је од кључног значаја за будућност истраживања бластоцистозе (Stensvold, 2015).

Већи је број студија које су се бавиле компарацијом перформанси различитих метода дијагностике бластоцистиса. Stensvold и сарадници (2007a) у свом раду упоређују различите дијагностичке методе и закључују да је PCR приступ супериоран у односу на све остале технике, са сензитивношћу сличном култури. Termmathuraroј и сарадници (2004) пак указују на боље дијагностичке перформансе *in vitro* култивације у односу на PCR директно из узорака столице. Parkar и сарадници (2007) су уз помоћ PCR-а директно из узорака столице доказали преваленцу од 35%, у односу на свега 19% позитивних узорака културе. Parkar и сарадници су користили Jones-ов медијум за култивацију фецеса различитих животиња, а тај медијум не подржава раст апсолутно свих варијетета, што може бити једно од објашњења за овакве разлике у резултатима. Разлог за разлику може бити и ефикаснија екстракција ДНК од стране Parkar-а и сарадника. Различита специфичност PCR прајмера, који су коришћени у овим студијама, се такође не сме занемарити (Stensvold и сар., 2007a). Stensvold и сарадници (2006) указују на супериорност PCR-а у односу на FECT. Међутим у неколико случајева узорци негативни у култури су били PCR позитивни. Аутори овакав резултат објашњавају могућом деградацијом паразита у столицу или малим бројем паразита што је онемогућило *in vitro* раст. Такође, паразити могу бити толико ретки и неупадљиви да се просто превиде приликом микроскопирања узорка културе. Објашњење за случајеве када су узорци позитивни у култури а негативни применом неке од молекуларних техника може лежати се у недовољној или непотпуној екстракцији ДНК из узорака столице. Yoshikawa и сарадници (2011) су испитали ефикасност пет различитих комерцијалних китова за екстракцију ДНК. Два кита су искључена већ при прелиминарном тестирању, пошто нису успела да детектују позитивне контроле. Преостала три кита су употребљена на по 50 клиничких узорака позитивних у култури. Процент PCR позитивних узорака је износио 10%, 48%, односно 94%. Резултати говоре о неефикасности појединих китова да у потпуности уклоне инхибиторе PCR амплификације и екстрахују довољне количине ДНК из фецеса. Seuer и сар. (2016) су упоредили два начина припреме узорака за PCR анализу. Аутори су упоредили традиционално замрзавање узорака фецеса на  $-20^{\circ}\text{C}$  пре екстракције ДНК и „DSSF“ методу, у којој се фецес меша са физиолошким

раствором, наноси на филтер папир, након сушења се струже и подвргава екстракцији ДНК. Методе су упоређене са микроскопијом као златним стандардом. Традиционална метода је имала сензитивност од 86,4%, док је сензитивност „DSSFP“ методе износила 95,5%.

Према нашим сазнањима перформансе дијагностичких процедура су углавном испитиване на хуманим фекалним узорцима и не постоје подаци о различитим дијагностичким техникама када су свиње предмет истраживања. Један од предуслова одређивања што тачније преваленце бластоцистиса код свиња, односно доношења недвосмислених закључака о улози свиња као резервоара овог паразита, јесте упоређивање различитих метода дијагностике за дијагнозу бластоцистиса у фекалном материјалу свиња. У нашем истраживању упоредили смо три различите методе дијагностике, широко примењивану микроскопију нативних размаза фецеса, култивацију у хранљивој подлози и молекуларну технику PCR применом RD5 и BhRDг прајмера.

Од укупног броја од 403 узорка насумице смо одабрали 48 које смо подвргли екстракцији ДНК. Од тих 48 узорака, 21 узорак је био позитиван на претходном прегледу нативног препарата микроскопирањем. На нативним препаратима најчешћи налаз су биле грануларна и цистична форма паразита, док је вакуоларна форма била присутна у мањем броју препарата. Амебоидне форме нису уочене при нативном прегледу. У ограниченом броју препарата осим бластоцистиса уочени су и паразити *Giardia sp.*, *Balantidium coli* и *Eimeria sp.* Од 48 узорка, 38 је било позитивно на претходној *in-vitro* култивацији у Jones-овом медијуму. Најчешће форме у култури су биле вакуоларна и грануларна. Након бојења јодом, јасно смо разликовали ћелијске структуре попут централне вакуоле, једара, цитоплазматског појаса и површинског омотача. Од 48 узорака, 39 узорака се могло сматрати позитивним након спровођења PCR реакција.

Подударане резултата три дијагностичке методе било је присутно у 22 случаја, док је у свим осталим случајевима постојала нека неусклађеност. Приликом упоређивања резултата нативног микроскопског прегледа и молекуларне

дијагностике, неподударности су уочене у 24 случаја, са негативним нативним прегледом и позитивним PCR-ом, и обрнуто. Неподударност је регистрована у 11 случајева када смо култивацију упоређивали са PCR-ом.

Наше истраживање је показало ниску осетљивост нативног прегледа у односу на PCR. У поређењу са PCR-ом, израчуната осетљивост нативног прегледа је износила 46,15%. Нативни преглед има нешто вишу осетљивост ако га поредимо са култивацијом, међутим са 55,26% она је још увек ниска. Резултати нашег истраживања потврђују податке о несензитивности нативног прегледа хуманих фекалних узорака и указују на потребу за узимањем у обзир и других дијагностичких процедура пре постављања коначне дијагнозе. Када су у питању хумани фекални узорци, култивација у Jones-овом медијуму показује осетљивост од 52% до 79% у поређењу са *real-time* PCR протоколима (Poirier и сар., 2011; Stensvold и сар., 2012). Када смо упоредили култивацију и конвенционалну PCR технику која амплификује ДНК екстраховану директно из фецеса свиња, сензитивност *in vitro* култивације је износила 84,62%. Док је сензитивност *in vitro* култивације 100% у односу на нативни преглед.

Као што је претходно наведено, резултати све три дијагностичке технике су се подударали код 22 узорка, док је у осталим случајевима постајала једна или више неподударности. Најчешћа неподударност (код 15 узорака) је био негативан резултат нативног прегледа и позитивни резултати *in vitro* култивације, односно молекуларне дијагностике. Овакав резултат није изненађујући, ако узмемо у обзир да микроскопирање свежих размаза фекалног материјала изискује извесне вештине и искуство. Ћелије бластоцистиса у нативним препаратима могу бити тако ретке и тешко уочљиве, да се једноставно могу превидети и од стране најискуснијих лабораторијских радника. Надаље, морфолошке форме које се могу недвосмислено идентификовати, као што је вакуоларна, нису увек доминантна форма у свежем фекалном материјалу. Остали фактори, који могу допринети ниској сензитивности нативног прегледа су неправилно излучивање бластоцистиса из организма, односно време протекло од узорковања до самог прегледа. Шест узорака је било негативно при нативном прегледу и *in vitro* култивацији, док су били позитивни при

молекуларној дијагностици. Могуће објашњење за овакав резултат, јесте да су узорци фецеса садржавали мали број ћелија бластоцистиса, које нису уочене приликом микроскопирања, односно узорци нису садржавали живе ћелије које би се умножавала приликом култивације. Три узорка су била позитивна при нативном прегледу и *in vitro* култивацији, али негативна на молекуларној дијагностици. Могуће објашњење за овакву појаву јесте неефикасна екстракција ДНК из фецеса. Два случаја у којим смо имали позитиван налаз при култивацији а негативни нативни препарат и PCR се могу приписати малом броју ћелија и недовољној екстракцији ДНК из фецеса. Осим ефикасне екстракције ДНК, одабир адекватних прајмера представља кључни моменат, који осигурава ефикасну молекуларну дијагнозу. За недвосмислену дијагнозу неопходно је утврђивање суптипа помоћу STS прајмера, односно секвенцирање.

*Blastocystis* је чест налаз код свиња са различитим географских подручја са највећим степеном колонизације од 100% (Табела 29.). Разлике у резултатима појединих аутора могу бити последица различитог броја узорака, дијагностичких процедура и географских варијација. У својим истраживањима аутори су примењивали различите дијагностичке поступке и објављивали различите податке о преваленци бластоцистиса код свиња. Ако се узму у обзир подаци из литературе и резултати нашег истраживања, подаци о преваленци бластоцистиса код свиња морају се тумачити са извесним опрезом, нарочито ако је на ограниченом броју узорака примењен само један дијагностички приступ.



Табела 29. Преваленца *Blastocystis* инфекција свиња у Свету.

Држава/Регион	Бр. испитиваних узорка	Преваленца (%)	Суптипови	Дијагностички поступци	Референца
Уједињено Краљевство	60	60.0%	Непознато	Микроскопија <i>In vitro</i> култивација	Burden и сар., 1978/1979
Чехословачка (Јужна Бохемија)	576	68-93%	Непознато	Микроскопија <i>In vitro</i> култивација	Rakandl, 1991, 1992
Шпанија (Aragon)	360	7.5%	Непознато	FECT Микроскопија	Quilez и сар., 1995
Јапан (Osaka)	61	95.0%	Непознато	Микроскопија	Abe и сар. 2002
Тајланд (Chonburi)	26	76.9%	ST3	PCR	Thathaisong и сар. 2003
Јапан (Osaka)	34	44.1%	ST1, ST3, ST6	PCR	Yoshikawa и сар. 2004с
Филипини (Lipa)	12	100.0%	Непознато	PCR	Rivera и Tan 2005
НР Кина (Jiangxi)	16	100.0%	ST5	PCR	Yan и сар., 2007
Шпанија (Valencia)	395	46.8%	ST1, ST5	Микроскопија PCR	Navarro и сар., 2008
САД	7	100.0%	ST5	PCR	Santin и сар. 2011
Уједињено Краљевство	7	58.6%	ST5	PCR	Alfellani и сар. 2013ц
Вијетнам	12	100.0%	ST5	PCR	Alfellani и сар. 2013ц
Аустралија (Queensland)	233	70.4%	ST1, ST3, ST5	PCR	Wang и сар. 2014а
Аустралија (Queensland)	240	76.7%	ST1, ST2, ST3, ST5	PCR	Wang и сар. 2014б
Камбоџа	73	45.2%	ST5	PCR	Wang и сар. 2014б
Индонезија (Winyaru)	93	87.1%	ST1, ST2, ST5, ST7	Микроскопија PCR	Yoshikawa и сар. 2016
НР Кина (Shaanxi)	560	74.8%	ST1, ST3, ST5, ST10	PCR	Song и сар. 2017

Burden и сарадници (1978/1979) су пријавили преваленцу бластоцистиса од 60% код свиња. Rakandl (1991) је култивацијом утврдио присуство бластоцистиса код свиња различитих категорија са преваленцом од 68-93%. Quilez и сарадници (1995) су сакупили укупно 360 узорака фецеса од свиња, са и без ентеричних симптома, са 17 фарми са северо-истока Шпаније. Узорке су подвргли концентрацији (FECT) и посматрали у форми директних или обојених препарата.

Доказали су преваленцу од 7,5%. Између резултата о преваленци Quilez-а и сарадника и резултата других аутора постоји сигнификантна разлика. Објашњење за овакву ситуацију може бити доказана несензитивност ФЕСТ методе примењене од стране Quilez-а и сарадника. Истраживања о преваленци бластоцистиса код свиња, која се ослањају искључиво на микроскопирање фекалних узорака (нативних или концентрованих) највероватније потцењују праву преваленцу овог паразита. У нашем истраживању ксенична *in vitro* култивација је показала релативно високу сензитивност у поређењу са молекуларном дијагностиком и апсолутну сензитивност у поређењу са нативним прегледом. Краткотрајна култивација од 48-72 сата у Jones-овом медијуму је јефтина и једноставна метода чија је примена оправдана како у рутинској дијагностици, тако и у епидемиолошким истраживањима.

Прво свеобухватно епидемиолошко истраживање о преваленци и генотиповима бластоцистиса код свиња спровели су Navarro и сарадници 2008. године. Аутори су сакупили 395 индивидуалних узорка фецеса од свиња са 11 фарми. Узорци фецеса су посматрани под светлосним микроскопом након концентрације. ДНК је изолована директно из фецеса, а у PCR протоколу за примењени су прајмери које су дизајнирали Böhm-Gloning и сарадници (1997). Микроскопским прегледом *Blastocystis* sp. уочен је у 163 узорка, што је индиковало преваленцу од 41,3%. PCR анализа је доказала преваленцу од 44,6%. *Blastocystis* је пронађен на свакој узоркованој фарми, и код свих категорија свиња. Navarro и сарадници (2008) су узели у разматрање факторе ризика, за које су претпоставили су повезани са бластоцистозом свиња. Најзначајнијом променљивом се показао узраст животиња. Знатно већем ризику у односу на остале категорије, били су изложени товљеници узраста 2-4 месеца и залучена прасад узраста до 2 месеца. Недовољно развијен имунолошки систем може бити разлог веће стопе инфицираности залучене прасади, док се већа преваленца паразита код товљеника може приписати већој густини насељености ових животиња која промовише међусобну трансмисију, односно чињеници да је већина узоркованих животиња у једном запату товљеника водила порекло са више различитих фарми. Разлика је постојала још и код фактора датума узорковања. Узорци сакупљени у топлотом

периоду године (април, мај и јун) су показивали већи степен инфицираности у односу на узорке сакупљене у хладном периоду године (децембар, фебруар и март).

У нашем истраживању смо у периоду од августа до новембра 2016. сакупили укупно 403 индивидуална узорка фецеса свиња. Узорковање је извршено на укупно 10 фарми, од којих је пет фарми било на територији Бачке, две фарме су биле на територији Срема и три фарме са територије Баната. На девет фарми су биле присутне све категорије свиња, од приплодних до товних животиња, док је на једној фарми био организован искључиво тов свиња. Узорци су били распоређени пропорционално броју свиња одређене категорије. Узорковано је укупно 137 узорака фецеса прасади до 20 кг, 95 узорака фецеса од свиња масе 20-49 кг, 60 узорака фецеса товљеника масе 50-79 кг, 34 узорка фецеса од товљеника масе 80-110 кг, 12 узорака фецеса товљеника масе преко 110 кг, 29 узорака фецеса од приплодних назимица и 36 узорака фецеса од приплодних крмача. Приплодни нерастови су искључени из истраживања због техничких разлога, односно малог броја у укупној популацији. Сви узорци су подвргнути нативном прегледу и *in vitro* култивацији, док је молекуларној дијагностици подвргнуто укупно 48 узорака.

У нашем истраживању установили смо преваленцу бластоцистиса код свиња на основу резултата нативног прегледа од 41,69%, док је преваленца бластоцистиса на основу резултата *in vitro* култивације износила 70,22%. Ако се узме несензитивност нативног прегледа, коју смо доказали приликом упоређивања различитих дијагностичких процедура, закључак о реалној преваленци бластоцистиса можемо донети на основу резултата *in vitro* култивације. Ако се посматра само оних 48 узорака који су насумице изабрани и подвргнути молекуларној дијагностици, резултати су веома слични. Од 48 узорака, 21 узорак је био позитиван при нативном прегледу размаза фецеса, што представља преваленцу од 43,45%, 38 узорака је било позитивно при *in vitro* култивацији, што представља преваленцу од 79,16%, док је 39 узорака било позитивно при PCR анализи, што представља преваленцу од 81,25%. Наши резултати су у сагласности са резултатима аутора, који су испитивали присуство бластоцистиса код свиња у интензивном узгоју. Navarro и сарадници (2008) пријављују преваленцу од 41,3%

на основу резултата микроскопије концентрованих узорака. Song и сар. (2017) су сакупили 560 узорака фецеса свиња са различитих географских локација на територији Shaanxi провинције (НР Кина). 419 узорака је било позитивно на *Blastocystis* PCR методом, што износи преваленцу од 74,8%. Wang и сарадници (2014b) су PCR методом испитали 240 узорака фецеса и пријавили преваленцу од 76,7% код свиња из интензивног узгоја у Аустралији.

Повезаност резултата добијених применом нативног прегледа и *in vitro* култивације са различитим категоријама свиња, регионима и фармама испитана је користећи  $\chi^2$  тест независности. На основу  $\chi^2$  теста независности (Pearson  $\chi^2$ ) закључили смо да не постоји статистички значајна повезаност у преваленци бластоцистиса код различитих категорија свиња на основу резултата нативног прегледа. Ако се посматрају резултати *in vitro* култивације повезаност преваленце код различитих категорија свиња је статистички значајна. Ако се узме у обзир несензитивност нативног прегледа у односу на култивацију, реално је претпоставити да ипак постоји статистичка веза између различитих категорија и преваленце. На основу резултата *in vitro* култивације преваленца бластоцистиса код свих категорија свиња се кретала између 66,7% и 83,3%, осим код приплодних крмача, где је преваленца износила 47,2%. Највероватније објашњење за овакав резултат јесте начин држања приплодних крмача од којих смо узорковали фецес. Наиме, све крмаче су биле смештене у посебним боксовима или укљештењима што је њихов контакт са осталим животињама свело на минимум. Све остале категорије свиња, почев од прасади масе до 20 кг до товљеника масе преко 110 кг, односно назимица су држане групно. Такав начин држања, односно међусобни контакти већег броја животиња највероватније помажу ширење бластоцистиса унутар запата или одређене групе животиња, што последично доводи до већег процента инфицираности.

$\chi^2$  тест независности (Pearson  $\chi^2$ ) показао је статистички значајну везу између резултата нативног прегледа и региона, док у случају *in vitro* култивације та веза није била статистички значајна. Оваква разлика у повезаности се такође може приписати разлици у сензитивности ове две дијагностичке методе. Релевантним се

могу сматрати резултати *in vitro* култивације, на основу којих је преваленца бластоцистиса код свиња са територије Бачке 70,7%, са територије Баната 73,3%, односно са територије Срема 65,2%. Када се посматра повезаност резултата две наведене дијагностичке методе и преваленце на различитим фармама, долази се до истог закључка као у случају региона. Велике разлике у преваленци на основу нативног прегледа од 9,5% (Фарма 1) до 57,5% (Фарме 6 и 7) могу се приписати несензитивности микроскопирања, на коју утичу бројни фактори као што су нејасно дефинисана морфологија паразита у препаратима, искуство или неискуство оператера, време од узорковања до прегледа итд. Култивација и микроскопски преглед култура бластоцистиса представљају заиста једноставан и сензитиван метод са високом специфичношћу. Резултати *in vitro* култивације по фармама су уједначени, крећу се у распону од 63,3% до 87,5%. Култивација је мање зависна од субјективних фактора што иде у прилог њеној применљивост у клиничкој и епидемиолошкој дијагностици бластоцистиса.

У претходној деценији спроведен је велики број истраживања у којима су биле укључене разне животињске врсте, здрави и симптоматски припадници хумане популације. Расветљени су аспекти животног циклуса, молекуларне епидемиологије, дисеминације паразита, резервоара, начина инфекције и клиничког значаја. Мало је директних доказа о клиничком значају појединих субтипова, али је патогени потенцијал доказан у *in vivo* и *in vitro* студијама. Ајјампур и сар. (2016) су експериментално доказали разлику у патогености појединих изолата унутар истог субтипа. Један од два упоређена изолата је показао сигнификантно већу способност за колонизацију, последично значајније излучивање и способност оштећења ткива. Поједини суптипови се могу повезати са настанком синдрома иритабилног колона (Azizian и сар. 2016, Das и сар. 2016).

Молекуларна детерминација представља једини валидан начин расветљавања зоонотске природе овог микроорганизма. Као и код осталих одлика бластоцистиса, контраверзе око зоонотског потенцијала су бројне. Ако се узме у обзир ко-инфекција са истим суптиповима бластоцистиса код животиња и људи, који су у

контакту са тим животињама (Wang и сар. 2014b), истраживање инфицираности животиња може бити значајно у контроли овог убиквитарног микроорганизма.

Већина аутора пријављује суптипове 3 и 1 као најчесталије код људи. El Safadi и сар. (2016) су спровели свеобухватно испитивање, у које је било укључено 788 из укупно 11 здравствених установа широм Француске. Аутори су испитивали дистрибуцију суптипова *Blastocystis* sp. и факторе ризика настанка инфекције. Укупна преваленца бластоцистиса на основу резултат квантитативне PCR методе износила је 18,1%. Од 141 типизираних изолата, ST3 је био преобладајући (43,3%), затим ST1 и ST4 (20%), ST2 (12,8%), ST6 и ST7 (2,1%). Ben Abda и сар. (2017) су у циљу доказивања преваленце и идентификације суптипова испитивању подвргли припаднике здраве популације са подручја Туниса, главног града истоимене државе. Суптип ST3 је био најдоминантнији (51%), затим ST1 (30%), ST2 (16%), док су суптипови ST4 и ST7 били подједнако заступљени (1,6%). Суптип ST3 је такође био најзаступљенији (65,5%) у испитивању које су спровели Adao и сар. (2016) на 35 асимптоматских појединаца, припадника урбане популације Филипина. Суптипови ST3 и ST1 су били најзаступљенији у студији коју су спровели Mohamed и сар. (2017). У студију је било укључено 1.262 симптоматских и асимптоматских пацијената из две велике болнице из Саудијске Арабије. Sanpool и сар. (2017) пријављују ST1 као најзаступљенији (64%) код становника Лаос-а, док је ST3 на другом месту (24%). Од 303 педијатријских пацијената из Турске, код 115 је *Blastocystis* доказан помоћу real-time PCR методе. Најзаступљенији је био ST3 (43,4%), затим ST1 (26,1%), ST4 (10,9%) и ST2 (8,7%). Мешане инфекције су идентификоване код 5 узорака (10,9%) (Dogan и сар. 2016). Koltas и Eroglu (2016) испитивањем 28 изолата бластоцистиса изолованих из 17 пацијената који живе у урбаној средини и 11 пацијената из руралног подручја Турске, су установили ST1 у 35,7% случајева, ST3 у 25,0% случајева, ST2 у 17,8% случајева, ST4 у 10,7% случајева док су суптипове 5, 6, и 7 установили у по једном случају (3,6%). Аутори су суптипове 5, 6, и 7 изоловани искључиво код пацијената из руралне средине, и на основу својих резултата сугеришу на трансмисију животиња-човек, односно зоонотски потенцијал ових суптипова. Cian и сар. (2017) су испитали присуство бластоцистиса код различитих животињских врста из два

зоолошка врта у Француској. Субтипизацији су подвргли 111 изолата и установили су присуство 11 познатих суптипова. На основу резултата истраживања и резултата других молекуларних епидемиолошких истраживања вредновали су потенцијални ризик од зооноске трансмисије упоређивањем дистрибуције суптипова између људи и животиња. Резултати сугеришу да примати, папкари и птице могу бити резервоар инфекције за људе, нарочито код људи у чијем је опису посла контакт са животињама. Са друге стране, изгледа да карнивори, рептили и инсекти не представљају сигнификантан извор заразе бластоцистисом за људе.

Висока преваленца бластоцистиса код свиња указује да су свиње највероватније природни домаћини ових паразита. Најчешћи суптипови код свиња јесу ST1 и ST5. Суптип 5 се сматра релативно ретким код човека, међутим зооносна трансмисија је већ доказана (Yan и сар., 2007). Wang и сарадници (2014b) су PCR анализи подвргли узорке фецеса од свиња и људи, који су били у контакту са тим свињама. Једну групу су чиниле свиње из интензивног узгоја и радници са фарми, док су другу групу чиниле свиње и људи из сеоских домаћинстава. Код свих свиња је доказано присуство суптипа 5. Код људи су доказани суптипови 1, 2, 3 и 5. Суптип 5 био присутан код 13,9% (5/36) радника са фарми, док уопште није доказан код људи из сеоских газдинстава. Блиски контакт радника са свињама може представљати ризик од зооноске трансмисије. Song и сар. (2017) су код свиња на територији Shaanxi провинције (НР Кина) доказали присуство четири суптипа (ST1, 3, 5 и 10). Суптип ST5 је био преобладајући и широко распрострањен на различитим локацијама и у различитим категоријама свиња. Зооноски суптип 1 је детектован код незалучених и залучених прасића и товљеника, а ST3 је детектован код свих свиња узраста до четири месеца. Осим једне фарме ST1 је доказан на свим локацијама, док је зооноски суптип 3 идентификован на свега две локације. Суптип ST10 је доказан само у једном узорку фецеса пореклом од незалученог прасета. Yoshikawa и сар. (2016) су код свиња у Индонезији такође приказали доминацију ST5, док су доказани и суптипови ST1, ST2 и ST7. Иако се чини да ST5 доминира у молекуларној епидемиологији бластоцистиса код свиња, Navarro и сар. (2008) су пак установили да је ST1 најзаступљенији код свиња из интензивног узгоја. Разлике у географској дистрибуцији појединих субтипова су доказане код

примата (Alfellani и сар. 2013б) па се ни код свиња не могу искључити географске варијације у дистрибуцији различитих суптипова. У нашем истраживању на популацији свиња из интензивног узгоја међу идентификованим субтипovima доминирао ST1 (96,0%). ST1 је један од суптипова, који се најчешће срећу код људи, па се улога свиња са овако високим степеном инфицираности никако не сме занемарити у епидемиологији хуманих *Blastocystis* инфекција. Од осталих суптипова ST5 је идентификован у 64,0% узорака, затим ST3 у 24,0% и ST2 8,0% узорака. Суптип ST5 као потенцијални зоотски суптип има значај у индустријском свињарству, где је доказана његова трансмисија на људе. Утврђивање правца трансмисије ST1 и ST3, односно одређивање улоге свиња у трансмисији ових субтипова захтева додатна молекуларно-епидемиолошка истраживања.

Ова дисертација представља прву епидемиолошку студију о преваленци и молекуларној карактеризацији зоотског паразита *Blastocystis* sp. код свиња са територије Србије. Установљена висока преваленца бластоцистиса код свиња из интензивног узгоја, потврђује улогу свиња као природних резервоара ове зоотске протозое. Потврђена је хипотеза да су свиње резервоар одређених зоотских суптипова *Blastocystis* sp. и да представљају фактор ризика у ширењу инфекције на људе у Војводини. У највећем броју узорака установљено је присуство суптипа ST1, што се подудара са резултатима других аутора, који су испитивали преваленцу суптипова код свиња у Европи (Navarro и сар. 2008), док на другим географским локацијама (Азија, Аустралија) после суптипа 5, суптип 1 представља један од најчешћих налаза. Ова дисертација представља први рад са територије Србије, који обухвата упоређивање перформанси различитих поступака у дијагнози бластоцистиса, и по нашим сазнањима први рад, који испитује дијагностичке перформансе појединих метода када су предмет ипитувања свиње.



## 8. ЗАКЉУЧЦИ

На основу спроведеног истраживања, изведени су следећи закључци:

1. Утврђено је присуство *Blastocystis* sp. у популацији прегледаних свиња на подручју АП Војводине и установљена је преваленца бластоцистиса код свиња на основу резултата нативног прегледа од 41,69%, док је преваленца бластоцистиса на основу резултата *in vitro* култивације износила 70,22%. *Blastocystis* sp. је присутан код свих категорија свиња на свим узоркованим фармама. На основу резултата *in vitro* култивације не постоји статистички значајна веза између преваленце и различитих региона у АП Војводини, као ни између различитих фарми.

2. Потврђена је хипотеза да су свиње резервоар одређених зоонотских суптипова *Blastocystis* sp. и да представљају фактор ризика у ширењу инфекције на људе, на основу резултата суптипизације изолата. У највећем броју узорака установљено је присуство суптипа ST1, који је један од најчешће доказаних суптипова код људи. На другом месту по заступљености је био суптип ST5, који представља ризик по људе који су у непосредном свакодневном контакту са свињама, као што су радници на фармама и кланицама. Суптип ST3 који се најчешће доводи у везу са синдромом иритабилног колона (ИБС) је био присутан у 24% узорка, који су били успешно типизирани.

3. Утврђена је ниска осетљивост нативног прегледа у односу на PCR методу. У поређењу са PCR методом, израчуната осетљивост нативног прегледа је износила 46,15%. Када се упореди култивација и конвенционална PCR метода која амплификује ДНК екстраховану директно из фецеса свиња, осетљивост *in vitro* култивације је износила 84,62%. Дијагностичке перформансе *in vitro* култивације и молекуларних техника у дијагностици *Blastocystis* sp. код свиња су супериорне у односу на традиционални и опште прихваћен нативни преглед фекалног материјала.

## 9. ЛИТЕРАТУРА

- Abdel-Hafeez**, E.H., Ahmad, A.K., Kamal, A.M., Abdellatif, M.Z., Abdelgelil, N.H. 2015. *In vivo* antiprotozoan effects of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) extracts on experimentally infected mice with *Blastocystis* spp. Parasitol. Res. 114:3439-44.
- Abe**, N. 2004. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. Vet. Parasitol. 120:235-42.
- Abe**, N., Nagoshi, M., Takami, K., Sawano, Y., Yoshikawa, H. 2002. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. Vet. Parasitol. 106:203-12.
- Abe**, N., Wu, Z., Yoshikawa, H., 2003a. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Parasitol. Res. 89, 393-396.
- Abe**, N., Wu, Z., Yoshikawa, H., 2003b. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. Vet. Parasitol. 113, 321-325.
- Abe**, N., Wu, Z., Yoshikawa, H., 2003c. Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Parasitol. Res. 90, 124-128.
- Adao**, DEV., Dela Serna, AO., Belleza, MLB., Bolo1 NR., Rivera, WL. 2016. Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from asymptomatic individuals in an urban community in the Philippines. Annals of Parasitology. 62(3): 193-200.
- Aguiar**, J. I., Goncalves, A. Q., Sodre, F. C., Pereira Sdos, R., Boia, M. N., de Lemos, E. R., Daher, R. R. 2007. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 40:631-634.
- Ajjampur**, SSR., Png, CW., Chia, WN., Zhang, Y., Tan, KSW. 2016. *Ex Vivo* and *In Vivo* Mice Models to Study *Blastocystis* spp. Adhesion, Colonization and Pathology: Closer to Proving Koch's Postulates. PLoS ONE 11(8): e0160458.
- Akdemir**, C., R. Helvacı. 2007. Evaluation of parasitology laboratory results of a group of people older than 15 years of age in Kutahya. Turkiye Parazitol. Derg. 31:129-132.

- Albrecht, H.,** Stellbrink, H. J., Koperski, K., Greten, H. 1995. *Blastocystis hominis* in human immunodeficiency virus-related diarrhea. Scand. J. Gastroenterol. 30:909-914.
- Alexeieff, A.** 1911. Sur la nature des formations dites kystes de *Trichomonas intestinalis*. C. R. Soc. Biol. 71:296-298.
- Alfellani M.A.,** Stensvold C.R., Vidal-Lapiedra A., Onuoha E.S.U., Fagbenro-Beyioku A.F., Clark C.G. 2013a. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop. 126:11-18.
- Alfellani, M.A.,** Jacob, A.S., Perea, N.O., Krecek, R.C., Taner-Mulla, D., Verweij, J.J., Levecke, B., Tannich, E., Clark, C.G., Stensvold, C.R. 2013b. Diversity and distribution of *Blastocystis sp.* subtypes in non-human primates. Parasitol. 140:966-971.
- Alfellani, M.A.,** Taner-Mulla, D., Jacob, A.S., Imeede, C.A., Yoshikawa H., Stensvold C.R., Clark, C.G. 2013c Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. Protist. 164:497-509.
- al-Tawil, Y. S.,** Gilger, M. A., Gopalakrishna, G. S., Langston, C., Bommer, K. E. 1994. Invasive *Blastocystis hominis* infection in a child. Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 148:882-885.
- Amin, A.M.** 1997. *Blastocystis hominis* among apparently healthy food handlers in Jeddah, Saudi Arabia. J. Egypt. Soc. Parasitol. 27:817-823.
- Amin, O.** 2005. Epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. Res. J. Parasitol. 1:1-10.
- Amin, O.M.** 2002. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. Am. J. Trop. Med. Hyg., 66:799-803.
- Andiran, N.,** Acikgoz, Z.C., Turkay, S., Andiran, F. 2006. *Blastocystis hominis*-an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. J. Pediatr. Surg. 41:1489-1491.
- Anuar, T.S.,** Ghani, M.K., Azreen, S.N., Salleh, F.M., Moktar, N. 2013. *Blastocystis* infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. Parasit. Vectors. 6:40.
- Arisue, N.,** Hashimoto, T. and Yoshikawa, H. 2003. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. Parasitol. 126:1-9.
- Arisue, N.,** Hashimoto, T., Yoshikawa, H., Nakamura, Y., Nakamura, G., Nakamura, F., Yano, T.-A., Hasegawa, M. 2002. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis*

- and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49:42-53.
- Armentia**, A., Mendez, J., Gomez, A., Sanchis, E., Fernandez, A., de la Fuente, R., Sanchez, P. 1993. Urticaria by *Blastocystis hominis*. Successful treatment with paromomycin. *Allergol. Immunopathol.* 21:149-151.
- Ash**, L. R., **Orihel**, T.C. 1990. *Blastocystis hominis* and fecal elements, p. 88-89. In L. R. Ash and T. C. Orihel Atlas of Human Parasitology, 3rd ed. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago.
- Azizian**, M., Basati, G., Abangah, G., Mahmoudi, MR., Mirzaei, A. 2016. Contribution of *Blastocystis hominis* subtypes and associated inflammatory factors in development of irritable bowel syndrome. *Parasitol. Res.* 115(5):2003-2009.
- Bálint**, A., Dóczi, I., Bereczki, L., Gyulai, R., Szűcs, M., Farkas, K., Urbán, E., Nagy, F., Szepes, Z., Wittmann, T., Molnár, T. 2014. Do not forget the stool examination! - cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitol. Res.* 113:1585-1590.
- Basualdo**, J. A., Cordoba, M. A., de Luca, M. M., Ciarmela, M. L., Pezzani, B. C., Grenovero, M. S., Minvielle, M. C. 2007. Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina, 2002–2003. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 49:251-255.
- Beatty**, J.K., Bhargava, A., Buret, A.G. 2014. Post-infectious irritable bowel syndrome: mechanistic insights into chronic disturbances following enteric infection, *World J. Gastroenterol.* 20:3976-3985.
- Belleza**, M.L., Reyes, J.C., Tongol-Rivera, P.N., Rivera, W.L. 2016. Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from human and canine hosts in an urban community in the Philippines. *Parasitol Int.* 65:291-4.
- Ben Abda**, I., Maatoug, N., Ben Romdhane, R., Bouhelmi, N., Zallegua, N., Aoun, K., Viscogliosi, E., Bouratbine, A. 2017. Prevalence and Subtype Identification of *Blastocystis* sp. in Healthy Individuals in the Tunis Area, Tunisia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 96: 202-204.
- Berkes**, J., Viswanathan, V. K., Savkovic, S. D., Hecht, G. 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52:439-451.
- Biedermann**, T., Hartmann, K., Sing, A., Przybilla, B. 2002. Hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs and chronic urticaria cured by treatment of *Blastocystis hominis* infection. *Br. J. Dermatol.* 146:1113-1114.
- Böhm-Gloning**, B., Knobloch, J., Walderich, B., 1997. Five subgroups of *Blastocystis hominis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients revealed by

- restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. Trop. Med. Int. Health. 2:771-778.
- Boivin, M.** 2001. Socioeconomic impact of irritable bowel syndrome in Canada. Can. J. Gastroenterol. 15(Suppl B):8B-11B.
- Boorom, K.F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Li, L.H., Zhou, X.N., Ok, U.Z., Leelayoova, S., Jones, M.S.** 2008. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis* and asymptomatic infection. Parasit. Vectors. 1: 40.
- Boreham, P. F. L., Stenzel, D.J.** 1993. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. Adv. Parasitol. 32:1-70.
- Bratt, D. E., Tikasingh, E. S.** 1990. *Blastocystis hominis* in two children of one family. West Indian Med. J. 39:57-58.
- Bremer Christensen, C., Soelberg, J., Stensvold, C.R., Jäger, A.K.** 2015. Activity of medicinal plants from Ghana against the parasitic gut protist *Blastocystis*. J Ethnopharmacol. 174:569-75.
- Brites, C., Barberino, M. G., Bastos, M. A., Sampaio Sa, M., Silva, N.** 1997. *Blastocystis hominis* as a potential cause of diarrhea in AIDS patients: a report of six cases in Bahia, Brazil. Braz. J. Infect. Dis. 1:91-94.
- Brittan, F.** 1849. Report of a series of microscopical investigations on the pathology of cholera. London Med. Gaz. 9:530-542.
- Brumpt, E.** 1912. *Blastocystis hominis* n sp. et formes voisines. Bull. Soc. Pathol. Exot. 5:725-730.
- Burden, D.J.,** 1976. *Blastocystis* sp.- a parasite of pigs. Parasitology, 73: IV-V.
- Burden, D.J., Anger, H.S., Hammer, N.C.,** 1978/1979. *Blastocystis* sp. infection in pigs. Vet. Microbiol. 3:227-234.
- Camilleri, M., Carlson, P., McKinzie, S., Grudell, A., Busciglio, I., Burton, D., Baxter, K., Ryks, M., Zinsmeister, A.R.** 2008. Genetic variation in endocannabinoid metabolism, gastrointestinal motility, and sensation. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 294: G13-19.
- Cenac, N., Andrews, C.N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N.W., Sharkey, K.A., Ferraz, J.G., Shaffer, E., Vergnolle, N.** 2007. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. J. Clin. Invest. 117:636-47.
- Chandramathi, S., K. Suresh, S. Shuba, A. Mahmood, U.R. Kuppusamy.** 2010. High levels of oxidative stress in rats infected with *Blastocystis hominis*. Parasitology. 137:605-611.

- Chandramathi, S., Suresh, K., Sivanandam, S., Kuppusamy, U. R.** 2014. Stress Exacerbates Infectivity and Pathogenicity of *Blastocystis hominis*: *In Vitro* and *In Vivo* Evidences. PLoS ONE. 9(5).
- Chen, X. Q., Singh, M., Ho, L. C., Moe, K. T., Tan, S. W., Yap. E. H.** 1997. A survey of *Blastocystis sp.* in rodents. Lab. Anim. Sci. 47:91-94.
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., et al.** 2017. Molecular Epidemiology of *Blastocystis sp.* in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk. PLoS ONE 12 (1): e0169659.
- Cirioni, O., Giacometti, D. Drenaggi, F. Ancarani, G. Scalise.** 1999. Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. Eur. J. Epidemiol. 15:389–393.
- Clark, C.G.** 1997. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. Mol. Biochem. Parasitol. 87:79-83.
- Clark, C.G. and Stensvold, C.R.** 2016. *Blastocystis*: Isolation, xenic cultivation, and cryopreservation. Curr. Protoc. Microbiol. 43:20A.1.1-20A.1.8. doi: 10.1002/cpmc.18
- Clark, C.G., Diamond, L.S.** 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clin. Microbiol. Rev. 15:329-341.
- Clark, C.G., Van der Giezen, M., Alfellani, M.A., Stensvold, C.R.** 2013. Recent developments in *Blastocystis* research. Advances in Parasitology. 82:1-32.
- Collins, S.M.** 2014. A role for the gut microbiota in IBS, Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 11:497-505.
- Cruz Licea, V., Plancarte Crespo, A., Moran Alvarez, C., Valencia Rojas Rodriguez Sanchez, G., Vega Franco, L.** 2003. *Blastocystis hominis* among food vendors in Xochimilco markets. Rev Latinoam. Microbiol. 45:12-15.
- Culha, G.** 2006. The distribution of patients with intestinal parasites presenting at the Parasitology Laboratory of the Mustafa Kemal University Medical Faculty. Turkiye Parazitol. Derg. 30:302-304.
- Dagci, H., Ustun, S., Taner, M.S., Ersoz, G., Karacasu, F., Budak, S.** 2002. Protozoon infections and intestinal permeability. Acta Tropica. 81:1-5.
- Danchaivijitr, S., Y. Rongrungruang, U. Kachintorn, V. Techasathit, S. Pakaworavuthi, and K. Kachintorn.** 2005. Prevalence and effectiveness of an education program on intestinal pathogens in food handlers. J. Med. Assoc. Thai. 88 (Suppl. 10):S31-S35.

- Das, R., Khalil, S., Mirdha, B. R., Makharia, G. K., Dattagupta, S., Chaudhry, R.** 2016. Molecular Characterization and Subtyping of *Blastocystis* Species in Irritable Bowel Syndrome Patients from North India. PLoS ONE. 11(1).
- Denoëud, F., M. Roussel, B. Noel, I. Wawrzyniak, C. Da Silva, M. Diogon, E. Viscogliosi, C. Brochier-Armanet, A. Couloux, J. Poulain, B. Segurens, V. Anthouard, C. Texier, N. Blot, P. Poirier, G.C. Ng, K.S.W. Tan, F. Artiguenave, O. Jaillon, J.M. Aury, F. Delbac, P. Wincker, C.P. Vivarès, H. El Alaoui.** 2012. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite, Genome Biol. 12:R29.
- Devera, R. A., Velasquez, V. J., Vasquez, M. J.** 1998. Blastocystosis in preschool children from Bolivar City, Venezuela. Cad. Saude Publica 14:401-407.
- Dogan, N., Aydin, M., Tuzemen, NU., Dinleyici, EC., Oguz, I., Dogruman-Al, F.** 2016. Subtype distribution of *Blastocystis* spp. isolated from children in Eskisehir, Turkey. Parasitology International 66 (2017) 948–951.
- Dogruman-Al, F., H. Dagci, H. Yoshikawa, O. Kurt, and M. Demirel.** 2008. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 103:685-689.
- Dogruman-Al, F., Kustimur, S., Yoshikawa, H., Tuncer, C., Simsek, Z., Tanyuksel, M., Araz, E., Boorum, K.** 2009. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.104:724-727.
- Dogruman-Al, F., Simsek, Z., Boorum, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C., Kustimur, S., Altinbas, A.** 2010. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. PLoS One 5. e15484.
- Dogruman-Al, F., Turk, S., Adiyaman-Korkmaz, G., Hananel, A., Levi, L., Kopelowitz, J., Babai, O., Gross, S., Greenberg, Z., Herschkovitz, Y., Mumcuoglu, I.** 2015. A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens, Parasitol. Res. 114:495-500.
- Domínguez-Márquez, M.V., Guna, R., Muñoz, C., Borrás, R.** 2009. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol. Res.105:949–55.
- Dunn, L. A.** 1992. Variation among cultured stocks of *Blastocystis hominis* (Brumpt 1912). Ph.D. thesis. The University of Queensland, Brisbane, Australia.
- Dunn, L. A., Boreham, P. F. L., Stenzel, D. J.** 1989. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. Int. J. Parasitol. 19:43-56.

- Dunn**, L.A., Tan, K.S., Vanelle, P., Juspín, T., Crozet, M.D., Terme, T., Upcroft, P., Upcroft, J.A. 2012. Development of metronidazole-resistant lines of *Blastocystis* sp. Parasitol. Res. 111(1):441-50.
- El Safadi**, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., Bellanger, AP., Botterel, F., Candolfi, E., Desoubeaux, G., Lachaud, L., Morio, F., Pomares, C., Rabodonirina, M., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Gantois, N., Certad, G., Delhaes, L., Poirier, P., Viscogliosi, E. 2016. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. BMC Infectious Diseases: 16:451
- El Safadi**, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G., Viscogliosi, E. 2014. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. BMC Infectious Diseases. 14:164.
- Elghareeb**, A.S., Younis, M.S., El Fakahany, A.F., Nagaty, I.M., Nagib, M.M. 2015. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. Trop Parasitol. 5:24-29.
- EL-Marhoumy**, S.M., EL-Nouby, K.A., Shoheib, Z.S., Salama, A.M. 2015. Prevalence and diagnostic approach for a neglected protozoon *Blastocystis hominis*. Asian Pac. J. Trop. Dis. 5:51-59.
- El-Shazly**, A.M., Abdel-Magied, A.A., El-Beshbishi, S.N., El-Nahas, H.A., Fouad, M.A., Monib, M.S. 2005. *Blastocystis hominis* among symptomatic and asymptomatic individuals in Talkha Center, Dakahlia Governorate, Egypt. J. Egypt. Soc. Parasitol. 35:653-666.
- Elwakil**, H.S., **Hewedi**, I.H. 2010. Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. Parasitol Res 107 (3): 685-689.
- Eroglu**, F., Genc, A., Elgun, G., Koltas, I.S. 2009. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. Parasitol. Res. 105:1589-92.
- Eroglu**, F., **Koltas**, I.S. 2010. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* using PCR method. Parasitol. Res. 107:841-845.
- Ersfeld**, K. 2003. Genomes and genome projects of protozoan parasites. Curr. Issues Mol. Biol. 5:61-74.
- Escobedo**, A.A., Canete, R., Nunez, F. A. 2007. Intestinal protozoan and helminth infections in the Municipality San Juan y Martinez, Pinar del Rio, Cuba. Trop. Doct. 37:236-238.
- Fayer**, R., Elsasser, T., Gould, R., Solano, G., Urban Jr, J., Santin, M. 2014. *Blastocystis* tropism in the pig intestine, Parasitol. Res. 113:1465-1472.



- Fayer, R., Santín, M., Macarisin, D.** 2012. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol. Res.* 111:1349-1355.
- Florez, A.C., Garcia, D.A., Moncada, L., Beltran, M.** 2003. Prevalence of microsporidia and other intestinal parasites in patients with HIV infection, Bogota. *Biomedica* 23:274-282.
- Forsell, J., Granlund, M., Stensvold, C. R., Clark, G. C., Evengård, B.** 2012. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31:1689-1696.
- Garcia, L.S., Bruckner D.A.** 1993. *Diagnostic medical parasitology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Gassama, A., Sow, P.S., Fall, F., Camara, P., Gueye-N'diaye, A., Seng, R., Samb, B., M'Boup, S., Aidara-Kane, A.** 2001. Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Int. J. Infect. Dis.* 5:192-198.
- Gecse, K., Róka, R., Ferrier, L., Leveque, M., Eutamene, H., Cartier, C., Ait-Belgnaoui, A., Rosztóczy, A., Izbéki, F., Fioramonti, J., Wittmann, T., Bueno, L.** 2008. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 57:591-598.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Antonicelli, L., D'Amato, G., Silvestri, C., Del Prete, M.S., Scalise, G.** 2003. Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. *J. Parasitol.* 893:490-492.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Fiorentini, A., Fortuna, M., Scalise, G.** 1999. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18:436-439.
- Gould, R., Boorom, K.** 2013. *Blastocystis* surface antigen is stable in chemically preserved stool samples for at least 1 year, *Parasitol. Res.* 112:2469-2471.
- Graczyk, T.K., Shiff, C.K., Tamang, L., Munsaka, F., Beitin, A.M., Moss, W.J.** 2005. The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. *Parasitol. Res.* 98:38-43.
- Guimaraes, S., Sogayar, M.I.** 1993. *Blastocystis hominis*: occurrence in children and staff members of municipal day-care centers from Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. *Mem. Ins.t Oswaldo Cruz.* 88:427-429.
- Gupta, R., Parsi, K.** 2006. Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. *Australas. J. Dermatol.* 47:117-119.

- Hailemariam, G.**, Kassu, A., Abebe, G., Abate, E., Damte, D., Mekonnen, E., Ota, F. 2004. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS and HIV seronegative individuals in a teaching hospital, Ethiopia. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:41–43.
- Hirata, T.**, Nakamura, H., Kinjo, N., Hokama, A., Kinjo, F., Yamane, N., Fujita, J. 2007. Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan. *Parasitol. Res.* 101:1717-1719.
- Horiki, N.**, Maruyama, M., Fujita, Y., Yonekura, T., Minato, S., Kaneda, Y. 1997. Epidemiologic survey of *Blastocystis hominis* infection in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56:370-374.
- Hsieh, F.Y.**, Bloch, D.A., Larsen, M.D., 1998. A simple method of sample size calculation for linear and logistic regression. *Stat. Med.* 17, 1623–1634.
- Hulisz, D.** 2004. The burden of illness of irritable bowel syndrome: current challenges and hope for the future. *J. Manag. Care. Pharm.* 10:299-309.
- Hungin, A.P.**, Chang, L., Locke, G.R., Dennis, E.H., Barghout, V. 2005. Irritable bowel syndrome in the United States: prevalence, symptom patterns and impact. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21:1365-1375.
- Hussain, R.**, Jaferi, W., Zuberi, S., Baqai, R., Abrar, N., Ahmed, A., Zaman, V. 1997. Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56:301-306.
- Hussein, E.M.**, Hussein, A.M., Eida, M.M., Atwa, M.M. 2008. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol. Res.* 102:853-860.
- Iguchi, A.**, Ebisu, A., Nagata, S., Saitou, Y., Yoshikawa, H., Iwatani, S., Kimata, I. 2007. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol. Int.* 56:107-112.
- Iguchi, A.**, Yoshikawa H., Yamada M., Kimata I., Arizono N. 2009. Expression of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis* sp. strain RN94-9. *Parasitol. Res.* 105: 35-140.
- Jelinek, T.**, Peyerl, G., Löscher, T., von Sonnenburg, F., Nothdurft, H.D. 1997. The role of *Blastocystis hominis* as a possible intestinal pathogen in travellers. *J. Infect.* 35:63-66.
- Jiang, J.B.**, He, J.G. 1993. Taxonomic status of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Today* 9:2-3.
- Jiménez-González, D.E.**, Martínez-Flores, W.A., Reyes-Gordillo, J., Ramírez-Miranda, M.E., Arroyo-Escalante, S., Romero-Valdovinos, M., Stark, D., Souza-Saldivar, V., Martínez-Hernández, F., Flisser, A., Olivo-Díaz, A., Maravilla, P. 2012.

- Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol. Res.* 110:1269-1275.
- Jones, M.S.,** Ganac, R.D., Hiser, G., Hudson, N.R., Le, A., Whipps, C.M. 2008. Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR, *Parasitol. Res.* 103:551-557.
- Jones, W.R.** 1946. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 40:130-140.
- Kaneda, Y.,** Horiki, N., Cheng, X., Tachibana, H., Tsutsumi, Y. 2000. Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 25:51-56.
- Kaneda, Y.,** N. Horiki, X. J. Cheng, Y. Fujita, M. Maruyama, and H. Tachibana. 2001. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65:393-396.
- Katsarou-Katsari, A.,** Vassalos, C.M., Tzanetou, K., Spanakos, G., Papadopoulou, C., Vakalis, N. 2008. Acute Urticaria Associated with Amoeboid Forms of *Blastocystis* sp. Subtype 3. *Acta Derm. Venereol.* 88:80-81
- Kaya, S.,** Cetin, E.S., Aridogan, B.C., Arikan, S., Demirci, M. 2007. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye Parazitol. Derg.* 31:184-187.
- Kean, B.H.,** Matt, K.E., Russel, A.J. (ed). 1978. Tropical medicine and parasitology: classic investigations, vol. 1 and 2. Cornell University Press, Ithaca, N.Y.
- Kennedy, P.J.,** Cryan, J.F., Dinan, T.G., Clarke, G. 2014. Irritable bowel syndrome: A microbiome-gut-brain axis disorder? *World J. Gastroenterol.* 20:14105-14125.
- Khan, Z.A., Alkhalife, I.S.** 2005. Prevalence of *Blastocystis hominis* among “healthy” food handlers in Dammam, Saudi Arabia. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 35:395-401.
- Köksal, F.,** Başlantı, I., Samastı, M., 2010. A retrospective evaluation of the prevalence of intestinal parasites in Istanbul, Turkey. *Turkiye Parazitol. Derg.* 34:166-172.
- Koltas, I.S.,** Eroglu, F. 2016. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates using SSU rRNA-DNA sequencing in rural and urban population in southern Turkey, *Exp. Parasitol.* 170:247-251.
- Kostka, M.,** Cepicka, I., Hampl, V., Flegr, J. 2007. Phylogenetic position of *Karotomorpha* and paraphyly of *Proteromonadidae*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43:1167-1170.
- Krogsgaard, L.R.,** Engsbro, A.L., Stensvold, C.R., Nielsen, H.V., Bytzer, P. 2014. The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with Irritable Bowel Syndrome: a population-based casecontrol study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13:507-513.

- Krüger, K.**, Kamilli, I., Schattenkirchner, M. 1994. *Blastocystis hominis* as a rare arthritogenic pathogen. A case report. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 53:83-85.
- Lagace-Wiens, P.R.**, Van Caesele, P.G., Koschik, C. 2006. *Dientamoeba fragilis*: an emerging role in intestinal disease. *CMAJ*. 175:468-469.
- Lakhanpal, S.**, Cohen, S.B., Fleischmann, R.M. 1991. Reactive arthritis from *Blastocystis hominis*. *Arthritis and Rheumatism*. 34: 251-253.
- Lalošević, V.**, Vučković, N., Vukavić, T., Vučković, D., Somer, Lj., Lalošević, D. 1998. *Blastocystis hominis* and colitis ulcerosa- a case report. *Archive of Oncology (Suppl.2)*:57-8.
- Leder, K.**, Hellard, M. E., Sinclair, M. I., Fairley, C. K. and Wolfe, R. 2005. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 20: 1390-1394.
- Lee, L.I.**, Chye, T.T., Karmacharya, B.M., Govind, S.K. 2012. *Blastocystis sp.*: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasit. Vectors* 5:130.
- Lee, M.G.**, D.J. Stenzel. 1999. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitol. Res.* 85:109-117.
- Lee, M.J.** 1991. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2089.
- Leelayoova, S.**, Rangsin, R., Taamasri, P., Naaglor, T., Thathaisong, U., Mungthin, M. 2004. Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70:658-662.
- Leelayoova, S.**, Taamasri, P., Rangsin, R., Naaglor, T., Thathaisong, U., Mungthin, M. 2002. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96:803-807.
- Lembo, T.**, Fullerton, S., Diehl, D., Raen, H., Munakata, J., Naliboff, B., Mayer, E.A. 1996. Symptom duration in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 91:898-905.
- Levy, R.L.**, Whitehead, W.E., Von Korff, M.R., Feld, A.D. 2000. Intergenerational transmission of gastrointestinal illness behavior. *Am. J. Gastroenterol.* 95:451-456.
- Li, J.**, T. Deng, X. Li, G. Cao, X. Li, Y. Yan. 2013. A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitol. Res.* 112:3537-3541.
- Li, L.H.**, Zhang, X.P., Lv, S., Zhang, L., Yoshikawa, H., Wu, Z., Steinmann, P., Utzinger, J., Tong, X.M., Chen, S.H., Zhou. X.N. 2007b. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol. Res.* 102:83-90.
- Li, L.H.**, Zhou, X.N., Du, Z.W., Wang, X.Z., Wang, L.B., Jiang, J.Y., Yoshikawa, H., Steinmann, P., Utzinger, J., Wu, Z., Chen, J.X., Chen, S.H., Zhang, L. 2007a.

- Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol. Int.* 56:281-6.
- Liebregts, T., Adam, B., Bredack, C., Roth, A., Heinzl, S., Lester, S., Downie-Doyle, S., Smith, E., Drew, P., Talley, N.J., Holtmann, G.** 2007. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 132:913-920.
- Londoño-Franco, Á.L., Loaiza-Herrera, J., Lora-Suárez, F.M., Gómez-Marín, J.E.** 2014. [*Blastocystis* sp. frequency and sources among children from 0 to 5 years of age attending public day care centers in Calarcá, Colombia (in Spanish)]. *Biomedica* 34:218-227.
- Long, H.Y., Handschack, A., König, W., Ambrosch, A.** 2001. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitol. Res.* 87:1029-1030.
- Lösch, F.A.** 1975. Massive development of amebas in the large intestine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24:383-392. (Translation submitted by B.H. Kean).
- Mahmoud, M.S., W.A. Saleh.** 2003. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 33:13-30.
- Markell, E.K., Udkow M.P.** 1986. *Blastocystis hominis*: pathogen or fellow traveller? *Am. Trop. Med. Hyg.* 35:1023-1026.
- Martin-Sanchez, A. M., Canut-Blasco, A., Rodriguez-Hernandez, J., Montes-Martinez, I., Garcia-Rodriguez, J.A.** 1992. Epidemiology and clinical significance of *Blastocystis hominis* in different population groups in Salamanca (Spain). *Eur. J. Epidemiol.* 8:553-559.
- Matsumoto, Y., Yamada, M., Yoshida, Y.** 1987. Light-microscopical appearance and ultrastructure of *Blastocystis hominis*, an intestinal parasite of man. *Zentralbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg. Ser. A* 264:379-385.
- Mattiucci, S., Crisafi, B., Gabrielli, S., Paoletti, M., Cancrini, G.** 2016. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiology and Infection.* 144:635-646.
- McClure, H.M., Strobert E.A., Healy G.R.** 1980. *Blastocystis hominis* in a pig-tailed macaque: a potential enteric pathogen for nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci.* 30:890-894.
- Mehlhorn, H.** 1988. *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912: are there different stages or species? *Parasitol. Res.* 74:393-395.
- Menounos, P.G., Spanakos, G., Tegos, N., Vassalos, C.M., Papadopoulou, C., Vakalis, N.C.** 2008. Direct detection of *Blastocystis* sp. in human faecal samples and

subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. *Mol. Cell. Probes.* 22:24-29.

**Micheloud, D.**, Jensen, J., Fernandez-Cruz, E., Carbone, J. 2007. [Chronic angioedema and blastocystis hominis infection]. *Rev. Gastroenterol. Peru.* 27:191-193.

**Miller, S.A.**, Rosario, C.L., Rojas, E., Scorza, J.V. 2003. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop. Med. Int. Health* 8:342-347.

**Minvielle, M.C.**, Pezzani, B.C., Cordoba, M.A., De Luca, M.M., Apezteguia, M.C., Basualdo, J.A. 2004. Epidemiological survey of *Giardia* spp. and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. *Korean J. Parasitol.* 42:121-127.

**Moe, K.T.**, Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., Ng, G.C., Yap, E.H. 1997. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol. Res.* 83:319-325.

**Moe, K.T.**, Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., Yap, E.H. 1999. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms *in vitro*. *Parasitol. Res.* 85:103-8.

**Moe, K.T.**, Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Chen, X.Q., Yap, E.H. 1996. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol. Res.* 82:439-444.

**Moghaddam, D.**, Ghadirian, E., Azami, M. 2005. *Blastocystis hominis* and evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitol. Res.* 96:273-275.

**Mohamed, RT.**, El-Bali, MA., Mohamed, AA., Abdel-Fatah, M.A., EL-Malky, MA., Mowafy, NM., Zaghlool, DA., Bakri, RA., Al-Harathi, SA. 2017. Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. *Parasites & Vectors.* 10:174.

**Nagel, R.**, Cuttall, L., Stensvold, C.R., Mills, P.C., Bielefeldt-Ohmann, H., Traub, R.J. 2012. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Intern. Med. J.* 42:1187-1195.

**Nagel, R.**, Traub, R.J., Kwan, M.M., Bielefeldt-Ohmann, H. 2015. *Blastocystis* specific serum immunoglobulin in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls, *Parasit. Vectors.* 8:453.

**Nasirudeen, A.M.**, Tan, K.S., Singh, M., Yap, E.H. 2001. Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology.* 123:235-46.

**Navarro, C.**, Domínguez-Márquez, M.V., Garijo-Toledo, M.M., Vega-García, S., Fernández-Barredo, S., Pérez-Gracia, M.T., García, A., Borrás, R., Gómez-Muñoz,

- M.T. 2008. High prevalence of *Blastocystis sp.* in pigs reared under intensive growing systems: frequency of ribotypes and associated risk factors. *Vet. Parasitol.* 153:347-58.
- Nimri**, L.F. 1993. Evidence of an epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in northern Jordan. *J. Clin. Microbiol.* 31:2706-2708.
- Nimri**, L.F., Meqdam, M. 2004. Enteropathogens associated with cases of gastroenteritis in a rural population in Jordan. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:634-639.
- Noël**, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L. and Viscogliosi, E. 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* 43:348-355.
- Noor Azian**, M.Y., San, Y.M., Gan, C.C., Yusri, M.Y., Nurulsyamzawaty, Y., Zuhazam, A.H., Maslawaty, M.N., Norparina, I., Vythilingam, I., 2007. Prevalence of intestinal protozoa in an aborigine community in Pahang, Malaysia. *Trop. Biomed.* 24:55-62.
- Noureldin**, M.S., A.A. Shaltout, E.M. El Hamshary, and M.E. Ali. 1999. Opportunistic intestinal protozoal infections in immunocompromised children. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 29:951-961.
- Ok**, U.Z., Girginkardesler, N., Balcioglu, C., Ertan, P., Pirildar, T., Kilimcioğlu, A.A. 1999. Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *Am. J. Gastroenterol.* 94:3245-3247.
- Ok**, U.Z., M. Cirit, A. Uner, E. Ok, F. Akcicek, A. Basci, and M.A. Ozcel. 1997. Cryptosporidiosis and blastocystosis in renal transplant recipients. *Nephron.* 75:171-174.
- Osman**, M., Bories, J., El Safadi, D., Poirel, M.T., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delhaes, L., Hugonnard, M., Certad, G., Zenner, L., Viscogliosi, E. 2015. Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis sp.* and *Cryptosporidium spp.* in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Vet Parasitol.* 214:167-170.
- Östan**, I., Kilimcioğlu, A.A., Girginkardesler, N., Özyurt, B.C., Limoncu, M.E., Ok, U.Z., 2007. Health inequities: lower socio-economic conditions and higher incidences of intestinal parasites. *BMC Public Health.* 7:342.
- Özcakir**, O., Güreşer, S., Ergüven, S., Yilmaz, Y. A., Topaloğlu, R., Hascelik, G. 2007. Characteristics of *Blastocystis hominis* infection in a Turkish university hospital. *Turkiye Parazitol. Derg.* 31:277-282.

- Özyurt, M., Kurt, Ö., Mølbak, K., Nielsen, H.V., Haznedaroglu, T., Stensvold, C.R.** 2008. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey, *Parasitol. Int.* 57:300-306.
- Pakandl, M.,** 1991. Occurrence of *Blastocystis* sp. in pigs. *Folia Parasitol.* 38:297-301.
- Pakandl, M.,** 1992. An experimental transmission of porcine strains of *Blastocystis* sp. in the laboratory mice and gerbils. *Folia Parasitol.* 39:383-386.
- Pakandl, M.,** 1994. The prevalence of intestinal protozoa in wild and domestic pigs. *Vet. Med. (Praha).* 39:377-380.
- Parija, S.C., Jeremiah, S.** 2013. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop. Parasitol.* 3:17-25.
- Parkar, U., Traub, R.J., Kumar, S., Mungthin, M., Vitali, S., Leelayoova, S., Morris, K., Thompson, R.C.A.** 2007. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential, *Parasitology.* 134:359-367.
- Parkar, U., Traub, R.J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., Geurden, T., Steele, J., Drake, B., Thompson, R.C.** 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet. Parasitol.* 169:8-17.
- Pasqui, A.L., Savini, E., Saletti, M., Guzzo, C., Puccetti, L., Auteri, A.** 2004. Chronic urticaria and *Blastocystis hominis* infection: a case report. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 8:117-120.
- Pegelow, K., Gross, R., Pietrzik, K., Lukito, W., Richards, A.L., Fryauff, D.J.** 1997. Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 28:173-190.
- Perroncito, E.** 1899. Di un nuovo protozoa dell uomo e di talune specie animali. *G. Acad. Med. Torino.* 5:36-38.
- Petersen, A.M., Nielsen, H.V., Stensvold, C.R., Engberg, J.H., Friis-Møller, A., Nordgaard-Lassen, I., Wildt, S., Kroghfelt, K.A.** 2011. *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* in active and inactive Inflammatory Bowel Disease, *Gastroenterology* 140:S329-S330.
- Petersen, A.M., Stensvold, C.R., Mirsepasi, H., Engberg, J., Friis-Møller, A., Porsbo, L.J., Hammerum, A.M., Nordgaard-Lassen, I., Nielsen, H.V., Kroghfelt, K.A.** 2013. Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection, *Scand. J. Gastroenterol.* 48:638-639.
- Phillips, B.P., Zierdt, C.H.** 1976. *Blastocystis hominis*: pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. *Exp. Parasitol.* 39:358-364.



- Poirier, P.,** Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., Livrelli, V. 2011. 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.* 49:975-983.
- Poirier, P.,** Wawrzyniak, I., Vivare`s, C.P., Delbac, F., El Alaoui, H. 2012. New Insights into *Blastocystis* spp.: A Potential Link with Irritable Bowel Syndrome. *PLoS Pathog* 8(3): e1002545.
- Pritt, B.S.,** Clark, C.G. 2008. Amebiasis, *Mayo Clin. Proc.* 83:1154-1159.
- Puthia, M.K.,** Lu, J., Tan, K.S. 2008. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF- $\kappa$ B-dependent manner. *Eukaryot. Cell.* 7:435-443.
- Puthia, M.K.,** Vaithilingam, A., Lu, J., Tan, K.S. 2005. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol. Res.* 97:386-389.
- Quigley, E.M.,** Locke, G.R., Mueller-Lissner, S., Paulo, L.G., Tytgat, G.N., Helfrich, I., Schaefer, E. 2006. Prevalence and management of abdominal cramping and pain: a multinational survey. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24:411-419.
- Quilez, J.,** Clavel, A., Sanchez-Acedo, C., Causape, A.C. 1995. Detection of *Blastocystis* sp. in pigs in Aragon (Spain). *Vet Parasitol.* 56:345-348.
- Rajah Salim, R.H.,** Suresh, K.G., Vellayan, S., Mak, J.W., Khairul Anuar, A., Init, I., Vennila, G.D., Saminathan, R., Ramakrishnan, K. 1999. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitol. Res.* 85:1032-3.
- Reed, S.L.,** Keene, W.E., McKerrow, J.H. 1989. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 27:2772-2777.
- Rene, B.A.,** Stensvold, C.R., Badsberg, J.H., Nielsen, H.V. 2009. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80:588-92.
- Requena, I.,** Hernandez, Y., Ramsay, M., Salazar, C., Devera, R. 2003. Prevalence of *Blastocystis hominis* among food handlers from Caroni municipality, Bolivar State, Venezuela. *Cad. Saude Publica.* 19:1721-1727.
- Rivera, W.L.,** Tan, M.A., 2005. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates in the Philippines by ribotyping. *Parasitol. Res.* 96: 253-257.
- Roberts, T.,** Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J., Stark, D. 2011. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84:308-312.

- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J.** 2013. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Vet. Parasitol.* 196:85-89.
- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J.** 2014. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens.* 6:17.
- Sadek, Y., el-Fakahany, A.F., Lashin, A.H., el-Salam, F.A.** 1997. Intestinal parasites among food-handlers in Qualyobia Governorate, with reference to the pathogenic parasite *Blastocystis hominis*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 27:471-478.
- Sajid, M., McKerrow, J.H.** 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120:1-21.
- Saksirisampant, W., Nuchprayoon, S., Wiwanitkit, V., Yenthakam, S., Ampavasiri, A.** 2003. Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani province. *J. Med. Assoc. Thai.* 86(Suppl. 2): S263-S270.
- Saksirisampant, W., Prownebon, J., Kulkumthorn, M., Yenthakam, S., Janpla, S., Nuchprayoon, S.** 2006. Prevalence of intestinal parasitic infections among school children in the central region of Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 89:1928-1933.
- Sanpool, O., Laymanivong, S., Thanchomnang, T., Rodpai, R., Sadaow, L., Phosuk, I., Maleewong, W., Intapan, P.M.** 2017. Subtype identification of human *Blastocystis* spp. isolated from Lao People's Democratic Republic. *Acta Tropica.* 168: 37-40
- Santín, M., Gómez-Munoz, M.T., Solano-Aguilar, G., Fayer, R.** 2011. Development of a new PCR protocol to detect and sub-type *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol. Res.* 109:205-212.
- Scanlan, P.D.** 2012. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends in parasitology.* 28:327-334.
- Scanlan, P.D., Stensvold, C.R.** 2013. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest, *Trends Parasitol.* 29:523-529.
- Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G., De Vos, W.M., O'Toole, P.W., Cotter, P.D.** 2014. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota, *FEMS Microbiol. Ecol.* 90:326-330.
- Schmulson, M., Ortiz, O., Santiago-Lomeli, M., Gutierrez-Reyes, G., Gutierrez-Ruiz, M.C., Robles-Diaz, G., Morgan, D.** 2006. Frequency of functional bowel disorders among healthy volunteers in Mexico City. *Dig. Dis.* 24:342-347.
- Sciicluna, S.M., Tawari, B., Clark, C.G.** 2006. DNA barcoding of *Blastocystis*, *Protist.* 157:77-85.
- Seyer, A., Karasartova, D., Ruh, E., Güreser, A.S., Imir, T., Taylan-Ozkan, A.** 2016. Is dried stool spots on filter paper method (DSSFP) more sensitive and effective for

- detecting *Blastocystis* spp. and their subtypes by PCR and sequencing? Parasitol Res. 115(12):4449-4455.
- Singh, M., Suresh, K., Ho, L.C., Ng, G.C., Yap, E.H.** 1995. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. Parasitol Res.81:446-50.
- Sinniah, B., Rajeswari, B.** 1994. *Blastocystis hominis* infection, a cause of human diarrhea. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 25:490-493.
- Sio, S.W., Puthia, M.K., Lee, A.S., Lu, J., Tan, K.S.** 2006. Protease activity of *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 99:126-130.
- Snowden, K., Logan, K., Blozinski, C., Hoevers, J. and Holman, P.** 2000. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis* isolates from animal hosts. Parasitology Research 86, 62-66.
- Sohail, M.R., Fischer, P.R.** 2005. *Blastocystis hominis* and travelers. Travel. Med. Infect. Dis. 3:33-38.
- Solaymani-Mohammadi, S., Rezaian, M., Hooshyar, H., Mowlavi, G.R., Babaei, Z., Anwar, M.A.,** 2004. Intestinal protozoa in wild boars (*Sus scrofa*) in western Iran. J. Wildl. Dis. 40:801-803.
- Song, J.K., Hu, R.S., Fan, X.C., Wang, S.S., Zhang, H.J., Zhao, G.H.** 2017. Molecular characterization of *Blastocystis* from pigs in Shaanxi province of China. Acta Trop. 173:130-135.
- Souppart, L., Sanciu, G., Cian, A., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Capron, M., Dei-Cas, E., Boorom, K., Delhaes, L., Viscogliosi, E.** 2009. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. Parasitol. Res. 105: 413.
- Stanley, S.L. Jr** 2003. Amoebiasis. Lancet. 361:1025-1034.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Pérez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G.S., van der Giezen, M., Clark, C.G., Roger, A.J.** 2008. Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between and hydrogenosomes, Curr. Biol. 18: 580-585.
- Stensvold, C.R.** 2013. Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping, J. Clin. Microbiol. 51:190-194.
- Stensvold, C.R.** 2015. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. Trop. Parasitol. 5:3-5.
- Stensvold, C.R., Ahmed, U.N., Andersen, L.O., Nielsen, H.V.** 2012. Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal process controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis*, J. Clin. Microbiol. 50:1847-1851.
- Stensvold, C.R., Alfellani, M.A., Clark, C.G.** 2011. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. Infect. Genet. Evol. 12:263-273.

- Stensvold, C.R., Alfellani, M.A., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E.L., Maddox, C., Nielsen, H.V., Clark, C.G.** 2009. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int. J. Parasitol.* 39:473-479.
- Stensvold, C.R., Arendrup, M.C., Jespersgaard, C., Mølbak, K., Nielsen, H.V.** 2007a. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59:303-307.
- Stensvold, C.R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H.V., Arendrup, M.C.** 2006. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction, *J. Parasitol.* 92:1081-1087.
- Stensvold, C.R., Christiansen, D.B., Olsen, K.E.P., Nielsen, H. V.** 2011. *Blastocystis* sp. Subtype 4 is Common in Danish *Blastocystis*-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84:883-885.
- Stensvold, C.R., Clark C.G.** 2016. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol. Int.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>
- Stensvold, C.R., Lebbad, M., Verweij, J.J., Jespersgaard, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Nielsen, S.S., Nielsen, H.V.** 2010. Identification and delineation of members of the *Entamoeba* complex by pyrosequencing, *Mol. Cell. Probes* 24:403-406.
- Stensvold, C.R., Lewis, H.C., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J., Nielsen, S.S., Olsen, K.E.P., Arendrup, M.C., Nielsen, H.V., Mølbak, K.** 2009a. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol. Infect.* 137:1655-1663.
- Stensvold, C.R., Nielsen, H.V., Mølbak, K., Smith, H.V.** 2009b. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis*: diagnostic limitations, *Trends Parasitol.* 25:23-29.
- Stensvold, C.R., Smith, H.V., Nagel, R., Olsen, K.E., Traub, R.J.** 2010. Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: reality or delusion? *J. Clin. Gastroenterol.* 44:85-90.
- Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S.W., Thompson, R.C.A., Traub, R.J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., Clark, C.G.,** 2007b. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends Parasitol.* 23, 93-96.
- Stenzel, D.J.** 1995. Ultrastructural and cytochemical studies of *Blastocystis* sp. Ph.D. thesis. Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.
- Stenzel, D.J., Boreham P.F.** 1991. A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *Int. J. Parasitol.* 21:613-5.
- Stenzel, D.J., Boreham P.F.** 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:563-584.

- Stenzel, D.J., Boreham, P.F., McDougall, R.** 1991. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *Int. J. Parasitol.* 21:807-12.
- Stenzel, D.J., Dunn L.A., Boreham, P.F.L.** 1989. Endocytosis in cultures of *Blastocystis hominis*. *Int. J. Parasitol.* 19:787-791.
- Stenzel, D.J., Lee, M.G., Boreham, P.F.** 1997. Morphological differences in *Blastocystis* cysts-an indication of different species? *Parasitol Res.* 83:452-7.
- Suresh, K., Chong, S. Y., Howe, J., Ho, L. C., Ng, G. C., Yap, E. H., Singh, M.** 1995. Tubulovesicular elements in *Blastocystis hominis* from the caecum of experimentally-infected rats. *Int. J. Parasitol.* 25:123-126.
- Suresh, K., Salim, H.R., Jamaiah, I., Anuar, A.K.,** 2001. *Blastocystis hominis* in high-rise flat dwellers in Kuala Lumpur, Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95:377-378.
- Suresh, K., Smith, H.** 2004. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23:509-511.
- Svensson, R.** 1935. Studies on human intestinal protozoa, especially with regard to their demonstrability and the connection between their distribution and hygienic conditions. *Acta. Med. Scand.* 1935;(Suppl 70):1-115.
- Swayne, J.G.** 1849. An account of certain organic cells peculiar to the evacuations of cholera. *Lancet* ii:368-371.
- Taamasri, P., Mungthin, M., Rangsri, R., Tongupprakarn, B., Areekul, W., Leelayoova, S.** 2000. Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 31:112-117.
- Tan, H.K., Zierdt, C.H.** 1973. Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. *Z. Parasitenkd.* 42:315-324.
- Tan, K.S.** 2004. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet. Parasitol.* 126:121-144.
- Tan, K.S., Mirza, H., Teo, J.D., Wu, B., Macary, P.A.** 2010. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12:28-35.
- Tan, K.S., Nasirudeen, A.M.** 2005. Protozoan programmed cell death: Insights from *Blastocystis* deathstyles. *Trends Parasitol.* 21:547-50.
- Tan, K.S., Ng, G.C., Quek, E., Howe, J., Ramachandran, N.P., Yap, E.H., Singh, M.** 2000. *Blastocystis hominis*: a simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. *Exp. Parasitol.* 96:9-15.
- Tan, S.W.** 2008. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:639-665.

- Tan, S.W., Singh, M., Thong, K.T., Ho, L.C., Moe, K.T., Chen, X.Q., Ng, G.C., Yap, E. H.** 1996. Clonal growth of *Blastocystis hominis* in soft agar with sodium thioglycollate. *Parasitol. Res.* 82:737-739.
- Tan, T.C., Suresh, K.G.** 2006a. Amoeboid form of *Blastocystis hominis*-A detailed ultrastructural insight. *Parasitol Res.* 99:737-42
- Tan, T.C., Suresh, K.G.** 2006b. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol. Res.* 98:189-93.
- Tan, T.C., Tan, P.C., Sharma, R., Sugnaseelan, S., Kumar, G.S.** 2013. Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia. *Parasitol. Res.* 112:85-89.
- Tan, T.C., Tan, P.C., Sharma, R., Sugnaseelan, S., Suresh, K.G.** 2013. Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia. *Parasitol Res.* 112:85-89.
- Tanizaki, A., Yoshikawa, H., Iwatani, S., Kimata, I.** 2005. Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. *Parasitol. Res.* 96:57-61.
- Tasova, Y., Sahin, B., Koltas, S., Paydas, S.** 2000. Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. *Acta Med. Okayama.* 54:133-136.
- Tellevik, M.G., Moyo, S.J., Blomberg, B., Hjøllø, T., Maselle, S.Y., Langeland, N., Hanevik, K.** 2015. Prevalence of *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* among young children with and without diarrhea in Dar es Salaam, Tanzania, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015) e0004125.
- Termmathurapoj, S., Leelayoova, S., Aimpun, P., Thathaisong, U., Nimmanon, T., Taamasri, P., Mungthin, M.** 2004. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol. Res.* 93:445-447.
- Thathaisong, U., Worapong, J., Mungthin, M., Tan-Ariya, P., Viputtigul, K., Sudatis, A., Noonai, A., Leelayoova, S.** 2003. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *J. Clin. Microbiol.* 41:967-975.
- Tungtrongchitr, A., Manatsathit, S., Kositchaiwat, C., Ongrotchanakun, J., Munkong, N., Chiabutr, P., Leelakusolvong, S., Chaicumpa, W.** 2004. *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 35:705-710.
- Van der Veek, P.P., van den Berg, M., de Kroon, Y.E., Verspaget, H.W., Masclee, A.A.** 2005. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 100:2510-2516.
- Van Saanen-Ciurea, M., El Achachi, H.E.** 1985. *Blastocystis hominis*: culture and morphological study. *Experientia* 41:546.

- Vassalos, C.M., Papadopoulou, C., Vakalis, N.C.** 2008. Blastocystosis: an emerging or re-emerging potential zoonosis? *Vet. Ital.* 44:679-84.
- Vassalos, C.M., Spanakos, G., Vassalou, E., Papadopoulou, C., Vakalis, N.** 2010. Differences in clinical significance and morphologic features of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Am. J. Clin. Pathol.* 133:251-8.
- Vdovenko, A.A.,** 2000. *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitol. Res.* 86, 8-10.
- Vennila, G.D., Kumar, G.S., Anuar, A.K., Rajah, S., Saminathan, R., Sivanandan, S., Ramakrishnan, K.** 1999. Irregular shedding of *Blastocystishominis*, *Parasitol. Res.* 85:162-164.
- Verweij, J.J., Stensvold, C.R.** 2014. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections, *Clin. Microbiol. Rev.* 27:371-418.
- Vogelberg, C., Stensvold, C.R., Monecke, S., Ditzen, A., Stopsack, K., Heinrich-Gräfe, U., Pöhlmann, C.** 2010. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol. Int.* 59:469-71.
- Walderich, B., Bernauer, S., Renner, M., Knobloch, J., Burchard, G.D.** 1998. Cytopathic effects of *Blastocystis hominis* on Chinese hamster ovary (CHO) and adeno carcinoma HT29 cell cultures. *Trop. Med. Int. Health* 3:385-390.
- Wang W., Bielefeldt-Ohmann, H., Traub, R.J., Cuttall, L., Owen, H.** 2014a. Location and pathogenic potential of *Blastocystis* in the porcine intestine, *PLoS One.* 9. e103962.
- Wang, W., Owen, H., Traub, R.J., Cuttall, L., Inpankaew, T., Bielefeldt-Ohmann, H.** 2014b. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia, *Vet. Parasitol.* 203 (2014) 264-269.
- Wilson, S., Roberts, L., Roalfe, A., Bridge, P., Singh, S.** 2004. Prevalence of irritable bowel syndrome: a community survey. *Br. J. Gen. Pract.* 54:495-502.
- Wong, K.H., Ng, G.C., Lin, R.T., Yoshikawa, H., Taylor, M.B., Tan, K.S.W.** 2008. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore, *Parasitol. Res.* 102:663-670.
- Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M.A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., Khan, R.** 2010. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* 106:1033-1038.
- Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Khan, R., Islam, M., Beg, M.A., Zaman, V.** 2004. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70:383-385.

- Yan, Y., S. Su, R. Lai, H. Liao, J. Ye, X. Li, X. Luo, and G. Chen.** 2006. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol. Res.* 99:597–601.
- Yan, Y., Su, S., Ye, J., Lai, X., Lai, R., Liao, H., Chen, G., Zhang, R., Hou, Z., Luo, X.** 2007. *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitol. Res.* 101:1527-1532.
- Yoshikawa H., Masaharu, T., Takehiro, N., Shunsuke, A., Asih, PB., Rozi IE., Syafruddin D.** 2016. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol. Int.* 65:780-784.
- Yoshikawa, H., Abe, N., Wu, Z.** 2004. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology.* 150: 1147-1151.
- Yoshikawa, H., Dogruman-Al, F., Turk, S., Kustimur, S., Balaban, N., Sultan, N.** 2011. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol. Res.* 109:1045-1050.
- Yoshikawa, H., Nagano, I., Wu, Z., Yap, E., Singh, M., Takahashi, Y.** 1998. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Molecular and Cellular Probes.* 12:153-159.
- Yoshikawa, H., Nagano, I., Yap, E., Singh, M., Takahashi, Y.** 1996. DNA Polymorphism revealed by arbitrary primers polymerase chain reaction among *Blastocystis* strains isolated from humans, a chicken, and a reptile. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 43:127-130.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I.K.M., Hossain, M.B., Zaman, V., Haque, R., Takahashi, Y.** 2004b. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries, *Parasitol. Res.* 92:22-29.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Pandey, K., Pandey, B.D., Sherchand, J.B., Yanagi, T., Kanbara, H.** 2009. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol.* 160:295-300.
- Yoshikawa, H., Yamada, M., Yoshida, Y.** 1988. Freeze-fracture study of *Blastocystis hominis*. *J. Protozool.* 35:522-528.
- Yoshikawa, H., Yoshida, K., Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S., Kimata, I.** 2004a. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol. Res.* 94:391-396.
- Yoshikawa, T.** 1988. Fine structure of *Blastocystis hominis* Brumpt, 1912. *J. Kyoto Prefect. Univ. Med.* 97:1483-1500.



- Zali**, M.R., Mehr, A.J., Rezaian, M., Meamar, A.R., Vaziri, S., Mohraz, M. 2004. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV positive individuals in Iran. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:268-270.
- Zaman**, V. 1996. The diagnosis of *Blastocystis hominis* cysts in human faeces. *J. Infect.* 33:15-16.
- Zaman**, V., Howe, J., Ng, M. 1995. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol. Res.* 81:465-469.
- Zaman**, V., Howe, J., Ng, M. 1998. Scanning electron microscopy of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol. Res.* 84:476-7.
- Zaman**, V., Khan, K. Z. 1994. A concentration technique for obtaining viable cysts of *Blastocystis hominis* from faeces. *J. Pak. Med. Assoc.* 44:220-221.
- Zhang** X., Qiao, J.Y., Zhou, X.J., Yao, F.R., Wei, Z.C. 2007. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and *in vitro*. *Parasitol. Res.* 101:43-51.
- Zhang**, X., Qiao, J.Y., Dong, X.H., Li, Y.Q., Li, X.Q., Li, C. 2003. Study on morphology of *Blastocystis hominis* in culture and from diarrhea patients. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 21:116-8.
- Zhang**, X., Qiao, J.Y., Wu, X.M., Da, R., Zhao, L.M., Wei, Z.C. 2012b. *In vitro* culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *Int. J. Inf. Dis.* 16:23-28.
- Zhang**, X., Zhang, S., Qiao, J., Wu, X., Zhao, L., Liu, Y., et al. 2012a. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* 110:1165-72.
- Zierdt**, C.H. 1973. Studies of *Blastocystis hominis*. *J. Protozool.* 20:114-121.
- Zierdt**, C.H. 1988. *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. *Parasitol. Today* 4:15-17.
- Zierdt**, C.H. 1991. *Blastocystis hominis*-past and future. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:61-79.
- Zierdt**, C.H., Rude W.S., Bull, B.S. 1967. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *Am. J. Clin. Pathol.* 48: 495-501.
- Zierdt**, C.H., **Tan**, H.K. 1976a. Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. *Z. Parasitenkd.* 50:277-283.
- Zierdt**, C.H., **Tan**, H.K. 1976b. Endosymbiosis in *Blastocystis hominis*. *Parasitol.* 39:422-430.

**Zierdt**, C.H., Zierdt, W.S., Nagy, B. 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections, J. Parasitol. 81:127-129.