



Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa
i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej

mgr inż. Monika Rudzińska

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Badania nad występowaniem i zróżnicowaniem genotypowym
Blastocystis izolowanych od ludzi i wybranych grup zwierząt
w województwie pomorskim**

**Studies on the occurrence and genotypic diversity of
Blastocystis isolated from humans and selected groups of
animals in the Pomeranian Voivodeship**

Praca wykonana pod kierunkiem
dr hab. n. med. Beaty Szostakowskiej
w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej GUMed

Gdańsk, grudzień 2021

Słowa kluczowe w j. polskim:

Blastocystis, ludzie, zwierzęta, transmisja, epidemiologia molekularna, Polska

Key words: *Blastocystis*, humans, animals, transmission, molecular epidemiology, Poland

Podziękowania

Wszystkim współautorom publikacji, osobom, które wzięły udział w badaniach oraz osobom, które zaangażowały się w pomoc w pozyskiwaniu materiału do badań, dziękuję serdecznie za współpracę, za Wasz indywidualny wkład, za każdego dodanego „puzzelka”, co zaowocowało treścią publikacji składających na moją rozprawę doktorską.

Szczególne podziękowania składam:

Pani dr hab. **Beacie Szostakowskiej** – promotorowi mojej pracy doktorskiej, za opiekę naukową i cenne uwagi przy realizacji niniejszej pracy, ale przede wszystkim za życzliwość, wyrozumiałość i poświęcony czas.

Panu **Michałowi Targowskiemu** – dyrektorowi Gdańskiego Ogrodu Zoologicznego, za życzliwość i wyrażenie zgody na współpracę.

Pani **Beacie Kowalewskiej** za gotowość pomocy i „towarzyszenie” w każdym etapie tej swoistej przygody.

rozprawę dedykuje

moim Rodzicom,

mojemu Darkowi

CYKL PRAC NAUKOWYCH BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rudzińska M., Kowalewska B., Sikorska K. **Diagnostyka laboratoryjna zarażeń *Blastocystis* – wyzwania i kontrowersje.** Diagn. Lab. 2020: 56, 1, 27-34. DOI:10.5604/01.3001.0014.3610; praca pogładowa/przeglądowa.

Punktacja MNiSW: 20 pkt.

Kowalewska B., Rudzińska M., Zarudzka D., Kotłowski A. **Ocena częstości zarażeń pasożytami jelitowymi wśród pacjentów przychodni Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni w okresie ostatnich 30 lat.** Diagn. Lab. 2013: 49, 1, 9-15; praca oryginalna.

Punktacja MNiSW: 3 pkt.

Rudzińska M., Kowalewska B., Wąż P., Sikorska K., Szostakowska B. ***Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland – a single center study.** Infect. Genet. Evol. 2019: 75, 1-6; DOI:10.1016/j.meegid.2019.103926; praca oryginalna.

Punktacja MNiSW: 100 pkt.; IF: 2.773

Rudzińska M., Kowalewska B., Grzybek M., Sikorska K., Świątalska A. **First report on the occurrence and subtypes of *Blastocystis* in pigs in Poland using sequence-tagged-site PCR and barcode region sequencing.** Pathogens 2020: 9, 7, 1-14. DOI:10.3390/pathogens9070595; praca oryginalna.

Punktacja MNiSW: 100 pkt.; IF: 3.492

Rudzińska M., Kowalewska B., Waleron M., Kalicki M., Sikorska K., Szostakowska B. **Molecular characterization of *Blastocystis* from animals and their caregivers at the Gdańsk Zoo (Poland) and the assessment of zoonotic transmission.** Biology 2021, 10, 10, 1-18. DOI: 10.3390/biology10100984; praca oryginalna.

Punktacja MNiSW: 100 pkt.; IF: 5.079

Łącznie punktacja za cykl 5 publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi **MNiSW: 323 pkt.; IF: 11.344.**

ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

**NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
PRZY GDAŃSKIM UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a**

Sekretariat: tel. 58/349-10-11, fax 58/349-11-70, Przewodniczący tel. 58/349-12-60

=====
NKBBN/334/2017

Gdańsk, 2017-09-11

Pani Profesor
Dr hab. med. Joanna Stańczak
Kierownik Katedry Medycyny Tropikalnej
i Parazytologii
oraz Zakładu Parazytologii Tropikalnej
Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

W odpowiedzi na zgłoszenie badań z dnia 30.06.2017r. na temat:
„Trzoda chlewna i zwierzęta towarzyszące człowiekowi jako potencjalny rezerwuuar inwazji *Blastocystis* u ludzi w Polsce” (praca doktorska mgr inż. Moniki Rudzińskiej planowana do przeprowadzenia pod kierunkiem promotora dr hab. Beaty Szostakowskiej we współpracy z Zakładem Medycyny Tropikalnej i Epidemiologii GUMed) - Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym na posiedzeniu w dniu 7 września 2017 roku zapoznała się z powyższym projektem pracy i wyraża zgodę na jej prowadzenie w zakresie przedstawionym we wniosku, gdyż są to badania poznawcze, nie budzące zastrzeżeń natury etycznej.

Niniejsza zgoda jest ważna do 31 grudnia 2020 roku, zgodnie z planowanym przez badacza terminem zakończenia ww. badań.

**NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA
DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
PRZY GDANSKIM UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a
tel. 58 349 10 11, fax 58 349 11 70**

PRZEWODNICZĄCY
Niezależnej Komisji Bioetycznej
do Spraw Badań Naukowych

prof. dr hab. med. Stefan Ruszczyk

SPIS TREŚCI

CYKL PRAC NAUKOWYCH BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	5
ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ	6
1. WPROWADZENIE	8
1.1 Historia i taksonomia	9
1.2 Nazewnictwo	12
1.3 Patogeniczność.....	13
1.4 Występowanie <i>Blastocystis</i> u ludzi	16
1.5 Cykl życiowy i transmisja	17
1.6 Budowa morfologiczna	19
1.7 Diagnostyka zarażeń <i>Blastocystis</i>	19
1.8 Zmienność genetyczna <i>Blastocystis</i> ; podział na podtypy	21
1.9 Epidemiologia i zoonotyczny potencjał <i>Blastocystis</i>	22
2. Cel pracy.....	27
3. Materiały i Metody	28
4. OMÓWIENIE PRAC ORYGINALNYCH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ (cel, wyniki, wnioski)	30
Praca „Ocena częstości zarażeń pasożytami jelitowymi wśród pacjentów przychodni Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni w okresie ostatnich 30 lat”	31
Praca “ <i>Blastocystis</i> subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland- A single center study”	33
Praca “First Report on the Occurrence and Subtypes of <i>Blastocystis</i> in Pigs in Poland Using Sequence-Tagged-Site PCR and Barcode Region Sequencing”	36
Praca “Molecular characterization of <i>Blastocystis</i> from animals and their caregivers at the gdańsk zoo (poland) and the assessment of zoonotic transmission”	39

5. KOPIE PRAC NAUKOWYCH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ ORAZ OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	41
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	93
7. ZAŁĄCZNIK – „Występowanie <i>Blastocystis</i> u zwierząt towarzyszących i ich właścicieli” (manuskrypt w przygotowaniu)	97
7.1 Wprowadzenie	97
7.2 Materiał i metody	97
7.3 Wyniki i dyskusja	101
7.4 Podsumowanie i wstępne wnioski	107
8. STRESZCZENIE W J. POLSKIM	108
9. STRESZCZENIE W J. ANGIELSKIM	111
10. PIŚMIENNICTWO	114

1. WPROWADZENIE

Blastocystis to beztlenowe eukariotyczne mikroorganizmy bytujące w jelitach ludzi i wielu gatunków zwierząt (naczelnie, inne ssaki, ptaki, gady, płazy, ryby, skorupiaki, pijawki, owady) (Farah Haziqah i in., 2017; France i in., 2020; Hublin i in., 2021; Martínez-Barbabosa i in., 2018; Stenzel i Boreham, 1996; Yoshikawa i in., 2016). Liczne doniesienia pokazują, że *Blastocystis* są najczęściej wykrywanymi eukariontami w próbkach kału ludzi na całym świecie z przewagą w krajach/społecznościach o niskich standardach sanitarno-higienicznych. Szacuje się, że nawet 1 mld ludzi na świecie jest zarażonych *Blastocystis* (Stensvold i Clark, 2016). Organizmy te wykazują wysokiego stopnia zmienność genetyczną i na podstawie różnic w sekwencji genu kodującego małą podjednostkę rRNA (SSU rRNA; ang. *small subunit ribosomal RNA*) zostały podzielone na 25 grup genetycznych zwanych podtypami (ST; ang. *subtype*) (Maloney i Santin, 2021; Stensvold i Clark, 2020). Wiele kwestii związanych z *Blastocystis* między innymi takich jak cykl życiowy, sposób transmisji drobnoustroju czy rola w rozwoju objawów chorobowych – pomimo upływu ponad 100 lat od jego odkrycia – nie zostało wyjaśnionych. Wyzwaniem jest zarówno diagnostyka, jak i leczenie blastocystozy (Bogoch i in., 2006; Coyle i in., 2012; Dogruman-Al i in., 2010; Roberts i in., 2014b; Stensvold i in., 2009). Badania epidemiologiczne nad zarażeniem zwierząt wykazały wysoką częstość zarażenia u naczelnych, świń, bydła (w tym udomowionych przeżuwaczy) i ptaków (Hublin i in., 2021; Nemati i in., 2021). Często zwierzęta i mający z nimi kontakt ludzie zarażeni są tymi samymi podtypami, a pojedyncze badania wykazały identyczne sekwencje *Blastocystis* izolowanych od zwierząt i od ludzi, co zrodziło podejrzenie zoonotycznego charakteru zarażeń *Blastocystis* u ludzi (Greige i in., 2018; Nagel i in., 2012; Parkar i in., 2010, 2007; Pintong i in., 2018; C. Stensvold i in., 2009; Thathaisong i in., 2003; Wenqi Wang i in., 2014; Yoshikawa i in., 2009). Jednak nie można też wykluczyć odwrotnej transmisji tzn. człowiek-zwierzę (Iguchi i in., 2007; Pakandl i in., 1993).

Blastocystoza ludzi stanowi nierozwiązany problem zdrowotny, w Polsce potęgowany tym, że zagadnienia związane z zarażeniem *Blastocystis* są często niedoceniane albo wręcz nieznane nawet w środowisku medycznym (Kotłowski, 2012;

Kurt i in., 2016; Rajamanikam i in., 2019; Roberts i in., 2014a; Subirats i Borrás, 2018). W Polsce badania związane z *Blastocystis* i blastocystozą prowadzone były dotychczas wrywkowo i dotyczyły niewielkich grup pacjentów (Duda i in., 2015; Kaczmarek i in., 2017; Kotłowski, 2012; Lepczyńska i in., 2016; Wesołowska i in., 2016), a te dotyczące kolonizacji zwierząt przez *Blastocystis* przedstawiane były przeważnie tylko na doniesieniach zjazdowych (Kaczmarek i in., 2020, 2019; Lewicki i in., 2016; Wesołowska i in., 2019). Dostępne dane literaturowe na temat zarażenia ludzi i zwierząt pochodzą przede wszystkim z innych rejonów geograficznych świata.

Celem pracy było poszerzenie wiedzy na temat epidemiologii drobnoustroju poprzez rozpoznanie występowania i zróżnicowania genetycznego *Blastocystis* izolowanych od ludzi i wybranych grup zwierząt w województwie pomorskim.

1.1 HISTORIA I TAKSONOMIA

Organizmy *Blastocystis* prawdopodobnie zostały dostrzeżone już w 1849 roku podczas epidemii cholery w Londynie (Jeremiah i Parija, 2013). Jako odrębny jednokomórkowy organizm obecny w jelitach jaszczurek i pijawek zostały opisane po raz pierwszy w 1911 roku przez Alexieffa, a 1912 przez Brumpta (niezależnie), którzy w oparciu o technikę mikroskopii świetlnej zaklasyfikowali je do grzybów drożdżopodobnych i nadali nazwy, odpowiednio: *Blastocystis enterocola* (Zierdt, 1991) i *Blastocystis hominis* (ta druga była skutkiem tego, że Brumpt badał próbki kału pochodzące od ludzi) (Dunn i in., 1989). To początkowe przypisanie drobnoustroju do grzybów drożdżopodobnych miało uzasadnienie w wyglądzie komórek, które w świeżych mikroskopowych rozmazach kału przypominały komórki drożdży, nie posiadały pseudopodiów i nie wykazywały żadnych oznak poruszania się, a jądra w niewybarwionych mokrych preparatach mikroskopowych nie były widoczne. Ponadto nie znano formy cysty, a formy ameboidalne także nie były rozpoznawane. Podział podwójny komórek, który błędnie uznano za pączkowanie, odpowiadał sposobowi rozmnażania grzybów drożdżopodobnych. Przez innych badaczy *Blastocystis* był także określany jako zdegenerowane postaci lub cysty wiciowców, takich jak *Trichomonas intestinalis*, *Chilomastix mesnili* czy *Endolimax nana* lub jako zdegenerowany materiał/element roślinny (Zierdt i in., 1967). W toku dalszych obserwacji struktury

morfologicznej i fizjologii *Blastocystis* okazało się, że organizm ten nie posiada wielu cech właściwych organizmom grzybów, np. nie posiada ściany komórkowej, ma natomiast jedno lub kilka jąder komórkowych, gładkie i szorstkie retikulum endoplazmatyczne, kompleks Golgiego i organelle mitochondrialne (MLO; ang: *mitochondrion-like-organelle*). Ponadto okazało się, że *Blastocystis* jest niewrażliwy na środki przeciwgrzybicze i nie wzrasta na podłożach stosowanych do hodowli grzybów. Te i inne morfologiczne i fizjologiczne cechy drobnoustroju odpowiadające bardziej organizmom pierwotniaków niż grzybów (tab.1) spowodowały, że w roku 1967 *Blastocystis* został przypisany do królestwa Protozoa (najpierw do podtypu Sporozoa, a później przeklasyfikowany do podtypu Sarcodina), zaś w 1985 roku do królestwa Protista (Zierdt, 1991; Zierdt i in., 1967).

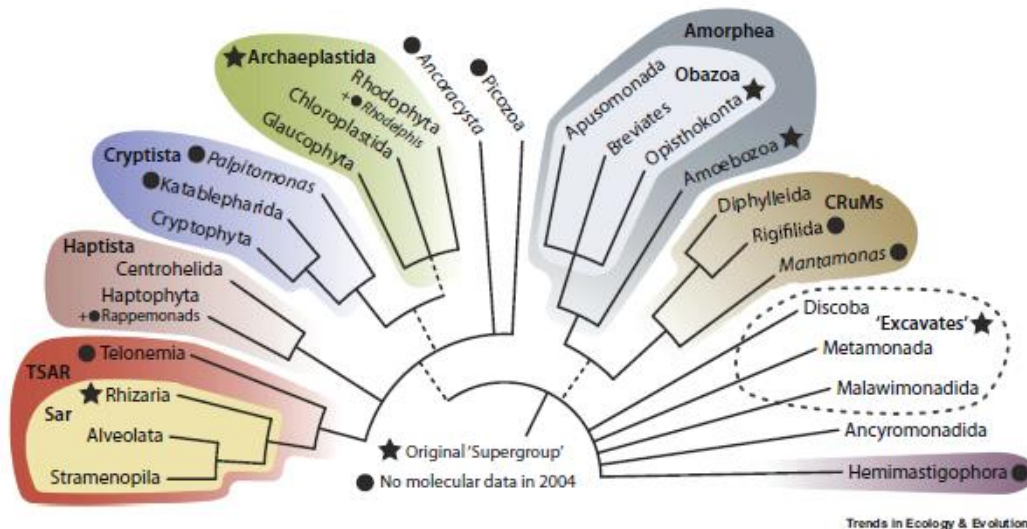
Tabela 1 Morfologiczne i fizjologiczne cechy *Blastocystis*, które spowodowały, że został przeklasyfikowany z królestwa grzybów do królestwa Protozoa (Zierdt i in., 1967).

TABLE 1. Characteristics used to reclassify *B. hominis* from the fungi to the protozoa

Characteristic	Yeast	<i>B. hominis</i>
Strict anaerobe	No	Yes
No growth on fungal or bacteriological media	No	Yes
Growth on media developed for intestinal protozoa	No	Yes
No growth on surface of solid media	No	Yes
Requires presence of bacteria for growth; axenic growth achieved slowly under carefully controlled conditions	No	Yes
Capable of ingesting bacteria and other particulate matter	No	Yes
Cultures die in 2-3 days at 22°C or overnight at 4°C	No	Yes
No growth below 33°C, but cell death at 30°C	No	Yes
Optimal growth at 37°C	No	Yes
Optimal growth at neutral pH	No	Yes
No growth at pH 5.5	No	Yes
Resistant to 400 µg of amphotericin per ml	No	Yes
Sensitive to drugs effective against intestinal protozoa	No	Yes
No cell wall	No	Yes
Reproduction by endodyogony, schizogony, binary fission, and plasmotomy (cutting off) individual <i>B. hominis</i> from the ameba form	No	Yes
No budding	No	Yes
Supports stable bacterial endosymbiont (an obligate mutualism)	No	Yes
Slow-feeding pseudopods	No	Yes
Rapid locomotion pseudopods	No	Yes
Limiting membrane with micropinocytotic vesicles	No	Yes
Membrane-bound CB, a reproductive organelle, formerly called vacuole	No	Yes
Mitochondria in all cells; mitochondria show a general morphology similar to that in other protozoa, with short saccate cristae when in the resting mode	No	Yes

Dopiero zapoczątkowany w latach 90. XX w. intensywny rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na badanie powinowactwa filogenetycznego różnych eukariontów (przez porównanie sekwencji genu SSU rRNA). Analiza częściowej sekwencji SSU rRNA *Blastocystis* wykazała, że nie jest on monofiletyczny ani z drożdżami *Saccharomyces*, ani grzybami *Neurospora*, ani z Sarcodina czy Sporozoa, i że

prawdopodobnie należy go umieścić w zewnętrznej grupie pomiędzy orzęskami i Apicomplexa. W roku 1996 w oparciu o analizę sekwencji w pełnym genie SSU rRNA *Blastocystis* został umieszczony w grupie Stramenopila (nazywanej także Heteroconta) w królestwie Chromista (Silberman i in., 1996) (zgodnie z podziałem świata organizmów na 6 królestw: Bacteria, Protozoa, Animalia, Fungi, Plantae i Chromista) (Cavalier-Smith, 1998), a następnie w królestwie Chromalveolata przedstawionym w 2004 roku przez tego samego badacza jako udoskonalenie królestwa Chromista (Cavalier-Smith, 2004). Obecnie, w zrewidowanej klasyfikacji eToL (ang. *eucariotic Tree of Life*) będącej wynikiem szerokiego stosowania filogenetyki molekularnej, Stramenopila są częścią SAR wraz z Alveolata i Rhizaria, stąd skrót SAR (ryc. 1) (Burki i in., 2020).



Rycina 1 Pozycja taksonomiczna Stramenopila w zrewidowanej klasyfikacji eToL (Burki i in., 2020).

Grupa Stramenopila obejmuje liczne (około 30 tys. gatunków) i bardzo różnorodne organizmy: jednokomórkowe i wielokomórkowe, heterotroficzne i fotosyntetyczne m.in. śluzowce, okrzemki czy glony. Przedstawiciele rodzaju *Blastocystis* nie mają pewnych cech typowych dla większości Stramenopila, bowiem nie posiadają wici pokrytych maleńkimi, trójdzielnymi glikoproteinowymi wyrostkami/włoskami zwanymi mastigonemami (lub stramenopili) i są beztlenowcami, a ponadto jako jedyne spośród Stramenopila żyją w przewodzie pokarmowym człowieka oraz wielu zwierząt

(Silberman i in., 1996; Tan, 2008). Te złożone przyczyny spowodowały, że identyfikacja afiliacji taksonomicznej *Blastocystis* trwała tak długo. Aktualna klasyfikacja *Blastocystis* przedstawiana jest następująco:

Eukaryota; Sar; Stramenopila; Bigyra; Opalozoa; Opalinata; Blastocystidae; *Blastocystis* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>).

1.2 NAZEWNICTWO

Zmianom ulegało także nazewnictwo *Blastocystis*. Przez prawie 100 lat klasyfikacja gatunkowa opierała się na gospodarzu, z którego izolowano szczep (stąd szczepy izolowane od ludzi nazywano *B. hominis*, od szczurów – *B. ratti*, drobiu – *B. galinae* itd.), co wynikało z silnego przekonania, że istnieją różne – choć morfologicznie identyczne – gatunki odrębne dla ludzi i charakterystyczne dla zwierząt (Tan, 2008). Zastosowanie do badań technik molekularnych ujawniło, że organizmy te wykazują znaczne zróżnicowanie genetyczne w obrębie SSU rRNA, które wg. Noela jest wystarczające, aby uznać je za odrębne gatunki (Noël i in., 2005). W oparciu o te różnice *Blastocystis* podzielono na grupy genetyczne dziś nazywane podtypami (szerzej opisane w rozdziale 1.8 Zmienność genetyczna *Blastocystis*; podział na podtypy oraz rozdziale 1.9 Epidemiologia i zoonotyczny potencjał *Blastocystis*). Początkowo jednak badacze, stosując różne techniki molekularne, nadawali różne nazwy tym samym izolatom (ang: *clade*, *cluster*, *genotype*, *group*, *ribodeme*, *subgroup*, *subtype*), co powodowało coraz większy zamęt (Clark i in., 2013). Wobec niejednolitego nazewnictwa, konieczne stało się jego uporządkowanie – i tak, od 2007 roku wszystkie izolaty *Blastocystis* pochodzące od ludzi, innych ssaków i ptaków nazywa się *Blastocystis*, po czym następuje numer podtypu (np. *Blastocystis* ST1 itd.) (Stensvold i in., 2007), o ile podtyp został w danym badaniu określony.

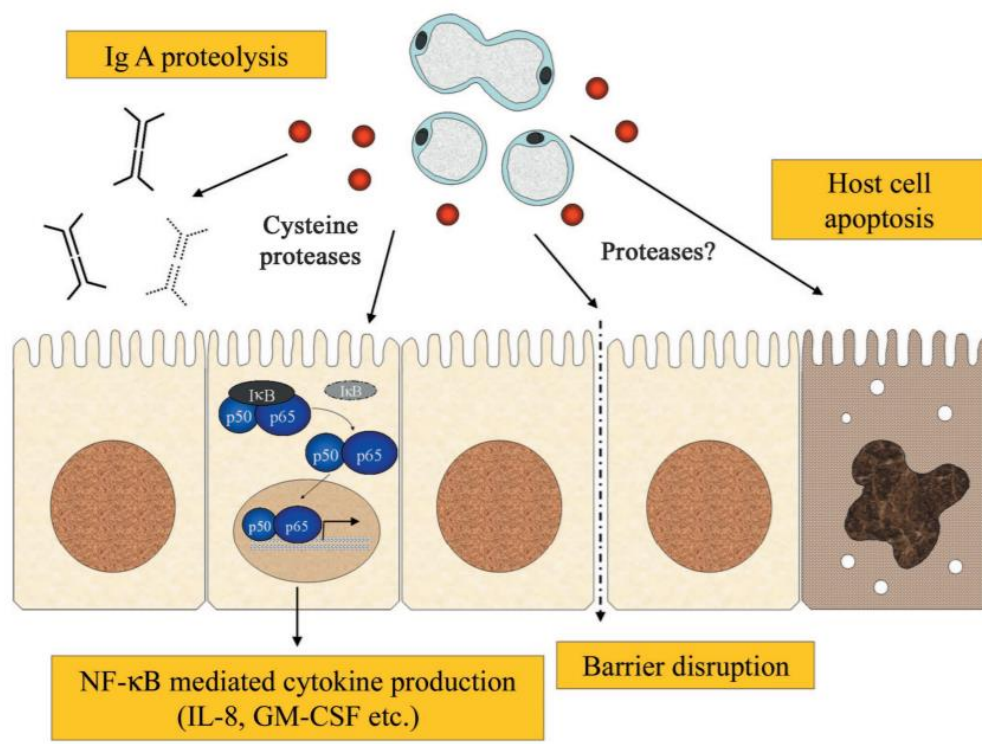
Jedynie w przypadku *Blastocystis* izolowanych od gadów, płazów i bezkręgowców utrzymują się nazwy dwumianowe. Dzieje się tak, ponieważ do tej pory podjęto niewiele badań nad różnorodnością i zakresem żywicieli tych *Blastocystis*, a zatem nie było takiego impulsu do zmiany nomenklatury, jak w przypadku *Blastocystis* izolowanych od ptaków i ssaków. Być może w toku dalszych badań nomenklatura

Blastocystis izolowanych od tych zwierząt będzie wymagała podobnych zmian (Stensvold i Clark, 2016).

1.3 PATOGENICZNOŚĆ

Do dziś nie została ustalona patogeniczność *Blastocystis*. Początkowo uznawano go za organizm komensalny. Jeszcze w latach 80. XX w. uważano, że inwazje *Blastocystis* mają charakter bezobjawowy i nie odgrywają roli w patogenezie chorób przewodu pokarmowego. Jednak późniejsze obserwacje kliniczne osób zarażonych, które zgłaszały dolegliwości, najczęściej takie jak brak apetytu, nudności, luźne stolce i bóle brzucha o różnym nasileniu, a także nadmierna produkcja gazów, wzdęcia i zaparcia sugerowały, że może być on patogenem (Dagci i in., 2014; Domínguez-Márquez i in., 2009; Jelinek i in., 1997; Jones i in., 2009; Sadaf i in., 2013; Shah i in., 2012; Stensvold i in., 2011). Od lat trwa dyskusja nt. roli tego organizmu w rozwoju nieswoistych zapaleń jelit (IBD; ang. *inflammatory bowel disease*), a także zespołu jelita drażliwego (IBS; ang. *irritable bowel syndrome*) (Boorom i in., 2008; Jimenez-Gonzalez i in., 2012; Mirjalali i in., 2017; Poirier i in., 2012; Shirvani i in., 2019; Yakoob i in., 2010, 2004). Opisywano przypadki wysypki skórnej i/lub uporczywego świądu skóry, które mogły być powiązane z obecnością *Blastocystis* (Bahrami i in., 2019; Gupta i Parsi, 2006; Hameed i in., 2011; Katsarou-Katsari i in., 2008). W literaturze można spotkać też opis zapalenia stawów łączony z zarażeniem *Blastocystis* (Lakhanpal i in., 1991) oraz inne, pokazujące jak eradykacja *Blastocystis* wiązała się z ustąpieniem przewlekłej pokrzywki i objawów zapalenia tarczycy (Rajič i in., 2015; Vogelberg i in., 2010). Z drugiej strony wiadomo, że wiele osób zarażonych *Blastocystis* nie ma żadnych objawów chorobowych, i że takie bezobjawowe nosicielstwo może trwać miesiącami, a nawet latami (Scanlan i in., 2014). Fakt, że infekcje *Blastocystis* przybierają skrajne formy od bezobjawowych do manifestujących się silnymi objawami, poparty odkryciem, że morfologicznie identyczne izolaty *Blastocystis* są genetycznie wysoce zróżnicowane, nasunął podejrzenie, że tylko niektóre z podtypów mają potencjał patogenny (podobnie jak to ma miejsce w przypadku morfologicznie identycznych *Entamoeba histolytica* i *Entamoeba dispar*, gdzie patogeniczność związana jest wyłącznie ze szczepami *E. histolytica* sensu stricto) (Diamond i Clark, 1993). To podejrzenie

zaowocowało licznymi doniesieniami o niespójnych wynikach pokazującymi, że te same podtypy *Blastocystis* występują zarówno u osób z dolegliwościami, jak i bez objawów chorobowych np. (Alinaghizade i in., 2017; Bálint i in., 2014; El Safadi i in., 2014; Hussein i in., 2008; Nieves-Ramirez i in., 2018; Özyurt i in., 2008; Soliman i in., 2014; Souppart i in., 2009; Yowang i in., 2018). Obserwacje postaci ameboidalnej, bezwodniczkowej i wielowodniczkowej u osób z biegunką zrodziły podejrzenie, że te formy mogą odgrywać rolę w patogenezie (Tan i Suresh, 2006; Zhang i in., 2012). Jednak danych dokumentujących patogenność *Blastocystis* jest niewiele. Dobrze znanym mechanizmem, który koreluje z wirulencją pasożyta jest fagocytoza krwinek czerwonych przez *Entamoeba histolytica* (Pritt i Clark, 2008). Tylko jedno doniesienie opisuje to zjawisko u *Blastocystis* (Dunn i in., 1989). Badania *In vitro* wykazały, że *Blastocystis* ST7 może przylegać do błony śluzowej jelita i wydzielać proteazy cysteinowe, co może następnie prowadzić do degradacji wydzielniczej IgA, pobudzenia wydzielania cytokin zapalnych za pośrednictwem NF-κB (jądrowego czynnika transkrypcyjnego; ang. *nuclear factor kappa b*) oraz apoptozy komórek gospodarza (ryc. 2) (Puthia i in., 2008, 2005; Tan, 2008). W badaniach *in vitro* proteaza cysteinowa wytwarzana przez ST7, została też powiązana ze zwiększoną przepuszczalnością jelitowych komórek nabłonkowych (Nourrisson i in., 2016). O zwiększonej przepuszczalności jelitowej u pacjentów zarażonych *Blastocystis* donosił (Dagci i in., 2002). Dyskretne zmiany i łagodny stan zapalny w obrębie tkanki jelit opisywano także w kilku eksperymentach w odniesieniu do ST4 (Iguchi i in., 2009). Co istotne, dotychczasowa, skąpa wiedza nt. wpływu *Blastocystis* na komórki jelitowe opiera się głównie na badaniach *in vitro* i kilku eksperymentalnych badaniach z udziałem gryzoni, co nie daje pewności, że te same mechanizmy zachodzą w jelicie człowieka (Deng i in., 2021a; Stensvold i in., 2020).



Rycina 2 Model patogenezы *Blastocystis in vitro*. Zараżenie *Blastocystis* może skutkować różnymi patologicznymi następstwami, takimi jak degradacja wydzielniczych IgA, upośledzenie funkcji bariery ochronnej, apoptoza komórek gospodarza i indukcja cytokin prozapalnych. Degradacja IgA i przerwanie bariery nabłonka może sprzyjać wzrostowi i inwazji patogenów towarzyszących (Tan, 2008).

Podczas badania skrawków tkanek z biopsji śluzówki jelit świń nie dostrzeżono patologicznych zmian. W wycinkach tych *Blastocystis* znajdowano głównie w świetle jelita, w masie kałowego *debris*, tylko nieliczne komórki znajdowały się w bliskim sąsiedztwie nabłonka, a nawet zdawały się doń przylegać, ale nie było komórek przenikających do nabłonka lub blaszki właściwej (Fayer i in., 2014; W. Wang i in., 2014; Wang, 2014).

Należy też brać pod uwagę, że brak objawów chorobowych u części zarażonych osób nie musi być jednoznaczny z tym, że *Blastocystis* nie jest zdolny do indukowania patogennych zmian. Inwazje obligatoryjnymi patogenami jelitowymi, takimi jak *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., a nawet *Entamoeba histolytica* też mogą przebiegać bezobjawowo (Adam, 2021; Eiset i in., 2020; Khan i in., 2018; Pritt i Clark, 2008; Sebaa i in., 2021). Intrygujących wyników dostarczają coraz liczniejsze badania mikrobiomu jelitowego ludzi, w których u osób z *Blastocystis* często obserwuje się i wyższe bogactwo, i większą równomierność mikrobioty bakteryjnej niż u tych, u których

Blastocystis nie występuje (Audebert i in., 2016; Even i in., 2021; Kodio i in., 2019; Scanlan i in., 2014; Tito i in., 2019; Vega i in., 2021). Tylko w pojedynczych badaniach zaobserwowano, że obecności *Blastocystis* towarzyszyła eubioza czy dysbioza (Iebba i in., 2016; Yason i in., 2019; Yildiz i in., 2016). Te obserwacje sprawiły, iż obecnie jako jedną z hipotez podaje się, że zasiedlenie jelit przez *Blastocystis* może być przejawem zdrowia, a nie choroby, jak dotychczas sądzono. Pewne jest, że na obecność *Blastocystis* i towarzyszące temu dolegliwości lub ich brak należy patrzeć szerzej, z uwzględnieniem towarzyszącej mikrobioty jelitowej, ale także statusu socjoekonomicznego i immunologicznego gospodarza. (Beghini i in., 2017; Laforest-Lapointe i Arrieta, 2018; Mondot i in., 2021). Nie można bowiem wykluczyć, że *Blastocystis* jest organizmem oportunistycznym, a zakres i intensywność objawów występujących u osoby zarażonej są wypadkową pomiędzy zdolnością szczepu do wywoływania zmian a odpornością zarażonego (Clark i in., 2013; Deng i in., 2021a). W kilku badaniach *Blastocystis* obserwowany był z wyższą częstością u pacjentów w immunosupresji (osoby z rozpoznaniem choroby nowotworowej, zakażone HIV) (Mohamed i in., 2017; Poirier i in., 2011; Tan i in., 2009; Wesołowska i in., 2016), choć w innych takiej zależności nie zauważono (Asghari i in., 2021a; Yersal i in., 2016).

Podsumowując, pomimo dużej liczby badań obejmujących różne grupy osób, które miały na celu określenie roli *Blastocystis* w zdrowiu i w chorobie, nie przyniosły one oczekiwanego wyjaśnienia, a czynniki wirulencji, patogeniczności i czynniki osobnicze żywiciela (w tym genetycznie uwarunkowane) związane z manifestacją choroby są nadal niejasne.

1.4 WYSTĘPOWANIE *BLASTOCYSTIS* U LUDZI

Liczne doniesienia z wielu rejonów geograficznych świata pokazują, że *Blastocystis* jest jednym z najczęściej wykrywanych eukariontów w próbkach kału ludzi, przy czym częstość występowania na świecie różni się znacznie, od ułamka do kilku/kilkunastu procent w krajach rozwiniętych, i kilkudziesięciu, a nawet 100% w niektórych społecznościach krajów rozwijających się m.in. (Alfellani i in., 2013a; Barbosa i in., 2018; Barreto i in., 2018; Cinek i in., 2021; EL-Marhoumy i in., 2015; El Safadi i in., 2014; Greigert i in., 2018; Horiki i in., 1997; Leelayoova i in., 2009; Menu i in., 2019;

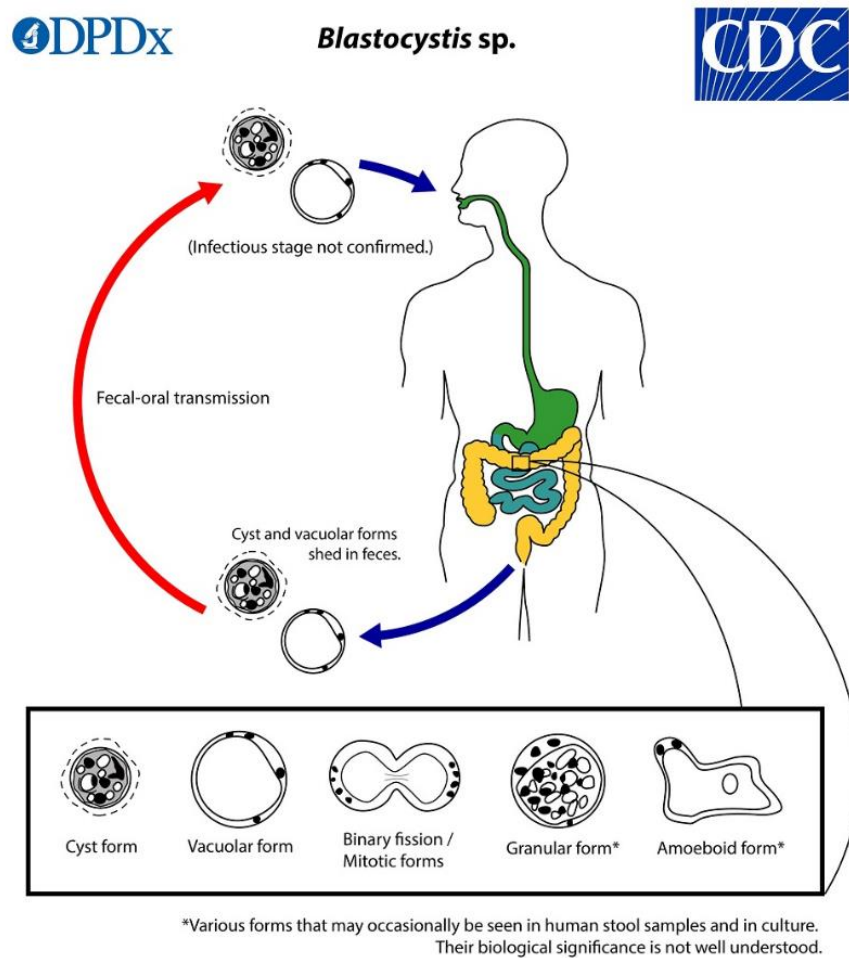
Nemati i in., 2021; Piubelli i in., 2019; Scanlan i in., 2014; Seyer i in., 2017; Villamizar i in., 2019). Przyczyn tego zróżnicowania upatruje się przede wszystkim w różnym poziomie infrastruktury sanitarnej i higieny osobistej, transmisji sprzyja bowiem spożywanie zanieczyszczonej cystami żywności i wody (Angelici i in., 2018; Koloren i in., 2018; Lee i in., 2012; Noradilah i in., 2016; Suresh i in., 2005) oraz bliski kontakt ze zwierzętami (Rene i in., 2009; Salim i in., 1999; Yan i in., 2007; Yoshikawa i in., 2009). Donoszono także o wpływie sposobu żywienia na zasiedlenie jelit przez *Blastocystis* (Lepczyńska i in., 2017). To wszystko sprawia, że częstość występowania drobnoustroju może różnić się znacznie nawet w obrębie populacji pochodzących z tego samego kraju np. w społeczności wiejskiej i miejskiej, dzieci i dorosłych, osób z dolegliwościami i bezobjawowych.

Ze względu na znaczny polimorfizm komórek *Blastocystis* i ich delikatną strukturę, istotną rolę w określaniu częstości zarażenia odgrywają także techniki diagnostyczne stosowane do wykrywania *Blastocystis* oraz umiejętności i doświadczenie diagnostów (Adiyaman i in., 2015; Dogruman-Al i in., 2010; Roberts i in., 2011; Stensvold i in., 2007; Suresh i Smith, 2004; Yoshikawa i in., 2011) o czym szerzej w rozdziale 1.6 dotyczącym budowy morfologicznej i 1.7 dotyczącym wykrywania *Blastocystis*.

1.5 CYKL ŻYCIOWY I TRANSMISJA

Cykl życiowy *Blastocystis* nie został jednoznacznie wyjaśniony ze względu na brak odpowiedniego modelu zwierzęcego. Niemniej jednak aktualnie uważa się, że odpowiada on cyklowi większości protistów jelitowych, i przebiega z udziałem odpornej na trudne warunki środowiskowe formy przypominającej cystę, która najprawdopodobniej służy do transmisji drobnoustroju oraz formy troficznej, która rozmnaża się przez podział w przewodzie pokarmowym żywiciela (Suresh i in., 1993). Cysty po spożyciu rozwijają się w formy troficzne tylko u odpowiedniego gospodarza, czyli kontynuacja cyklu zależy od synergii podtypu z gospodarzem. Po ekscystacji w jelicie grubym uwalniane są postaci wakuolarne, które rozmnażają się przez podział, ale mogą też przekształcić się w dowolną inną formę. Po pewnym czasie następuje encystacja form wakuolarnych, a cysty wydalane są z kałem. (ryc. 3).

Dyskutowano także bardziej złożone, alternatywne cykle życiowe (Tan, 2008), takie jak pączkowanie, plazmotomia, endodiageneza czy schizogonia. Niemniej jednak większość badaczy w chwili obecnej jest zgodna, że nie ma wystarczających dowodów na jakikolwiek inny niż ten prosty dwuetapowy cykl życia *Blastocystis* oraz, że transmisja drobnoustroju odbywa się na drodze fekalno-oralnej przez zanieczyszczone cystami dłonie, wodę, żywność lub kontakt bezpośredni z zarażonym (Jeremiah i Parija, 2013).



Rycina 3 Schemat cyklu życiowego *Blastocystis* (<https://www.cdc.gov/dpdx/Blastocystis/index.html>) [dostęp dn. 11.11.2021].

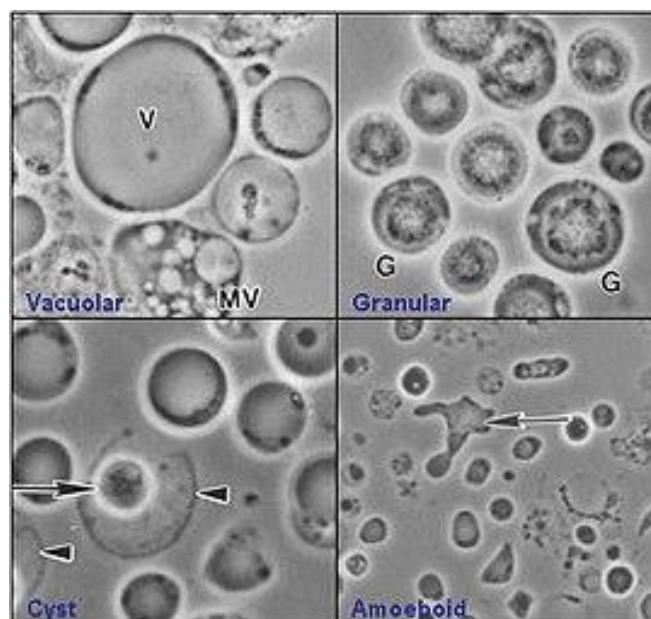
1.6 BUDOWA MORFOLOGICZNA

Blastocystis jest organizmem wysoce polimorficznym. Opisano cztery główne formy morfologiczne drobnoustroju i dodatkowe różniące się nie tylko wyglądem, ale i rozmiarami (przeważnie w granicach 5 - 40µm, ale czasem nawet 200 µm). Są to: najczęściej rozpoznawana w rozmazach mikroskopowych kału i w hodowlach *in vitro* postać wodniczkowa (inaczej wakuolarna) oraz znacznie rzadziej spotykane postaci: ziarnista, ameboidalna oraz postać przypominająca cystę (ang. *cyst-like-form*) (Stenzel i Boreham, 1996; Zhang i in., 2012) przedstawione na ryc. 3 i ryc. 4. Badania *in vitro* sugerowały, że każda z postaci wegetatywnych może swobodnie przekształcać się w inne postaci wegetatywne z możliwością przyjmowania w trakcie transformacji różnych form pośrednich. Część badaczy za takie uznaje postaci wielowodniczkową i bezwodniczkową, a także formy opisywane np. jako głowa meduzy czy owoc kasztanowca (Dunn i in., 1989; Moe i in., 1996; Tan i Suresh, 2006). Według Vdovenki postaci wodniczkowa i ziarnista mogą nie reprezentować etapów cyklu życiowego drobnoustroju lecz być formami zdegenerowanymi powstającymi w wyniku ekspozycji na tlen (Vdovenko, 2000). Sugerowano także, że postaci ameboidalne mogą być formami patogennymi, o czym miałyby świadczyć wykrywanie ich u osób z dolegliwościami (Katsarou-Katsari i in., 2008; Tan i Suresh, 2006). Generalnie nie ma zgody co do liczby i znaczenia różnych form morfologicznych *Blastocystis*.

1.7 DIAGNOSTYKA ZARAŻEŃ *BLASTOCYSTIS*

Brakuje wystandaryzowanych procedur do diagnostyki blastocystozy. Wykrywanie zarażenia opiera się na identyfikacji drobnoustroju w próbkach kału badanych mikroskopowo. Przeważnie wykonuje się rozmazy w soli fizjologicznej i w płynie Lugola, a Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom (CDC; ang: *Center for Disease Control and Prevention*) zaleca także wykonanie preparatów trwale barwionych np. trichromem (<https://www.cdc.gov/dpdx/Blastocystis/index.html>); [dostęp 19.09.2021]. Jednak wielość form morfologicznych *Blastocystis* oraz delikatna, łatwo ulegająca destrukcji struktura powodują, że użycie każdej z tych metod obarczone jest

ryzykiem uzyskania błędnych wyników; fałszywie pozytywnych, gdy inne, podobnie wyglądające struktury obecne w kale (np. komórki grzybów drożdżopodobnych, leukocyty, komórki nabłonka jelit, cysty i/lub trofozoity pasożytów i komensali jelitowych) zostaną mylnie rozpoznane jako *Blastocystis*; fałszywie negatywnych, gdy komórki *Blastocystis* ulegną destrukcji lub nie zostaną rozpoznane (Stenzel i Boreham, 1996). Z powodu kruchej, łatwo ulegającej zniszczeniu strukturze niektórych form *Blastocystis*, nie zaleca się stosowania w diagnostyce metod zagęszczających, których składniki i procedury mogą *Blastocystis* uszkadzać, a nawet niszczyć. Dostępne metody hodowlane i molekularne na ogół stosowane są tylko w celach badawczo-naukowych.



Rycina 4 Cztery główne postaci morfologiczne *Blastocystis*, które znajduje się w rozmazach mikroskopowych kału i w hodowli *in vitro* (<https://en.wikipedia.org/wiki/Blastocystis>) [dostęp dn. 03.11.2021].

Dodatkowym problemem w postępowaniu z pacjentem, u którego wykryto *Blastocystis* jest brak kryteriów pozwalających na odróżnienie kolonizacji od patologicznej inwazji, a w konsekwencji brak jasnych wytycznych, kiedy podejmować, a kiedy nie podejmować leczenia (Coyle i in., 2012; Jelinek i in., 1997; Markell i Udkow, 1986; Roberts i in., 2014b) Związane z tym dylematy w podejmowaniu decyzji terapeutycznych potęguje fakt, że drobnoustrój bywa obecny tygodniami, miesiącami, a nawet latami u osób niezgłaszających żadnych dolegliwości (Kurt i in., 2016; Scanlan i in., 2014).

W publikacji autorów **Rudzińska M.**, Kowalewska B., Sikorska K. **Diagnostyka laboratoryjna zarażeń *Blastocystis* – wyzwania i kontrowersje** wchodzącej w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, dokonano przeglądu piśmiennictwa dotyczącego problemów związanych z diagnostyką zarażeń *Blastocystis* oraz sformułowano wskazówki, które mogą przyczynić się do poprawy efektywności wykrywania zarażeń ludzi tym drobnoustrojem.

1.8 ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA *BLASTOCYSTIS*; PODZIAŁ NA PODTYPY

Chociaż *Blastocystis* izolowane od ludzi i zwierząt są morfologicznie nierozróżnialne, to w rzeczywistości zarówno izolaty ludzkie, jak i pozyskiwane od zwierząt charakteryzują się dużą zmiennością genetyczną (Clark, 1997; Gentekaki in., 2017; Stensvold i in., 2012). Do jej zbadania i opisania przysłużyło się szereg technik rybotypowania, takich jak losowa amplifikacja polimorficznego DNA (RAPD-PCR, ang. *random amplified polymorphic DNA*) (Yoshikawa i in., 1996) (Init i in., 1999; Yoshikawa i in., 1998), PCR ze starterami komplementarnymi do miejsc znakowanych sekwencyjnie (STS-PCR, ang. *sequence-tagged-sites PCR*) (Abe i in., 2003a; Yoshikawa i in., 2004a, 2000), badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP, ang. *restriction fragment length polymorphism*), (Abe i in., 2003b; Böhm-Gloning i in., 1997; Clark, 1997; Kaneda i in., 2001; Leelayoova i in., 2009; Rivera i Tan, 2005; Snowden i in., 2000; Wong i in., 2008) czy jednoniciowy polimorfizm konformacyjny (PCR-SSCP, ang. *single strand conformational polymorphism*) (Menounos i in., 2008). Tę wycinkową wiedzę nt. zmienności genetycznej między izolatami *Blastocystis* rozszerzyły wyniki badań filogenetycznych częściowych sekwencji genu SSU rRNA (Abe, 2004; Arisue N, Hashimoto T, 2003; Noël i in., 2005, 2003; Özyurt i in., 2008; Parkar i in., 2007; Santín i in., 2011; Scicluna i in., 2006; Stensvold i in., 2012). W oparciu o obserwowane różnice *Blastocystis* podzielono na grupy genetyczne zwane podtypami. W 2007 roku uznano istnienie dziewięciu podtypów (ST1-ST9), a oznaczenia kolejnych nadawane były za pomocą numeracji opartej na kolejności publikacji (Stensvold i Clark, 2020). Do roku 2013 opisano osiem nowych podtypów (ST10-ST17) (Alfellani i in., 2013b; Fayer i in., 2012; Parkar i in., 2010; Petrášová i in., 2011; Scicluna i in., 2006; Stensvold i in., 2009), a w latach 2017-2021 zgłoszono kolejnych dwanaście (ST18-ST29) (Maloney i in.,

2021, 2020, 2019a, 2019b; Zhao i in., 2017). Jednak nie wszystkie z nowo zgłoszonych spełniają obecnie obowiązujące kryteria niezbędne do uznania nowego podtypu, do których należy: (a) uzyskanie sekwencji o długości $\geq 80\%$ z około 1800 pz tworzących SSU rRNA); (b) wykazanie, że sekwencja nowego podtypu różni się od sekwencji któregośkolwiek istniejącego podtypu o co najmniej 4%; (c) sprawdzenie sekwencji nowego podtypu pod kątem obecności chimer; oraz (d) przeprowadzenie analizy filogenetycznej, aby upewnić się, że nowy podtyp nie łączy się z wcześniej istniejącymi podtypami (Stensvold i Clark, 2020). Spośród 29 opisanych podtypów *Blastocystis* te kryteria spełnia obecnie 25 (ST1–ST17, ST21 i ST23–ST29) podczas gdy pozostałe cztery podtypy (ST18–ST20, ST22) ich nie spełniają. Aby uzyskać sekwencje genu SSU rRNA o pełnej długości, trzeba użyć starterów o niższej specyficzności, które pozwalają uzyskać dłuższą sekwencję albo spróbować połączyć odczyty sekwencji genu uzyskane za pomocą wielu zestawów starterów. Oba wymienione sposoby niosą ryzyko generowania sekwencji chimerycznych i/lub artefaktycznych (Maloney i Santin, 2021). Istnieją zasadne podejrzenia, że tak właśnie może być w przypadku ST18–ST20 i ST22, dlatego nie zostały one dotychczas uznane (Maloney i in., 2021; Maloney i Santin, 2021; Stensvold i Clark, 2020). Przeprowadzone w 2020 roku przez Maloney i Santin badanie wykazało przydatność metody (ang. *Oxford Nanopore MinION long-read sequencing*) do generowania dokładnych, pełnej długości sekwencji *Blastocystis*, co otwiera nowe możliwości rozwiązywania niektórych problemów związanych z identyfikacją podtypów *Blastocystis* (Maloney i Santin, 2021).

1.9 EPIDEMIOLOGIA I ZOONOTYCZNY POTENCJAŁ *BLASTOCYSTIS*

Jak przedstawiono w poprzednim rozdziale *Blastocystis* izolowane od ssaków i ptaków należą do dwudziestu pięciu podtypów.

U ludzi stwierdzono występowanie dwunastu tj. ST1–ST10, ST12, ST14, ale 90–95% zarażeń powodują ST1–ST4 z wyraźną dominacją ST3 i ST1. W nieco mniejszej ilości obserwuje się ST2 i ST4, przy czym ST4 głównie w krajach Europy (w niektórych jest wręcz podtypem dominującym). ST5–ST7 u ludzi stwierdzane są rzadziej, a o wykryciu ST8, ST9, ST10, ST12 i ST14 informują pojedyncze doniesienia (dwa ostatnie zostały

wykryte u ludzi dopiero w 2021 roku) (Alfellani i in., 2013a; Nemati i in., 2021; Ramírez i in., 2016; Rauff-Adedotun i in., 2021).

Porównanie rozkładu podtypów występujących u ludzi w Europie i poza kontynentem europejskim przedstawia rycina 5 (Stensvold i Clark, 2016). Bardziej szczegółowo rozkład podtypów występujących u ludzi w różnych rejonach geograficznych świata pokazuje tabela 2 (Alfellani i in., 2013a).

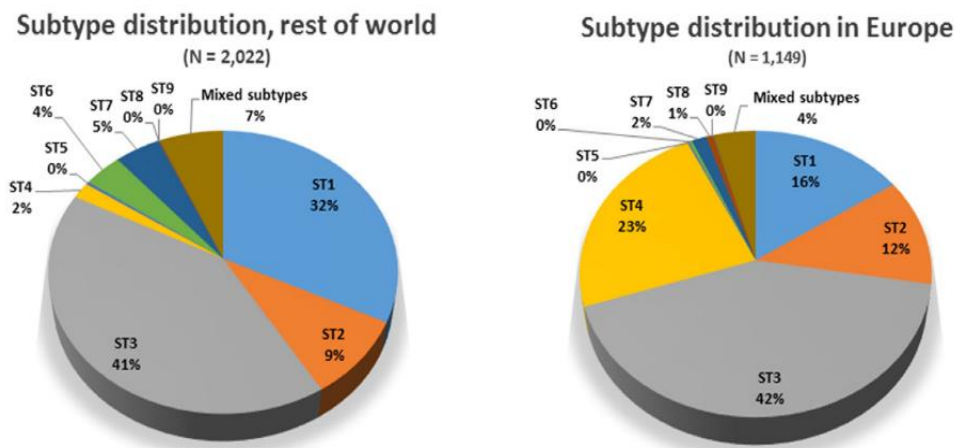


Fig. 3. Pie charts of human *Blastocystis* subtype distributions in Europe (A) and the rest of the world (B). These were produced from the data presented in Alfellani et al. [12]. Of note is the fact that although ST4 accounted for 10% of the samples across the world ($N = 318$), 87% of these (278) were from Europe, suggesting that ST4 is more or less geographically restricted to Europe.

Rycina 5 Występowanie podtypów *Blastocystis* u ludzi w Europie i poza Europą (Stensvold i Clark, 2016).

Tabela 2 Podtypy *Blastocystis* identyfikowane u ludzi w różnych rejonach geograficznych świata (Alfellani i in., 2013a).

14

M.A. Alfellani et al. / Acta Tropica 126 (2013) 11–18

Table 2
Subtype distribution by country of sample origin.

Country of sample origin	Technique#	No. of subtype observations	Subtype distribution											Reference	
			ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	Mixed ST	Unknown ST		
Brazil	Sequencing	73	33	27	13	–	–	–	–	–	–	–	7	–	Malheiros et al. (2011)
Colombia	Sequencing	13	5	4	4	–	–	–	–	–	–	–	1	–	Santin et al. (2011)
USA	Sequencing	7	1	–	6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Jones et al. (2009)
Americas total		93	39	31	23	0	0	0	0	0	0	0	8	0	
Denmark	Sequencing	29	1	6	15	7	–	–	–	–	–	–	–	–	Stensvold et al. (2006)
Denmark	Sequencing	28	5	9	13	1	–	–	–	–	–	–	–	–	Stensvold et al. (2007)
Denmark	Sequencing	92	20	15	39	16	–	1	–	1	–	–	7	–	Rene et al. (2009)
Denmark	Sequencing	143	31	39	42	24	–	–	6	–	1	–	26	–	Stensvold et al. (2009)
Denmark	Sequencing	25	1	4	1	19	–	–	–	–	–	–	–	–	Stensvold et al. (2011a)
Denmark	Sequencing	24	11	–	13	–	–	–	–	–	–	–	2	–	Stensvold et al. (2011b)
France	Sequencing	43	11	4	23	4	–	–	1	–	–	–	3	–	Souppart et al. (2009)
France	Sequencing	27	1	1	4	17	–	1	3	–	–	–	–	–	Poirier et al. (2011)
Germany	RFLP	171	40	1	118	12	–	–	–	–	–	–	8	–	Böhm-Glönig et al. (1997)
Germany	STS	12	3	2	5	2	–	–	–	–	–	–	–	–	Yoshikawa et al. (2004)
Greece	SSCP	45	9	6	27	1	–	1	1	–	–	–	–	–	Menounos et al. (2008)
Ireland	Sequencing	14	1	6	4	3	–	–	–	–	–	–	–	–	Scanlan and Marchesi (2008)
Italy	Sequencing	34	3	7	16	6	–	–	1	1	–	–	4	–	Meloni et al. (2011)
Spain	RFLP	51	1	2	–	48	–	–	–	–	–	–	–	–	Dominguez-Márquez et al. (2009)
Sweden	Sequencing	63	10	9	30	13	–	–	1	–	–	–	–	–	Forsell et al. (2012a,b)
UK	RFLP	29	2	1	22	4	–	–	–	–	–	–	–	–	Clark (1997)
UK	Sequencing	48	2	8	20	16	–	–	1	1	–	–	1	–	Scicluna et al. (2006)
UK	Sequencing	271	34	26	114	85	2	1	4	5	–	–	–	–	Present study
Europe total		1149	186	146	506	278	2	4	18	8	1	51	0		
Egypt	STS	110	15	–	49	–	–	33	13	–	–	–	10	–	Fouad et al. (2011)
Egypt	STS	44	8	–	24	–	–	8	4	–	–	–	–	–	Hussein et al. (2008)
Egypt	Sequencing	21	4	4	13	–	–	–	–	–	–	–	1	–	Souppart et al. (2010)
Liberia	Sequencing	25	7	7	8	3	–	–	–	–	–	–	5	–	Present study
Libya	Sequencing	38	19	3	15	–	–	–	1	–	–	–	–	–	Present study
Nigeria	Sequencing	22	10	–	9	3	–	–	–	–	–	–	1	–	Present study
Tanzania	Sequencing	6	1	3	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Petrášová et al. (2011)
Africa total		266	64	17	120	6	0	41	18	0	0	17	0		
Bangladesh	STS	26	2	–	24	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Yoshikawa et al. (2004)
Iran	RFLP	40	20	4	16	–	–	–	–	–	–	–	–	5	Motazedian et al. (2008)
Iran	STS	141	48	33	53	–	–	–	7	–	–	–	33	–	Moosavi et al. (2012)
Nepal	STS	20	4	4	12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Yoshikawa et al. (2009)
Nepal	STS	101	40	–	–	–	–	8	53	–	–	–	41	8	Lee et al. (2012)
Pakistan	STS	10	2	–	7	–	–	1	–	–	–	–	–	–	Yoshikawa et al. (2004)
Pakistan	STS	177	87	10	49	8	7	6	10	–	–	–	–	2	Yakoob et al. (2010)
Turkey	Sequencing	87	8	12	66	1	–	–	–	–	–	–	–	–	Özyurt et al. (2008)
Turkey	STS	96	19	22	55	–	–	–	–	–	–	–	4	–	Dogruman-AI et al. (2008)
Turkey	STS	32	20	3	9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Eroglu et al. (2009)
Turkey	STS	38	3	13	22	–	–	–	–	–	–	–	3	–	Dogruman-AI et al. (2009a)
Turkey	STS	75	19	11	45	–	–	–	–	–	–	–	9	–	Dogruman-AI et al. (2009b)
Turkey	STS	25	9	6	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Eroglu and Koltas (2010)
Central asia total		868	281	118	368	9	7	15	70	0	0	90	15		
China	STS	38	17	–	19	–	–	–	2	–	–	–	5	1	Yan et al. (2006)
China	STS	194	56	11	125	1	–	1	–	–	–	–	10	8	Li et al. (2007a)
China	STS	76	18	1	56	1	–	–	–	–	–	–	2	3	Li et al. (2007b)
Japan	STS	32	1	–	30	–	–	1	–	–	–	–	–	–	Yoshikawa et al. (2000)
Japan	RFLP	61	11	13	30	7	–	–	–	–	–	–	–	3	Kaneda et al. (2001)
Japan	STS	50	4	–	26	2	–	11	5	–	2	–	–	–	Yoshikawa et al. (2004)
Malaysia	STS	20	9	1	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Tan et al. (2008)
Malaysia	STS	38	5	–	20	–	–	11	2	–	–	–	–	2	Tan et al. (2009)
Philippines	RFLP	10	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	Rivera and Tan (2005)
Singapore	RFLP	9	2	–	7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Wong et al. (2008)
Thailand	RFLP	159	144	–	13	–	–	–	2	–	–	–	6	–	Thathaisong et al. (2003)
Thailand	STS	5	2	–	2	–	–	1	–	–	–	–	1	–	Yoshikawa et al. (2004)
E & SE-Asia Total		692	279	26	338	11	0	25	11	0	2	24	19		
Australia	Sequencing	12	5	–	4	2	–	1	–	–	–	–	1	–	Nagel et al. (2012)
Australia	Sequencing	91	28	5	40	12	–	3	1	2	–	–	–	–	Roberts et al. (in press)
Australia total		103	33	5	44	14	0	4	1	2	0	1	0		
EARTH	Total	3171	882	343	1399	318	9	89	118	10	3	191	34		

STS: Sequence-tagged site; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SSCP, single strand conformation polymorphism.

U zwierząt stwierdzono obecność wszystkich uznanych, czyli dwudziestu pięciu podtypów *Blastocystis*, w tym wszystkich występujących u ludzi. W 2020 i 2021 roku ukazało się kilka publikacji podsumowujących ogromną liczbę danych na temat podtypów występujących u zwierząt z różnych rejonów geograficznych świata (Hublin i in., 2021; Nemati i in., 2021; Rauff-Adedotun i in., 2021). Co istotne, pewne podtypy zdają się wykazywać wyższą swoistość żywicielską, podczas gdy inne są bardziej uniwersalne, i tak:

- **ST1-ST3** – występują u wielu gatunków zwierząt dzikich i hodowlanych, przede wszystkim jednak u naczelnych;
- **ST4** – wykrywany u zwierząt różnych gatunków, przede wszystkim dzikich i trzymany w niewoli gryzoni;
- **ST5** – powszechny u świń i w mniejszym stopniu u innych zwierząt gospodarskich: bydła, owiec i kóz oraz domowego i dzikiego ptactwa. W pojedynczych przypadkach stwierdzony u małp (Stensvold i in., 2009). Ostatnio coraz częściej obserwowany u blisko spokrewnionych ze świniami dzików (Asghari i in., 2021b; Lee i in., 2020; Rivero-Juarez i in., 2020; Russini i in., 2020; Solaymani-Mohammadi i in., 2004);
- **ST6 i ST7** – ze względu na fakt izolowania głównie od ptaków zyskały miano „podtypów ptasich”, choć bywają wykrywane, ale zdecydowanie rzadziej także u zwierząt gospodarskich: bydła i kóz oraz sporadycznie u świń i zwierząt mięsożernych;
- **ST8** – generalnie rzadko identyfikowany; odnotowany u niektórych gatunków małp i lemurów (Cian i in., 2017; Stensvold i in., 2009; Valença-Barbosa i in., 2019); ponadto w pojedynczych przypadkach u świni domowej, kapibary, nektomysa, dydelfa i pancernika (Oliveira-Arbex i in., 2020; Valença-Barbosa i in., 2019), a także u ptaków: czarnych łabędzi, oharów i pawi (Deng i in., 2019);
- **ST9** – dotychczas zidentyfikowany tylko u lemurów (Cian i in., 2017; Ma L, Qiao H, Wang H, Li S, Zhai P, Huang J, 2020) i kurcząt (Noradilah i in., 2016);
- **ST10, ST14** – najczęściej identyfikowane u bydła, owiec i kóz oraz innych Artiodactyla, rzadko stwierdzane były także u ptaków, a w pojedynczych

- przypadkach (tylko ST10) u gryzoni i lemurów (Deng i in., 2019; Stensvold i in., 2009) oraz dzikich i udomowionych mięsożernych (X. D. Li i in., 2020);
- **ST11** – dotychczas odnotowany głównie u słońi (Cian i in., 2017; J. Li i in., 2019; Parkar i in., 2010; Roberts i in., 2013) oraz w pojedynczych przypadkach u bydła i szympansov (Maloney i in., 2019a; Roberts i in., 2013);
 - **ST12** – rzadko wykrywany; niemal wyłącznie u Artiodactyla: bydła, owiec (Udonsom i in., 2018), żyraf (Parkar i in., 2010; Roberts i in., 2013) takinów, kobusów (Zhao i in., 2017) i jaków (Ren i in., 2019);
 - **ST13, ST15-ST17** – rzadko wykrywane u ssaków różnych gatunków; ST13 także u gołębi i kruków; ST17 jest na drugim miejscu (po ST4) pod względem częstości występowania u gryzoni (Asghari i in., 2019; Hublin i in., 2021; Nemati i in., 2021);
 - **ST21, ST23-ST26** – wykryte u bydła domowego (Maloney i in., 2019b, 2019a);
 - **ST24, ST27-ST29** – wykryte u ptaków (struś, cyraneczka, paw indyjski) (Maloney i in., 2021, 2019b)

[Szczegółowe dane źródłowe na temat występowania podtypów przedstawione są w czterech pracach oryginalnych oraz załączniku zamieszczonym w rozdziale 7].

To nakładanie się zakresu gospodarzy pokazuje zróżnicowaną swoistość żywicielską podtypów *Blastocystis* (innymi słowy zróżnicowaną podatność różnych żywicieli na zarażenie poszczególnymi podtypami) i jednocześnie wskazuje na możliwość łatwego przenoszenia niektórych podtypów pomiędzy zwierzętami tego samego i różnych gatunków. Budzi to także uzasadnione podejrzenie, że zwierzęta mogą stanowić rezerwuar zarażeń *Blastocystis* dla ludzi. Zgromadzone dotychczas dane molekularne *Blastocystis* izolowanych od ludzi i zwierząt z jednej strony wykazały dużą różnorodność genetyczną wśród izolatów pochodzących od tych samych żywicieli, ale z drugiej podobieństwa między izolatami pochodzącymi od różnych zwierząt oraz ludzi, co potęguje przypuszczenie o możliwej transmisji *Blastocystis* między zwierzętami a ludźmi (Greige i in., 2018; Nagel i in., 2012; Parkar i in., 2010, 2007; Pintong i in., 2018; Stensvold i in., 2009; Thathaisong i in., 2003; Wenqi Wang i in., 2014; Yoshikawa i in., 2009).

2. CEL PRACY

Celem pracy było poszerzenie wiedzy na temat epidemiologii *Blastocystis* poprzez zbadanie występowania i zróżnicowania genetycznego *Blastocystis* izolowanych od ludzi i wybranych grup zwierząt w województwie pomorskim. Cel główny realizowany był w oparciu o niżej wymienione cele szczegółowe:

CEL 1. Rozpoznanie częstości zarażeń *Blastocystis* wśród pacjentów Przychodni Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Pasożytniczych (PCHZTP) Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej (IMMiT) w Gdyni (obecnie Uniwersyteckie Centrum Medycyny Morskiej i Tropikalnej GUMed).

CEL 2. Zbadanie czy występują różnice w zasiedleniu przez *Blastocystis* między osobami podróżującymi do strefy klimatu gorącego i nieopuszczającymi Polski.

CEL 3. Zbadanie częstości zarażenia i podtypów *Blastocystis* występujących u trzody chlewnej w województwie pomorskim w celu rozpoznania czy zwierzęta te mogą stanowić rezerwuar zarażenia *Blastocystis* dla ludzi.

CEL 4. Zbadanie częstości zarażenia i porównanie genotypów *Blastocystis* izolowanych od zwierząt z Gdańskiego Ogrodu Zoologicznego i ich opiekunów w celu rozpoznania czy dochodzi do odzwierzęcej transmisji drobnoustroju.

3. MATERIAŁY I METODY

Poniżej znajduje się ogólny opis materiału i metod użytych w badaniach, a także metod statystycznych wykorzystanych do analizy uzyskanych wyników. Szczegółowe informacje zamieszczone są w odpowiednich działach poszczególnych publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

3.1 MATERIAŁ BADAWCZY STANOWIŁY:

Cel 1: wyniki parazytologicznych badań koprologicznych pacjentów PCHZTP IMMiT (n = 52118) uzyskane w latach 1978-2010.

Cel 2: próbki kału pacjentów PCHZTP IMMiT (n = 122) podróżujących do strefy klimatu gorącego i nigdy nieopuszczających Polski.

Cel 3: próbki kału trzody chlewnej (n = 149) z 14 chlewni zlokalizowanych w woj. pomorskim.

Cel 4: próbki kału zwierząt z Gdańskiego Ogrodu Zoologicznego (n = 201) i opiekujących się nimi pracowników (n = 35).

3.2 DO PRZEPROWADZENIA BADAŃ WYKORZYSTANO:

- Badania mikroskopowe próbek kału (mikroskop świetlny, powiększenie 10x i 40x).
- Badania molekularne: STS-PCR i/lub PCR ze starterami oskrzydłającymi tzw. barcode region, a następnie sekwencjonowanie uzyskanych produktów PCR (tam, gdzie to było możliwe).
- Dodatkowo w pracy dotyczącej zarażenia *Blastocystis* u osób podróżujących i nieopuszczających Polski użyto metody hodowli na podłożu Jonesa (Jones, 1946), a w pracy dotyczącej zarażenia *Blastocystis* u trzody chlewnej porównano przydatność dwóch wyżej wymienionych, powszechnie używanych metod PCR do identyfikacji *Blastocystis* w próbkach kału.
- Sekwencjonowanie zlecono Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu.

- W przypadku izolatów *Blastocystis* od zwierząt i pracowników ogrodu zoologicznego przeprowadzono także analizę filogenetyczną uzyskanych produktów amplifikacji DNA.
- Wszystkie uzyskane sekwencje zgłoszono do Banku Genów.

3.3 METODY STATYSTYCZNE WYKORZYSTANE DO ANALIZY WYNIKÓW:

- Analiza opisowa – rozkład częstości określonych zarażeń.
- Test Fishera (sprawdzenie niezależności rozważanych cech); testy Wilcoxon (dla dwóch grup) i Kruskala-Wallisa (dla więcej niż dwóch grup) do analizy intensywności inwazji, podtypów *Blastocystis*, występowania dolegliwości, podróżowania i nieopuszczania Polski, długości pobytu poza Polską oraz wieku badanych osób.
- Oprogramowanie „PERCENTAGE CONFIDENCE LIMITS VS 13” wraz z tabelami Rolfa i Sokala (do określenia wartości rozpowszechnienia *Blastocystis* u świń); test ANOVA (różnice między grupami wiekowymi świń) i t-studenta (różnice między metodami diagnostycznymi).
- Oprogramowanie MEGA X, metoda największego prawdopodobieństwa (Maximum Likelihood), model ewolucji Tamura 3 parametrowy z dystrybucją gamma i modelem inwariantnym (do konstrukcji drzewa filogenetycznego).

4. OMÓWIENIE PRAC ORYGINALNYCH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ (cel, wyniki, wnioski)

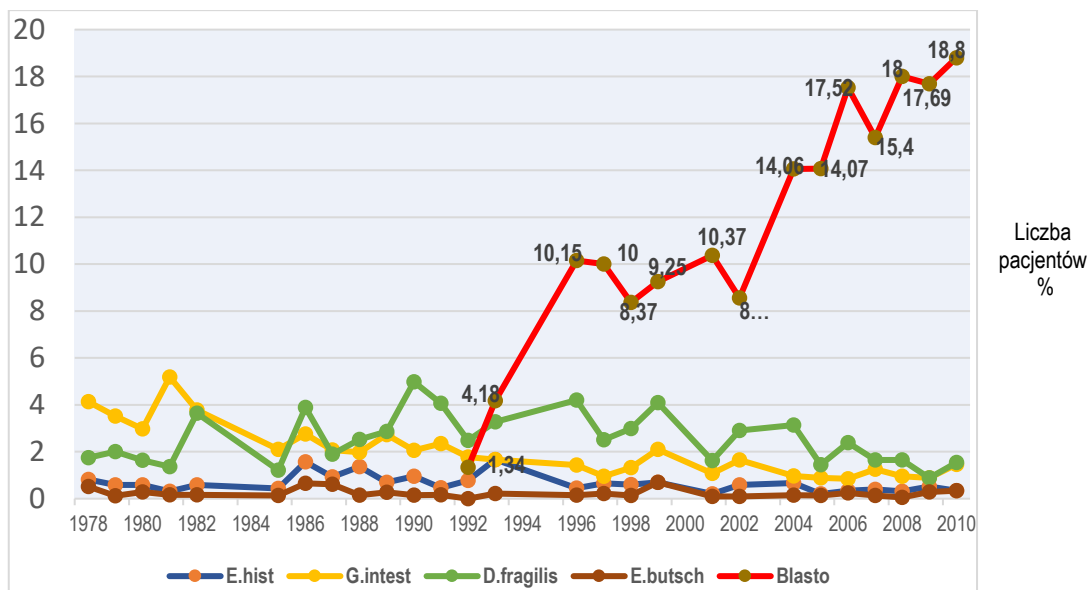
Podczas pracy w charakterze diagnosty laboratoryjnego w IMMiT (obecnie w strukturze Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) zauważyłam, że wśród osób zgłaszających się w pierwszej dekadzie XXI w. na parazytologiczne badania koprologiczne, wzrasta liczba tych, u których zostaje wykryty *Blastocystis*. *Blastocystis* był wówczas w Polsce prawie nieznany nawet w środowisku diagnostów i lekarzy. Te dwa fakty stanęły u podstaw mojego zainteresowania blastocystozą i kielkującej myśli o eksploracji zagadnienia zarażeń *Blastocystis* w postaci rozprawy doktorskiej.

PRACA „OCENA CZĘSTOŚCI ZARAŻEŃ PASOŻYTAMI JELITOWYMI WŚRÓD PACJENTÓW PRZYCHODNI INSTYTUTU MEDYCyny MORSKIEJ I TROPIKALNEJ W GDYNI W OKRESIE OSTATNICH 30 LAT”

Celem tej pracy była ocena częstości zarażenia *Blastocystis* na tle zarażeń innymi pasożytami przewodu pokarmowego u pacjentów PCHZTP IMMiT zgłaszających się na badania w latach 1978-2010. Analizą objęto wyniki badań koprologicznych 52.118 pacjentów. Badania wykonywane były klasycznymi metodami stosowanymi do wykrywania pasożytów w kale (rozmaz w soli fizjologicznej i płynie Lugola, gruby rozmaz wg Kato-Miura oraz metodą zagęszczającą przy użyciu formaliny i octanu etylu). Preparaty oglądane były pod mikroskopem świetlnym pod powiększeniem 10x i 40x.

W badanej populacji pacjentów zaobserwowano spadek liczby osób zarażonych poszczególnymi pasożytami (ryc. 6). *Blastocystis* był jedynym spośród pierwotniaków i helmintów jelitowych, którego częstość występowania rosła przy – co warto podkreślić – zmniejszającej się liczbie osób zgłaszających się na parazytologiczne badania koprologiczne. Na przestrzeni 18 lat liczba osób zarażonych *Blastocystis* wzrosła 14-krotnie tj. z poziomu 1,34% w roku 1992 (kiedy zaczęto ewidencjonować zarażenia *Blastocystis* w IMMiT) do 18,8% w roku 2010. Ponadto począwszy od roku 1995 *Blastocystis* był najczęściej wykrywanym eukariontem jelitowym.

Należy podkreślić, że w Polsce oprócz przedstawionych w ww. publikacji brakuje danych na temat prewalencji *Blastocystis* u ludzi.



Rycina 6 Zmiany w częstoci występowania najczęściej wykrywanych pierwotniaków jelitowych na przestrzeni lat 1978-2010 wśród pacjentów PCHZTP IMMiT (opracowanie własne).

Wyniki tej pracy zachęciły mnie do kontynuacji badań.

PRACA “BLASTOCYSTIS SUBTYPES ISOLATED FROM TRAVELERS AND NON-TRAVELERS FROM THE NORTH OF POLAND- A SINGLE CENTER STUDY”

Celem tej pracy było zbadanie czy występują różnice w zasiedleniu przez *Blastocystis* między osobami podróżującymi do strefy klimatu gorącego i nigdy nieopuszczającymi Polski.

Grupę badaną stanowiło 122 pacjentów PCHZTP IMMiT, u których w trakcie rutynowych badań kału w kierunku obecności pasożytów jelitowych stwierdzono obecność *Blastocystis*. Wśród badanych były osoby z dolegliwościami i bez dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego w tym 92 po powrocie z krajów klimatu gorącego oraz 30 osób, które nigdy nie wyjeżdżały z Polski. Badania wykonywane były w Zakładzie Medycyny Tropikalnej i Epidemiologii (ZMTiE) GUMed w latach 2012-2013. Badania wykonywano trzykrotnie w odstępie jedno-dwudniowym klasycznymi metodami stosowanymi do wykrywania pasożytów w kale (rozmaz w soli fizjologicznej i płynie Lugola, gruby rozmaz wg Kato-Miura oraz metodą zagęszczającą przy użyciu formaliny i octanu etylu). Do oceny intensywności inwazji *Blastocystis* ustalono cztery poziomy obciążenia drobnoustrojem (wg systemu opracowanego w ZMTiE) przy użyciu obiektywu powiększającego 40x:

- I - bardzo niski: pojedyncze komórki w całym preparacie;
- II - niski: pojedyncze komórki w prawie każdym polu widzenia;
- III - średni: 5–10 komórek w każdym polu widzenia;
- IV – wysoki: > 10 komórek w każdym polu widzenia.

Ponieważ obciążenie drobnoustrojem w kolejnych badaniach u poszczególnych pacjentów nie było jednakowe, do oceny potencjalnego związku pomiędzy intensywnością inwazji i występowaniem objawów klinicznych posłużyły te próbki każdego pacjenta, w których obciążenie *Blastocystis* było najwyższe.

Wszyscy badani wypełniali kwestionariusz (przygotowany przez doktorantkę) dostarczający informacji nt. płci, wieku, historii podróży i ewentualnych dolegliwości.

Z próbek kału, w których wykryto *Blastocystis* zakładano hodowle na podłożu Jonesa wzbogacającym 10% dodatkiem surowicy bydlęcej. Po 48 godzinnej inkubacji w 37°C hodowle oglądano pod kątem obecności komórek *Blastocystis* pod mikroskopem

świetlnym przy użyciu obiektywu powiększającego 40x. Hodowle zawierające *Blastocystis* wirowano, dwukrotnie przemywano solą fizjologiczną, supernatant odrzucano, a osad zamrażano w -20°C do czasu ekstrakcji DNA.

W celu identyfikacji podtypów *Blastocystis* przeprowadzono STS-PCR ze starterami swoistymi dla siedmiu podtypów (ST1-ST7) (choć odnotowano już pojedyncze doniesienia o wykryciu u ludzi ST8 i ST9, to zaprojektowane przez Yoshikawę startery miały zdolność identyfikacji tylko ww. siedmiu (Yoshikawa i in., 2004b)).

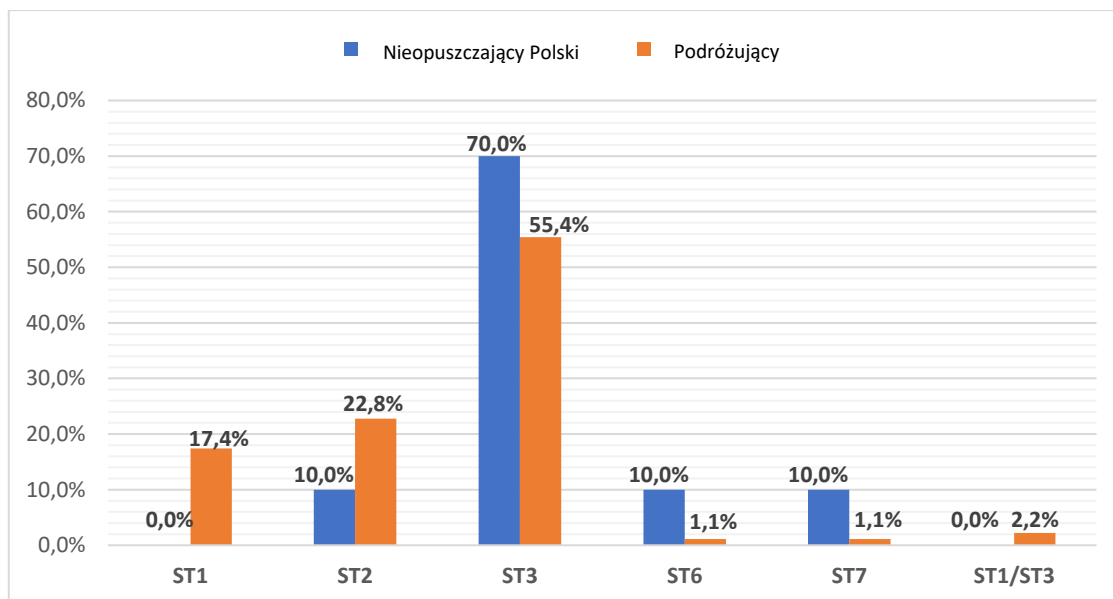
W analizowanej grupie pacjentów badanie ujawniło pięć podtypów *Blastocystis*: ST1, ST2, ST3, ST6 i ST7. Najliczniej występował ST3 (n = 72; 59,0%), a następnie ST2 (n = 24; 19,7%) i ST1 (n = 16; 13,1%). ST6 i ST7 zostały zidentyfikowane u 4 osób (3,3%) każdy. U dwóch osób (1,6%) stwierdzono mieszane infekcje ST1/ST3.

Istotną statystycznie różnicę ($p = 0,0008$) stwierdzono jedynie w występowaniu ST1, który został wykryty wyłącznie u podróżujących do strefy klimatu gorącego (Afryki i Azji), a nie występował u osób nieopuszczających Polski, co sugeruje możliwość przywlekania tego podtypu *Blastocystis* do Polski z podróży (ryc. 7). ST2 u w grupie podróżujących występował ponad dwa razy częściej niż u nigdy niewyjeżdżających z Polski, ale różnica nie była istotna statystycznie. ST2 dominował u osób powracających z Ameryki Południowej i Azji, a najmniejszą liczbę stwierdzono u osób powracających z Afryki.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych podtypów *Blastocystis* a długością pobytu w klimacie gorącym ($p = 0,4732$), płcią ($p = 0,134$) wiekiem badanych osób ($p = 0,5671$) ani obecnością lub brakiem dolegliwości ($p = 0,6549$).

Nie stwierdzono także, aby istniała zależność pomiędzy nasileniem inwazji a występowaniem dolegliwości ($p = 0,3205$), podróżami do strefy klimatu gorącego ($p = 0,4121$), długością takich pobytów ($p = 1$), jak również zasiedleniem przez poszczególne podtypy *Blastocystis* ($p = 0,1384$) czy wiekiem badanych osób (wartość $p = 0,6136$).

We wszystkich analizach za istotny statystycznie uznano poziom istotności $< 0,05$.



Rycina 7 Podtypy *Blastocystis* zidentyfikowane u osób podróżujących do strefy klimatu gorącego i nieopuszczających Polski (opracowanie własne).

Najważniejszą wartością badań będących przedmiotem tej pracy jest obserwacja, że nabywanie zarażeń niektórymi podtypami *Blastocystis* (tu ST2, a zwłaszcza ST1) mogą sprzyjać podróże do krajów /pobyty w krajach strefy klimatu gorącego. W obliczu rosnącej liczby osób podróżujących do różnych rejonów świata, jak i migrujących do lub przez Polskę, możliwość przywlekania *Blastocystis* przez podróżujących wymaga dalszych badań, do których niezbędne są precyzyjne dane dotyczące historii podróży z uwzględnieniem obecności i określeniu podtypu *Blastocystis* u osób podróżujących zarówno przed, jak i po zakończeniu podróży.

PRACA "FIRST REPORT ON THE OCCURRENCE AND SUBTYPES OF *BLASTOCYSTIS* IN PIGS IN POLAND USING SEQUENCE-TAGGED-SITE PCR AND BARCODE REGION SEQUENCING"

Poprawa warunków sanitarno-higienicznych oraz edukacja zdrowotna spowodowały istotny spadek liczby zarażeń pasożytniczych u ludzi, szczególnie w krajach rozwiniętych. Jednak zagrożeniem dla człowieka wciąż są pasożyty bytujące u zwierząt, ale potencjalnie chorobotwórcze dla ludzi. Rozprzestrzenianiu się odzwierzęcych inwazji pasożytniczych sprzyja rozwój agrobiznesu i hodowli zwierząt. Świnia domowa jest ważnym źródłem niebezpiecznych dla człowieka chorób odzwierzęcych takich jak włośnica, tasiemczyca, cysticerkoza, toksoplazmoza, glistnica czy balantydioza. Polska jest szóstym producentem wieprzowiny w Unii Europejskiej z pogłowiem trzody chlewnej na poziomie ponad 11 mln sztuk (w 2018 roku). Województwo pomorskie zajmuje piąte miejsce (po wielkopolskim, mazowieckim, łódzkim i kujawsko-pomorskim) pod względem koncentracji trzody chlewnej. Przegląd literatury pokazuje, że prewalencja *Blastocystis* u trzody chlewnej kształtuje się na stosunkowo wysokim poziomie (nierzadko >70%), a badanie świń i pracowników ferm świńskich w Australii pokazało, że może dochodzić do zarażenia ludzi *Blastocystis* pochodzącym od świń (Song i in., 2017; Wenqi Wang i in., 2014).

Spośród wielu technik molekularnych stosowanych w dotychczasowych badaniach zmienności genetycznej *Blastocystis* najczęściej wykorzystywane były dwie. Pierwsza tj. STS-PCR, z wykorzystaniem starterów swoistych dla poszczególnych podtypów *Blastocystis* (Yoshikawa i in., 2004a), opiera się na wykonywaniu oddzielnych reakcji PCR ze wszystkimi dostępnymi parami starterów STS dla każdej próbki i umożliwia wykrycie siedmiu podtypów *Blastocystis* (ST1-ST7) omijając potrzebę bardzo do niedawna kosztownego sekwencjonowania. Jej istotną zaletą jest możliwość wykrywania infekcji mieszanych. Druga, zwana „barcodingiem”, obejmuje analizę zmienności genu SSU rRNA. Podejście to zostało opracowane niezależnie przez różne grupy badaczy np. (Parkar i in., 2007; Santín i in., 2011; Scicluna i in., 2006), z których każda wykorzystywała jako markery różne regiony genu kodującego SSU rRNA. Barcoding regionu 600 pz umożliwia wykrycie wszystkich znanych i nowych

podtypów *Blastocystis*, i dalszą analizę różnorodności genetycznej w oparciu o sekwencjonowanie uzyskanych produktów PCR. Ponadto „barcode region Scicluny” wyznaczony starterami RD5 i BhRdr został zwalidowany jako marker ogólnej różnorodności genetycznej *Blastocystis*. Metoda zawodzi jednak w przypadkach inwazji mieszanych.

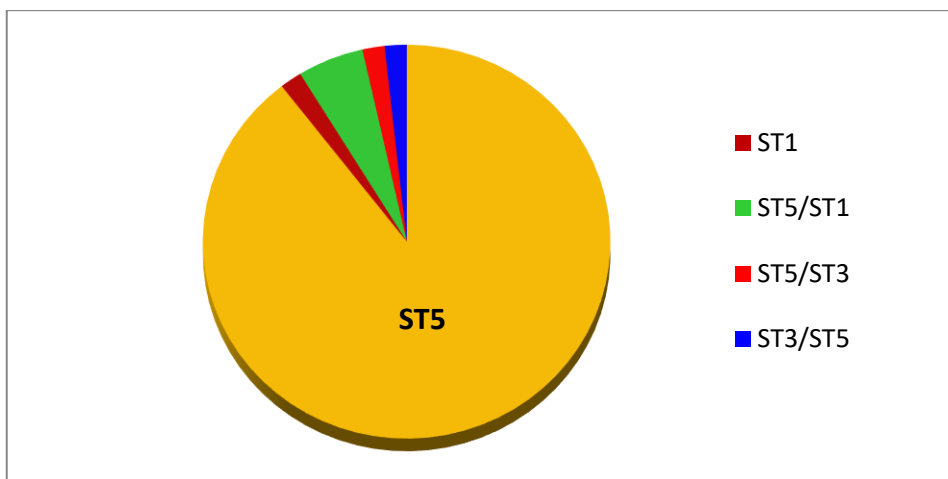
Celem niniejszej publikacji było przede wszystkim uzyskanie pierwszych danych na temat częstości zarażenia i podtypów *Blastocystis* występujących u trzody chlewnej w Polsce. Aby zwiększyć prawdopodobieństwo wykrycia wszystkich podtypów *Blastocystis* do badań wykorzystano obie ww. metody.

Materiał badawczy stanowiły próbki kału trzody chlewnej pozyskane z 14 ferm zlokalizowanych na terenie województwa pomorskiego w okresie od listopada 2017 do lutego 2018 roku. Próbkę pochodziły od 149 zwierząt, w tym 32 prosiąt (<4 tyg.), 18 warchlaków (1–3 mies.), 54 tuczników (3–9 mies.) i 45 loch (>12 miesięcy).

Wyniki uzyskane każdą z zastosowanych metod nie były zgodne. *Blastocystis* wykryto w 57 próbkach (38,25%) testowanych ze starterami STS i 56 (37,58%) za pomocą barcodingu. Zgodnie obiema zastosowanymi metodami *Blastocystis* wykryto w 43 próbkach (28,85%), podczas gdy w 14 (9,39%) wyłącznie przy użyciu STS-PCR, a w 13 (8,72%) wyłącznie przy użyciu „barcodingu”. Po zsumowaniu wyników uzyskanych każdą i obiema metodami, rzeczywista liczba próbek wykazujących obecność *Blastocystis* wyniosła 70 (46,97%). Jednak wszystkie zaobserwowane różnice nie były statystycznie istotne. W 79 próbkach (53,02%) *Blastocystis* nie został wykryty żadną metodą.

Ogólna prevalencja *Blastocystis* (uzyskana dzięki kombinacji obu metod) w analizowanej grupie świń wyniosła 46,97% (95CL:38,7–55,5%). Odsetek zarażonych zwierząt w poszczególnych grupach wiekowych różnił się, ale nie były to różnice statystycznie istotne (prosięta 50%, warchlaki 44,4%, tuczniaki 46,3%, lochy 46,7%).

U świń ze wszystkich grup wiekowych dominował ST5, a tylko u pojedynczych sztuk stwierdzono ST1 i infekcje mieszane ST5/ST1, ST5/ST3, ST3/ST1 (ryc.8).



Rycina 8 Udział podtypów *Blastocystis* występujących w badanej grupie trzody chlewnej (Rudzińska i in.; 2020).

Należy podkreślić, że badanie to jest pierwszym, które ocenia występowanie i podtypy *Blastocystis* u świń w Polsce. Wyraźna dominacja ST5 w każdej grupie wiekowej wskazuje, że świnie są naturalnym żywicielem ST5. Obserwacja, że infekcje mieszane (ST5/ST1, ST3/ST1) oraz ST1 nie występowały w grupie najmłodszych zwierząt, lecz u zwierząt starszych budzi podejrzenie, że ST3 i ST1 mogły być nabywane przez świnie podczas kontaktu z ludźmi. Wskazuje to na potrzebę dalszych badań próbek pochodzących od świń i ich opiekunów, co być może pozwoli ustalić kierunek transmisji drobnoustroju pomiędzy tymi grupami gospodarzy i ewentualną rolę świń w rozprzestrzenianiu tej infekcji na ludzi.

Wyniki pokazały również, że przy użyciu każdej z zastosowanych metod część zarażeń nie zostaje wykryta, co wskazuje na potrzebę poszukiwania takich technik, które umożliwią wykrywanie wszystkich przypadków zarażeń *Blastocystis*, także w infekcjach mieszanych.

PRACA “MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *BLASTOCYSTIS* FROM ANIMALS AND THEIR CAREGIVERS AT THE GDAŃSK ZOO (POLAND) AND THE ASSESSMENT OF ZONOTIC TRANSMISSION”

W kilku publikacjach wykazano, że wiele zwierząt zamieszkujących ogrody zoologiczne jest skolonizowanych przez *Blastocystis* oraz, że częsty kontakt ludzi ze zwierzętami stwarza ryzyko odzwierzęcej transmisji drobnoustroju (Abe i in., 2002; Cian i in., 2017; J. Li i in., 2019; X. D. Li i in., 2020; Parkar i in., 2010, 2007). Opiekunowie zwierząt z ogrodów zoologicznych mają stały i częsty kontakt ze zwierzętami, i co istotne, często jest to wieloletni kontakt z tymi samymi zwierzętami. Dlatego w tej pracy do oceny potencjalnej odzwierzęcej transmisji *Blastocystis* wybrano właśnie zwierzęta z ogrodu zoologicznego wraz z ich opiekunami. Analizie poddano częstość występowania oraz porównano sekwencje *Blastocystis* izolowanych od obu grup gospodarzy.

Materiał badawczy tj. 201 próbek kału od zwierząt i 35 próbek kału ludzkiego pozyskiwano od listopada 2018 do kwietnia 2019 roku. Produkty PCR uzyskane po amplifikacji metodą „barcodingu” zostały zsekwencjonowane metodą Sangera w Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu. Uzyskane sekwencje poddano analizie filogenetycznej.

Blastocystis został wykryty w 26,86% próbek od zwierząt i 17,14% próbek ludzkich. Najwyższą prevalencję *Blastocystis* zaobserwowano u dzików (80%) i pekari obrożnych (90%), a następnie 58,97% u małp, 34,78% u krętorogich, 6,66% u torbaczy i 41,66% u gadów. Wśród zwierząt zidentyfikowano osiem podtypów (ST1–ST3, ST5, ST8, ST10, ST13, ST14), w tym ST1–ST3 i ST13 tylko u małp, ST5 tylko u dzików i pekari, ST8 tylko u kangura, a ST10 i ST14 tylko u krętorogich (kozy, owce). U opiekunów zwierząt wykryto dwa podtypy (ST1 i ST3), i to te dwa ostatnie były wspólne dla ludzi i niektórych małp (ryc. 9).

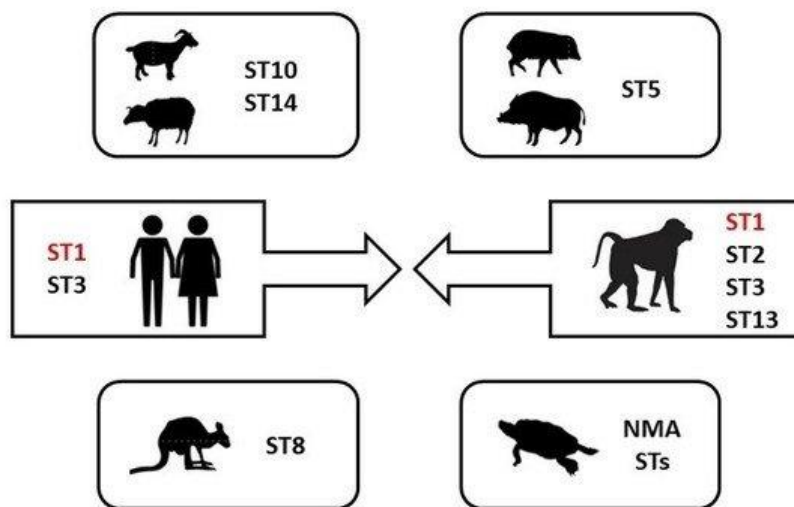
Najważniejsze spostrzeżenia płynące z tej pracy to obecność identycznych sekwencji ST1 u trzech małp i ich opiekuną, co potwierdza możliwość transmisji *Blastocystis* między tymi zwierzętami a człowiekiem, chociaż nie można ze 100% pewnością określić jej kierunku. To, że ST5, ST8, ST10 i ST14 występowały tylko u

określonych grup zwierząt wskazuje na wyższą swoistość żywicielską tych podtypów oraz, że ich przenoszenie między zwierzętami a ludźmi jest mniej prawdopodobne.

Warto zaznaczyć, że obecność ST5 u pekari, ST2 u małp patasów i ST8 u kangura rudego stwierdzono u tych zwierząt po raz pierwszy.

Warto też dodać, że wśród próbek zwierzęcych 12 pochodziło od gadów, które generalnie są bardzo słabo zbadane pod kątem *Blastocystis*. Tylko u żółwi (pięciu z sześciu badanych) wykryto *Blastocystis*, przy czym analiza filogenetyczna sekwencji tych izolatów oraz tych, które występują u ssaków i ptaków wykazała znaczny obszar rozbieżności między nimi, co może mieć źródło w rozbieżnościach ewolucyjnych między ich gospodarzami, co z pewnością wymaga dalszych badań.

Praca wniosła cenny wkład w poszerzenie wiedzy nt. transmisji *Blastocystis* między zwierzętami a ludźmi oraz roli różnych zwierząt jako rezerwuarów *Blastocystis*.



Rycina 9 Podtypy *Blastocystis* zidentyfikowane wśród zwierząt Gdańskiego Ogrodu Zoologicznego i ich opiekunów.

**5. KOPIE PRAC NAUKOWYCH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ ORAZ OŚWIADCZENIA
WSPÓŁAUTORÓW**

Diagnostyka laboratoryjna zarażeń *Blastocystis* – wyzwania i kontrowersje

Laboratory diagnostics of *Blastocystis* infections – challenges and controversies

Monika Rudzińska, Beata Kowalewska, Katarzyna Sikorska

Zakład Medycyny Tropikalnej i Epidemiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

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

Abstract

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

The article discusses the difficulties in diagnosing blastocystosis, and the methods used to detect *Blastocystis* in terms of their usefulness in a medical diagnostic laboratory.

Słowa kluczowe: *Blastocystis*, diagnostyka

Keywords: *Blastocystis*, diagnostics

Wprowadzenie

Taksonomia i nazewnictwo

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

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

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

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

Prewalencja

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

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

Dyskusyjna chorobotwórczość

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

Diagnostyka

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

Diagnostyka mikroskopowa

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

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

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

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

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

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

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

Diagnostyka serologiczna

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

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

Metody hodowlane

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

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

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

Badania molekularne

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

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

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

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

Kontrowersje diagnostyczno-kliniczne

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

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

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

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

Podsumowanie

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

Piśmiennictwo

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

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

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

Autor do korespondencji:

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

Nie zgłoszono sprzeczności interesów.

Otrzymano: 19.05.2019
Akceptacja do druku: 27.12.2019

Ocena częstości zarażeń pasożytami jelitowymi wśród pacjentów przychodni Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni w okresie ostatnich 30 lat

An evaluation of the intensity of intestinal parasitic infections among patients of Out-patient Division of Maritime and Tropical Medicine in Gdynia over last 30 years

Beata Kowalewska¹, Monika Rudzińska¹, Danuta Zarudzka², Andrzej Kotłowski¹

¹Zakład Medycyny Tropikalnej i Epidemiologii, Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku,

²Laboratorium Parazytologii, Uniwersyteckie Centrum Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni

Streszczenie

Zarażenia pasożytami jelitowymi stanowią wciąż istotny problem zdrowotny. Celem pracy była ocena dynamiki zmian w częstości zarażeń pasożytami jelitowymi w okresie ostatnich 30 lat. Przebadano łącznie 52118 pacjentów. Do badań kału wykorzystano klasyczne metody parazytologicznych badań koprologicznych. Intensywność zarażenia pasożytami jelitowymi w badanej populacji wykazała tendencję spadkową. Najczęściej wykrywanym pasożytem był *Blastocystis* sp. - jedyny pasożyt, którego częstość występowania ma tendencję wzrostową. Zaobserwowano spadek liczby osób zgłaszających się na koprologiczne badania parazytologiczne.

Summary

Infections with intestinal parasites are still a major health problem. The aim of the study was the evaluation of the dynamics of changes in the frequency of parasitic infections in the last 30 years. 52118 patients were examined. Stool samples were tested with the use of classic coprologic methods. Intensity of infection of human intestinal parasites has been decreasing. The most frequently detected was *Blastocystis* sp, which is the only parasite of which is increasing. There has been a decline in the number of people attending to parasitological stool examination.

Słowa kluczowe: epidemiologia, parazytozy przewodu pokarmowego, pasożyty jelitowe

Key words: epidemiology, gastrointestinal parasitic diseases, intestinal parasites

Wstęp

Zarażenia pasożytami jelitowymi stanowią wciąż istotny problem zdrowotny. Ryzyko zarażenia zależy od warunków środowiskowych, sanitarnych, socjalno-ekonomicznych i klimatycznych. Istotną rolę odgrywa świadomość zdrowotna osób narażonych. Celem pracy była ocena częstości występowania pasożytów jelitowych w badanej populacji w ciągu ostatnich 30 lat.

Materiał i metody

Oceniono częstość występowania pasożytów jelitowych człowieka w oparciu o wyniki badań koprologicznych pacjentów Wojewódzkiej Przychodni Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych, a od 2003 roku Przychodni Medycyny Morskiej, Tropikalnej i Chorób Zawodowych Uniwersyteckiego Cen-

trum Medycyny Morskiej i Tropikalnej (UCMMiT). Badania obejmowały osoby wyjeżdżające w celach zawodowych i turystycznych do różnych stref klimatycznych, jak i nieopuszczające granic Polski.

Badania kału przeprowadzono wykorzystując klasyczne metody koproscopowe: rozmaz w soli fizjologicznej, rozmaz w płynie Lugola, gruby Kato-Miury oraz techniki dekantacji i flotacji wg Fulleborna. Ponadto wykonywano wymazy okołoodbytnicze metodą NIH w celu wykrycia *Enterobius vermicularis*. U osób powracających z rejonów tropikalnych i subtropikalnych dodatkowo prowadzono hodowle w kierunku obecności larw nicieni. Ponadto wykonywano badania komercyjnymi zestawami testowymi na obecność koproantygenów *Giardia intestinalis* i *Entamoeba histolytica*. Każdy pacjent badany był trzykrotnie w odstępach kil-

ku dniowych. W przypadku osób powracających z rejonów tropikalnych oraz osób, u których uzyskano wyniki ujemne stosowane było dodatkowe badanie po podaniu środków przeczyszczających. Rozmazy oglądano w mikroskopie świetlnym przy użyciu obiektywu powiększającego 10x i 40x. Do badań używano świeżego, nieutrwalonego kału. W opracowaniu pominięto helminty i pierwotniaki występujące sporadycznie w badanym materiale.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej przy pomocy oprogramowania Statistica (Statsoft 9,0). Dla każdego okresu badań wyliczono wskaźnik struktury zarażeń w stosunku do liczby przebadanych osób. Wyliczeń dokonano dla wszystkich opisywanych pierwotniaków i helmintów. Do weryfikacji istotności wskaźników struktury wykorzystano test Fishera-Snedecora (F).

Wyniki

Łącznie przebadano 52118 pacjentów. Zaobserwowano wyraźny spadek liczby osób zgłaszających się na badania w drugiej i trzeciej dekadzie omawianego okresu. Ciąg analizowanych danych podzielono na 3 okresy:

1. 1978-1989

2. 1990-1999

3. 2000-2010

Ze względu na niekompletne dane z analizy wyeliminowano lata: 1983, 1984, 1994, 1995 oraz rok 2000 i 2003.

W tabeli I przedstawiono liczbę i odsetek osób z dodatnimi wynikami badań parazytologicznych w poszczególnych latach z podziałem na trzy okresy. W pierwszym okresie badań odsetek osób, u których wykryto pasożyty jelitowe wynosił średnio 19,3%. Widać jednak wyraźną różnicę w odsetku zarażonych osób w pierwszej i drugiej połowie tego okresu, odpowiednio: 20,7% i 17,9%. W drugim okresie, począwszy od roku 1992 badania rozszerzono o wykrywanie *Blastocystis* sp., czego nie czyni się w większości laboratoriów, stąd w drugim i trzecim analizowanym okresie podano częstość zarażenia łącznie z *Blastocystis* sp. i bez tego pasożyta dla ułatwienia porównania z wynikami z innych placówek. Przy

uwzględnieniu *Blastocystis* sp. średni odsetek zarażonych w drugim i trzecim okresie był taki sam i wynosił 22,9%, a wskaźnik struktury zarażeń pasożytami jelitowymi w przeciągu badanych lat wykazał lekką tendencję rosnącą, co było znamienne statystycznie. Jeśli nie uwzględni się *Blastocystis* sp. widoczny jest wyraźny spadek częstości zarażeń: średnio 17,4% w drugim i 7,9% w ostatnim dziesięcioleciu, co przedstawia ryc.1.



Rycina 1. Odsetek osób, u których wykryto pasożyty z uwzględnieniem i bez uwzględnienia zarażeń *Blastocystis* sp

W tabelach II i III zestawiono liczbę wykrytych pasożytów, która w części przypadków przewyższa liczbę pacjentów ze stwierdzonymi pasożytami, gdyż u części badanych wykrywano po kilka gatunków pasożytów.

Tabela II przedstawia częstość występowania pierwotniaków jelitowych. W pierwszym okresie badań (1978-1989) wykryto najwięcej zarażeń *G. intestinalis* (od 1,98% do 5,19%), a następnie *D. fragilis* (od 1,21% do 3,89%). Zarażenia *E. histolytica* i *J. bütschli* przez większość lat omawianego okresu utrzymywały się na poziomie poniżej 1%. W tym okresie nie rejestrowano jeszcze zarażeń *Blastocystis* sp. W drugim okresie (1990-1999) najczęściej stwierdzanym pierwotniakiem był *Blastocystis* sp. (od 1,34% do 10,15%). Kolejne pozycje pod względem wielkości zarażeń zajęły *D. fragilis* (od 2,48% do 4,98%) i *G. intestinalis* (od

Tabela I. Częstość występowania pasożytów jelitowych w badanej grupie pacjentów w latach 1978-2010.

I okres				II okres				III okres				
rok	L.zb	L(+)	%	rok	L.zb	L(+)	%	rok	L.zb	L(+)	%	
bez B.sp				z B.sp				bez B.sp				
1978	2679	496	18,5	1990	1984	464	23,3	2001	925	210	22,7	
1979	3233	630	19,5	1991	1742	418	23,9	2002	1028	224	21,7	
1980	3770	760	20,2	1992	1409	293	20,7	19,4	2004	1334	306	22,9
1981	3424	700	20,4	1993	1314	298	22,6	18,5	2005	1456	315	21,6
1982	2857	706	24,7	1996	1330	347	26	15,9	2006	1170	287	24,5
1985	2714	371	13,6	1997	1355	284	20,9	10,9	2007	1515	303	20
1986	2285	625	27,3	1998	1505	318	21,1	12,8	2008	1571	376	23,9
1987	3428	506	14,7	1999	854	204	23,8	14,6	2009	1351	317	23,4
1988	2567	410	15,9						2010	1164	295	25,3
1989	2154	392	18,1									

B.sp. – *Blastocystis* sp.; L.zb - liczba osób zbadanych; L(+) - liczba osób z wynikiem dodatnim

Tabela II. Występowanie pierwotniaków jelitowych w badanej grupie pacjentów w latach 1978-2010.

	<i>Entamoeba histolytica</i>		<i>Entamoeba coli</i>		<i>Entamoeba hartmani</i>		<i>Endolimax nana</i>		<i>Dientamoeba fragilis</i>		<i>Jodamoeba butschli</i>		<i>Giardia intestinalis</i>		<i>Blastocystis sp.</i>	
	L(+)	%	L(+)	%	L(+)	%	L(+)	%	L(+)	%	L(+)	%	L(+)	%	L(+)	%
I okres																
1978	22	0,82	98	3,65	20	0,74	128	4,77	47	1,75	14	0,52	111	4,14	nw	
1979	19	0,58	113	3,49	48	1,48	203	6,27	65	2,01	4	0,12	114	3,52	nw	
1980	22	0,58	133	3,52	41	1,08	169	4,48	62	1,64	11	0,29	112	2,97	nw	
1981	11	0,32	127	3,71	51	1,48	210	6,13	47	1,37	6	0,17	178	5,19	nw	
1982	17	0,59	140	4,9	42	1,47	159	5,56	104	3,64	5	0,17	108	3,78	nw	
1985	12	0,44	85	3,13	25	0,92	100	3,68	33	1,21	4	0,14	57	2,1	nw	
1986	36	1,57	126	5,51	32	1,4	172	7,52	89	3,89	15	0,65	63	2,75	nw	
1987	32	0,93	104	3,03	64	1,86	117	3,41	65	1,89	21	0,61	71	2,07	nw	
1988	35	1,36	101	3,93	63	2,45	114	4,44	65	2,53	4	0,15	51	1,98	nw	
1989	15	0,69	93	4,31	56	2,59	111	5,15	62	2,87	6	0,27	59	2,73	nw	
II okres																
1990	19	0,95	125	6,3	39	1,96	99	4,98	99	4,98	3	0,15	41	2,06	nw	
1991	8	0,46	88	5,05	11	0,63	72	4,13	71	4,07	3	0,17	41	2,35	nw	
1992	11	0,78	65	4,61	12	0,85	23	1,63	35	2,48	0	0	25	1,77	19	1,34
1993	22	1,67	68	5,17	8	0,6	29	2,2	43	3,27	3	0,22	22	1,67	55	4,18
1996	6	0,45	67	5,03	1	0,07	45	3,38	56	4,21	2	0,15	19	1,43	135	10,15
1997	9	0,66	59	4,35	2	0,14	32	2,36	34	2,51	3	0,22	13	0,96	136	10,0
1998	9	0,6	77	5,12	8	0,53	38	2,52	45	2,99	2	0,13	20	1,33	126	8,37
1999	6	0,7	41	4,8	1	0,11	22	2,57	35	4,09	6	0,7	18	2,1	79	9,25
III okres																
2001	2	0,21	50	5,4	0	0	28	3,02	15	1,62	1	0,1	10	1,08	96	10,37
2002	6	0,58	57	5,54	4	0,39	29	2,82	30	2,91	1	0,09	17	1,65	88	8,56
2004	9	0,67	46	3,44	1	0,07	36	2,69	42	3,14	2	0,15	13	0,97	195	14,06
2005	3	0,2	59	4,05	0	0	36	2,47	21	1,44	2	0,13	13	0,89	205	14,07
2006	4	0,34	48	4,1	0	0	46	3,93	28	2,39	3	0,25	10	0,85	205	17,52
2007	6	0,39	49	3,23	0	0	48	3,16	25	1,65	2	0,13	19	1,25	234	15,4
2008	5	0,31	60	3,82	2	0,12	39	2,48	26	1,65	1	0,06	15	0,95	284	18,0
2009	7	0,51	62	4,59	0	0	48	3,55	12	0,88	4	0,29	12	0,88	239	17,69
2010	4	0,34	52	4,46	1	0,08	44	3,78	18	1,54	4	0,34	17	1,46	219	18,8

L(+)- liczba wyników dodatnich; nw - badań nie wykonywano

0,96% do 2,35%). Zarażenia *E. histolytica* i *J. bütschli* pozostają na poziomie z poprzedniego okresu tj. poniżej 1%. W trzecim okresie badań (2001-2010) daje się zauważyć wyraźną dominację oraz wzrost zarażeń *Blastocystis sp.* (od 8,56% do 18,8%). Ilość zarażeń *D. fragilis* w porównaniu z poprzednim okresem wyraźnie spadła (wahając się w różnych latach od 0,88% do 3,14%), ale mimo to była nieznacznie wyższa od *G. intestinalis*, której odsetek nieznacznie spadł w porównaniu z poprzednim okresem (od 0,85% do 1,65%). Zarażenia *E. histolytica* i *J. bütschli* utrzymywały się na poziomie poniżej 1%, przy czym liczba pacjentów zarażonych *E. histolytica* była dwukrotnie mniejsza niż w obu poprzednich okresach. Spośród pierwotniaków niepatogenicznych najczęściej notowano obecność *E. coli* - wielkość zarażenia w całym badanym okresie była zrównoważona i kształtowała się na poziomie od 3,91% w pierwszym okresie badań, poprzez wzrost do 5,05%

w drugim i spadek do 4,29% w ostatnim 10-leciu. Średni poziom zarażenia *E. nana* był nieznacznie niższy od *E. coli* i wynosił 5,14% w pierwszym badanym okresie, a następnie obniżył się do ok. 3% w drugim i trzecim okresie badań. Odsetek zarażeń *E. hartmani* był najniższy i wykazywał stałą tendencję spadkową od średnio 1,54% w pierwszym do 0,07% w trzecim okresie badań.

W tabeli III zestawiono częstość zarażeń czterema najliczniej wykrywanymi helmintami jelitowymi. Wśród zbadanych pacjentów w ciągu 30 lat w każdym analizowanym okresie dominowało zarażenie *Taenia sp.* od średnio 2,32% w pierwszym okresie, poprzez wzrost do 4,27% w drugim i spadek do 1,47% w trzecim. Na drugim miejscu było zarażenie *E. vermicularis* od średnio 1,81% w pierwszym okresie, poprzez wzrost do 2,41% w drugim i spadek do 0,93% w trzecim okresie. Zarażenia *T. trichiura* i *A. lumbricoides* w każdym badanym okresie wynosiły średnio mniej niż 1%, przy

Tabela III. Występowanie robaków jelitowych w badanej grupie pacjentów w latach 1978-2010.

	<i>Enterobius vermicularis</i>		<i>Ascaris lumbricoides</i>		<i>Trichuris trichiura</i>		<i>Taenia sp</i>	
	L(+)	%	L(+)	%	L(+)	%	L(+)	%
I okres								
1978	78	2,91	1	0,03	45	1,67	0	0
1979	34	1,05	7	0,21	49	1,51	3	0,09
1980	52	1,37	3	0,07	43	1,14	164	4,35
1981	25	0,73	6	0,17	46	1,34	88	2,57
1982	171	5,98	18	0,63	21	0,73	102	3,57
1985	23	0,84	7	0,25	30	1,1	56	2,06
1986	41	1,79	8	0,35	32	1,4	122	5,33
1987	49	1,42	3	0,08	12	0,35	71	2,07
1988	42	1,63	3	0,11	8	0,31	27	1,05
1989	9	0,41	2	0,09	6	0,27	45	2,08
II okres								
1990	50	2,52	1	0,05	5	0,25	69	3,47
1991	48	2,75	1	0,05	8	0,46	122	7
1992	47	3,33	9	0,63	12	0,85	85	6,03
1993	20	1,52	3	0,22	10	0,76	68	5,17
1996	40	3	12	0,09	12	0,9	41	3,08
1997	31	2,28	9	0,66	12	0,88	35	2,58
1998	23	1,53	6	0,4	13	0,86	45	2,99
1999	20	2,34	1	0,11	2	0,23	33	3,86
III okres								
2001	22	2,37	2	0,21	2	0,21	33	3,56
2002	11	1,07	4	0,39	4	0,39	30	2,91
2004	18	1,35	2	0,15	0	0	24	1,8
2005	16	1,09	0	0	0	0	25	1,71
2006	8	0,68	0	0	1	0,08	13	1,11
2007	5	0,33	4	0,26	1	0,06	10	0,66
2008	8	0,51	1	0,06	0	0	9	0,57
2009	7	0,51	1	0,07	0	0	6	0,44
2010	5	0,43	2	0,17	1	0,08	6	0,51
2002	22	2,37	2	0,21	2	0,21	33	3,56

L(+) liczba wyników dodatnich

czy w pierwszym i drugim wykrywano więcej *T. trichiura*. W ostatnim dziesięcioleciu średni odsetek zarażeń tym pasożytem znacząco zmalał do 0,02% i był mniejszy od częstości zarażeń *A. lumbricoides* - 0,14%. W tabeli nie uwzględniono helmintów, które wykrywane były sporadycznie: *Ancylostoma duodenale/Necator americanus* - 26, *Diphyllobotrium latum* - 8, *Hymenolepis nana* - 7, *Strongyloides stercoralis* - 7, *Schistosoma mansoni* - 3 i *Trichostrongylus sp* - 2 przypadki w całym badanym okresie.

Różnice w poziomie wskaźników struktury zarażeń wszystkimi pasożytami wymienionymi w tabeli I i II w poszczególnych okresach były statystycznie znamienne.

Dyskusja

Z danych piśmiennictwa wynika, że rutynowe badania koprologiczne w kierunku obecności pasożytów jelitowych prowadzone są w wielu laboratoriach, zarówno przy szpitalnych, stacjach sanitarno-epidemiologicznych, jak i laboratoriach

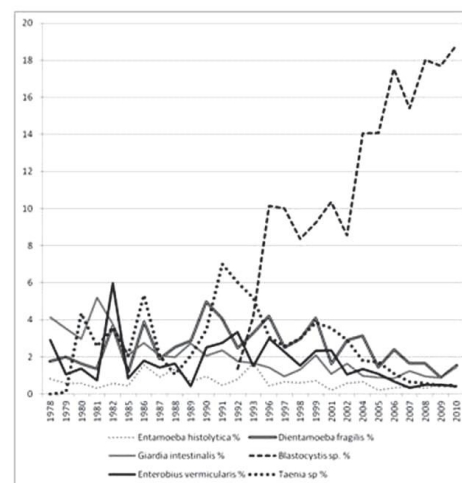
prywatnych. Uzyskiwane wyniki często różnią się znacznie w zależności od regionu, badanej populacji (dzieci, dorośli, po powrocie z tropiku, z dolegliwościami lub bez), a także od stosowanych metod diagnostycznych np. dodatkowo stosowane wycierki w kierunku *E. vermicularis* powodują wzrost wykrywalności tego nicienia. W laboratorium IMMIT badane były przeważnie osoby dorosłe, w tym także powracające z różnych stref klimatycznych.

Większość badań dotyczących zarażeń pasożytami jelitowymi ludzi dotyczy krótkich, co najwyżej kilkuletnich okresów [1, 2-6]. Wyniki podobne do naszych obejmujące 30 letni okres badań przedstawił Grzybek i wsp [7]. Wynika z nich, że ilość zarażeń pasożytami jelitowymi spadała sukcesywnie od średnio 15,4% w latach 60-tych do 6,7% w latach 80-tych. Podobnie, spadek zarażeń zaobserwowała Zaródzka [8] porównując wyniki badań z terenu Wrocławia z lat 60-tych, gdzie odsetek zarażonych kształtował się na poziomie 11,6% z własnymi badaniami prowadzonymi w la-

tach 80-tych, w których częstość zarażenia wynosiła 8,8%. Długoletnie obserwacje dotyczące występowania pierwotniaków wśród ludności Wielkopolski opisuje Kasprzak [9]. W badaniach tych prowadzonych w latach 1963-1986 autor stwierdził wyraźny spadek częstości zarażenia wszystkimi pierwotniakami jelitowymi. W badaniach autorów widać utrzymujący się poziom częstości zarażeń pasożytniczych w ciągu badanych 30 lat, a w ostatnich latach nawet lekką tendencję wzrostową. Jednakże w naszym ośrodku od roku 1992 badania rozszerzono o wykrywanie *Blastocystis* sp., czego nie czyni się w większości laboratoriów. Stąd właśnie w drugim i trzecim analizowanym okresie widoczna jest lekka tendencja wzrostowa. Jeżeli nie uwzględni się *Blastocystis* sp., to widoczny jest wyraźny spadek częstości zarażeń pasożytniczych: średnio 17,4% w drugim i 7,9% w trzecim dziesięcioleciu, co jest zgodne z doniesieniami innych polskich autorów.

Blastocystoza stanowi trudny diagnostycznie i klinicznie problem niedoceniany nie tylko przez gastroenterologów, ale również w gronie parazytologów klinicznych. Ma to swoje źródło w trudnościach diagnostycznych wynikających z różnorodności form rozwojowych pasożyta i jego nietrwałości. Zarażenie tym pierwotniakiem charakteryzuje się niezwykle zróżnicowanym obrazem klinicznym od bezobjawowych inwazji do różnego nasilenia objawów ogólnych i zaburzeń przewodu pokarmowego. Występowanie wielu genotypów *Blastocystis* sp. o różnym stopniu patogeniczności dodatkowo sprzyja niedoszacowaniu jego znaczenia klinicznego. Niektórzy badacze uważali do niedawna *Blastocystis* za komensala lub organizm oportunistyczny, stąd wiele laboratoriów wciąż nie uwzględnia tego pasożyta w swoich badaniach [10]. Od lat 90-tych XX wieku zaczął przeważać pogląd, że blastocystoza może być przyczyną szeregu dolegliwości zarówno ze strony przewodu pokarmowego, jak i pozajelitowych [11, 12, 13]. Od momentu kiedy autorzy zaczęli diagnozować i rejestrować zarażenia *Blastocystis* sp. obserwuje się stały wzrost liczby pacjentów z tym pierwotniakiem, co przedstawiono na ryc. 2.

Podobnie jak *Blastocystis* sp., często nie uwzględnianym w badaniach pierwotniakiem jest *D. fragilis*. Jego znaczenie w wywoływaniu m.in. zespołu jelita drażliwego znajduje potwierdzenie w coraz większej ilości badań [13, 14]. Częste trudności w wykryciu *D. fragilis* w niektórych laboratoriach mogą wynikać z faktu występowania tego pierwotniaka tylko w nietrwalej formie trofozoitu i mylenia go na przykład z leukocytami. Z tych powodów stwierdzany jest w niewielkich ilościach i w większości opracowań zostaje zakwalifikowany do wspólnej grupy zarażeń innymi pełzakami. W naszych badaniach zarażenie *D. fragilis* kształtowało się na podobnym poziomie jak zarażenie *G. intestinalis* i podobnie wykazywało tendencję spadkową. Z dostępnych polskich doniesień jedynie u Kasprzaka znajdują się dane dotyczące tych zarażeń i wskazujące na znaczny spadek występowania *D. fragilis* - od kilkunastu procent na początku lat 60-tych do mniej niż 1% w latach 80-tych [9].



Rycina 2. Zmiany w częstości występowania najczęściej wykrywanych pasożytów jelitowych na przestrzeni lat 1978-2010

Jedną z częściej występujących na świecie chorób pasożytniczych przewodu pokarmowego jest giardioza. W Polsce rozpowszechnienie zarażenia *G. intestinalis* jest bardzo zróżnicowane, zależnie od regionu, badanej populacji, zastosowanych metod badawczych i kształtuje się od wartości poniżej 1% [3, 4] do nawet kilkunastu procent [1, 2]. W naszych badaniach daje się zauważyć spadek zarażeń *G. intestinalis*: w pierwszym okresie badań średnie zarażenie wynosiło 3,12%, w drugim 1,71% i 1,1% w ostatnim dziesięcioleciu. Zaobserwowana tendencja spadkowa pozostaje w zgodzie z wynikami Grzybka [7] i Zaródkziej [8].

E. histolytica jest chorobotwórczym pełzakiem wywołującym amebozę. Mimo, że uważany jest za pierwotniaka o zasięgu ogólnosiwiatowym, to większość przypadków pełzakowicy notuje się na obszarach tropikalnych i subtropikalnych. Zarażenia objawowe wywoływane są inwazją *E. histolytica sensu stricto*, natomiast zarażenia bezobjawowe są wynikiem inwazji pierwotniakiem *E. dispar* (*E. histolytica sensu lato* – morfologicznie nieodróżnialnym od *E. histolytica sensu stricto*). W Polsce zarażenie tym pasożytem jest niskie [2, 3, 6, 7]. Według dostępnych danych waha się od 0,01% do 0,1% i dotyczy głównie osób wyjeżdżających do krajów tropikalnych. Uzyskane przez nas wyniki były wyższe, choć średnio też nie przekraczały 1%. Może to wynikać z faktu, iż specyfiką naszego ośrodka jest badanie osób powracających z różnych stref klimatycznych. Niektórzy autorzy wydzielają osoby powracające z tropiku jako osobną grupę. Wyliczony w ten sposób odsetek osób zarażonych *E. histolytica* osiąga wielkości rzędu nawet kilku procent, jednakże wynika to z faktu, że grupy te obejmują niewiele osób - od kilkunastu do maksymalnie kilkudziesięciu w przeciągu roku - to sprawia że wykrycie pasożyta nawet w kilku przypadkach w tak małej grupie daje wysoki odsetek zarażenia [3, 6]. W naszych badaniach do początku lat 90-tych stwierdzano od kil-

kunastu do kilkudziesięciu przypadków w roku, a w ostatnim 10-leciu po kilka takich zarażeń rocznie. W wielu ośrodkach są to całkowicie pojedyncze przypadki [2, 3, 6].

Spośród pierwotniaków niechorobotwórczych autorzy najczęściej wykrywali *E. coli* ze średnim zarażeniem utrzymującym się na ustabilizowanym poziomie w kolejnych badanych okresach (3,91%, 5,05% i 4,29%). Następnym dość licznie stwierdzanym pierwotniakiem, na poziomie zbliżonym do *E. coli*, była *E. nana*, ale w tym przypadku zaobserwowano lekką tendencję spadkową częstości zarażeń. Wyraźny spadek zarażeń w kolejnych okresach widać natomiast w przypadku *E. hartmani* od średnio 1,54% w pierwszym 10-leciu do 0,07% w ostatnich latach. Większość autorów nie uwzględnia pierwotniaków niechorobotwórczych w przedstawianych zestawieniach. Spośród niewielu dostępnych prac najczęściej znaleźć można dane dotyczące obecności *E. coli*. Jedynie w danych przytoczonych przez Grzybka [7] z lat 70 i 80. częstość występowania *E. coli* ma podobnie wysoki poziom jak u autorów. W pozostałych pracach [2, 3, 6] ilość stwierdzanych przypadków zarażeń pierwotniakami niepatogenicznymi nie przekracza 1% (wahając się od 0 do 0,89%). Najczęściej wykrywanym był również *E. coli*.

W Polsce istotne znaczenie epidemiologiczne mają zarażenia *Enterobius* i *Taenia*. W naszym laboratorium najczęściej wykrywano jaja *Taenia* sp., a w następnej kolejności *E. vermicularis*. Stoi to w sprzeczności z doniesieniami innych autorów, gdzie najwyższa częstość zarażenia występuje w przypadku owsicy [1, 2, 3, 6]. Ten stosunkowo duży odsetek zarażeń tasiemcem prawdopodobnie wynikał z tego, iż w naszej placówce przez wiele lat funkcjonowała dzienna izba kuracji p/tasiemcowej, stąd więcej pacjentów kierowanych z podejrzeniem tasiemczycy i więcej wykryć tego pasożyta. Tak, jak we wszystkich doniesieniach obserwuje się jednak stały spadek częstości zarażeń tasiemcami, a potwierdzeniem obserwowanej tendencji są dane PZH z lat 1997-2006, z których niezbieżnie wynika, że w Polsce z roku na rok maleje liczba zgłaszanych osób zarażonych tasiemcem nieuzbrojonym od 634 przypadków w roku 1997 do 97 w 2006 [15].

Częstość zarażenia *E. vermicularis* w Polsce waha się od kilku do kilkudziesięciu procent. Najwyższe wartości, rzędu kilkunastu, a nawet kilkudziesięciu procent przedstawiają autorzy badań obejmujących głównie dzieci: Lonc [2] 34,7%, Kopczyńska [1] 25%, Biaduń [16] ponad 40% w latach 80-tych i 29,8% w latach 90-tych. Odsetek zarażonych dorosłych również wykazuje duże wahania w zależności od regionu i badanej grupy od poniżej 0,5% do ponad 7% [1, 3, 7, 8]. W naszych obserwacjach widoczny był spadek częstości zarażenia tym pasożytem od średnio ponad 2% w latach 80 i 90-tych do zaledwie 0,5% w latach 2006-2010. Podobną tendencję spadkową przedstawia Bitkowska [17] w badaniach u dzieci: z 18% zarażonych w latach 1992/93 do 12% w latach 2002/03. Stosunkowo niska częstość występowania *E. vermicularis* w badaniach autorów może być spowo-

dowana mniejszą liczbą dzieci w badanej populacji.

Zarażenia *T. trichuris* i *A. lumbricoides* rzadko były obserwowane wśród naszych pacjentów. W obu zwraca uwagę niski stopień zarażeń (poniżej 1%) przy czym liczba przypadków askariozy nie zmieniała się istotnie w poszczególnych latach pierwszej i drugiej dekady badań, kiedy notowano od kilku do kilkunastu przypadków w roku, a dopiero w ostatnim dziesięcioleciu nastąpił wyraźny spadek (od 0 do 4 przypadków w roku). Liczba przypadków trichuriozy wykazywała zaś wyraźny spadek w badanym okresie. W latach 1978-1986 wykrywano 30-40 przypadków w ciągu roku, następnie - do końca lat 90-tych notowano kilka do kilkunastu przypadków rocznie (od 5 do 13), natomiast w ostatniej dekadzie były to już tylko pojedyncze zarażenia lub ich brak. Doniesienia innych autorów dotyczące zarażenia *T. trichiura* są zbieżne - odsetek wykrywanych rocznie zarażeń nie przekracza 0,2%. Doniesienia na temat askariozy wykazują większą rozbieżność: od 0,03% [3, 4] do nawet 3% [2], ale wszyscy autorzy są zgodni co do stałej tendencji spadkowej liczby zarażeń tym pasożytem. Duża rozbieżność w ilości wykrywanych przypadków *A. lumbricoides* może być spowodowana tym, że rozpoznawanie niezapłodnionych jaj *A. lumbricoides* jest trudne i nierzadkie są błędy diagnostyczne będące przyczyną nadwykrywalności zarażeń tym helmintem.

Podsumowując przedstawione dane daje się zauważyć spadek częstości występowania pasożytów jelitowych wśród zgłaszających się na badania. Wyjątek stanowi *Blastocystis* sp., w przypadku którego ilość diagnozowanych zarażeń ma wyraźną tendencję wzrostową. Obecnie jest to najczęściej wykrywany pasożyt.

Ze względu na zmniejszającą się liczbę osób kierowanych na badania koprolologiczne można podejrzewać, że dane dotyczące częstości występowania pasożytów jelitowych u ludzi mogą być niedoszacowane.

Wnioski

1. Częstość zarażenia pasożytami jelitowymi w badanej populacji wykazuje tendencję spadkową w obserwowanym okresie.
2. Obecnie najczęściej wykrywanym pasożytem jest *Blastocystis* sp. Był to jedyny pasożyt, którego częstość występowania wykazała tendencję wzrostową.
3. Z powodu spadku liczby osób kierowanych na koproskopolowe badania parazytologiczne stwierdzana częstość zarażeń pasożytami przewodu pokarmowego może być niedoszacowana.
4. Obniżająca się liczba pacjentów, u których wykrywane są pasożyty jelitowe nie zwalnia lekarzy od poszukiwania pasożytów jako czynników etiologicznych dolegliwości układu pokarmowego.

Piśmiennictwo

1. Kopczyńska-Maślej J. Parazyty jelitowe w świetle własnych spostrzeżeń. *Wiad Parazytol* 2001; 47: 405-409.
2. Lonc E, Okulewicz A, Kopczyńska-Maślej J i wsp. Pasożyty jelitowe u mieszkańców Wrocławia i Wałbrzycha. *Wiad Parazytol* 1999; 45: 75-81.
3. Nowak P, Jochymek M, Pietrzyk A. Występowanie pasożytów jelitowych człowieka w wybranych populacjach na terenie Krakowa w latach 2000-2006 na podstawie badań parazytologicznych kału przeprowadzonych w Laboratorium Parazytologii Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej. *Wiad Parazytol* 2007; 53: 285-293.
4. Prokopowicz D, Boroń P. Występowanie i obraz kliniczny parazytów u pacjentów Kliniki Chorób Zakaźnych AM w Białymstoku w latach 1975-1986. *Wiad Parazytol* 1988; 2: 197-207.
5. Schabowski J, Skrzydło-Radomańska B, Daniluk J. Parazyty przewodu pokarmowego u pacjentów Kliniki Gastroenterologii Akademii Medycznej i Oddziału Klinicznego Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie w latach 1981-1990. *Wiad Parazytol* 1993; 39: 373-381.
6. Spausta G, Gorczyńska D, Ciarkowska J i wsp. Występowanie pasożytów człowieka w wybranych populacjach na przykładzie badań przeprowadzonych w Śląskiej Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej. *Wiad Parazytol* 2005; 51: 29-34.
7. Grzybek A, Spausta G, Ciarkowska J i wsp. Częstość występowania pasożytów przewodu pokarmowego u pacjentów leczonych w Klinice Chorób Wewnętrznych Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze. *Wiad Parazytol* 1998; 44: 705-713.
8. Zaródzka Z, Lonc E. Ekstensywność zarażenia pasożytami jelitowymi mieszkańców Wrocławia. *Wiad Parazytol* 1987; 6: 707-712.
9. Kasprzak W, Mazur T, Karlewiczowa R. Występowanie *Entamoeba histolytica* i innych pierwotniaków jelitowych wśród ludności Wielkopolski w okresie ostatnich 30 lat. *Wiad Parazytol* 1989; 6: 535-545.
10. Kottowski A. Blastocystoza – próba oceny objawów klinicznych i skuteczności leczenia metronidazolem w przypadkach różnych stopni intensywności inwazji pasożytniczej oraz izolowanych genotypów *Blastocystis* sp. u Polaków powracających z tropiku i nieopuszczających kraju. Praca habilitacyjna. *Ann Acad Med Ged* 2012; T.XLII supl.3.
11. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM et al. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect* 2009; 137, 1655-1663.
12. Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 1996; 4: 563-581.
13. Yakoob J, Jafri W, Beg MA et al. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res* 2010; DOI 10.1007/s00436-010-1918-7
14. Hussein EM, Al-Mohammed HI, Hussein AM. Genetic diversity of *Dientamoeba fragilis* isolates of irritable bowel syndrome patients by high resolution melting-curve (HRM) analysis. *Parasitol Res* 2009; DOI 10.1007/s00436-009-1515-9
15. Waloch M, Sobolewska A, Dziębski T.H. Analiza sytuacji epidemiologicznej tasiemczyc w Polsce w latach 1997-2006 na podstawie danych z wojewódzkich stacji san-epid. *Przegl Epidemiol* 2010; 64: 533-536.
16. Biaduń W, Chykowski J, Rukasz H i wsp. Występowanie pasożytów jelitowych u dzieci w makroregionie lubelskim w latach 1976-2000. *Wiad Parazytol* 2001; 47: 417-422.
17. Bitkowska E, Wnukowska N, Wojtyński B i wsp. Analiza występowania pasożytów jelitowych u dzieci klas pierwszych w Polsce w roku szkolnym 2002/2003. *Przegl Epidemiol* 2004; 58: 295-302.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Andrzej Kotłowski
Zakład Medycyny Tropikalnej i Epidemiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
81-519 Gdynia, ul. Powstania Styczniowego 9B
tel. 58 3491760, fax 58 622 33 54
e-mail: akotl@gumed.edu.pl

Zaakceptowano do publikacji: 08.03.2013



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Research paper

Blastocystis subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland – A single center study

Monika Rudzińska^{a,*}, Beata Kowalewska^a, Piotr Wąz^b, Katarzyna Sikorska^a, Beata Szostakowska^a^a Department of Tropical Medicine and Epidemiology, Medical University of Gdańsk, Poland^b Department of Nuclear Medicine, Medical University of Gdańsk, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Blastocystis
 Sequence tagged sites (STS) PCR
 Subtyping
 Epidemiology
 Poland

ABSTRACT

Blastocystis is a common, enteric protist of humans and animals with a worldwide distribution and unclear clinical relevance. Nine out of 17 genetically diverse subtypes occur in humans. We analysed the distribution of *Blastocystis* subtypes and the intensity of invasion in relation to the gastrointestinal tract disorders and travels to different continents. 122 *Blastocystis* stool cultures were subtyped via polymerase chain reaction (PCR) with seven pairs of subtype-specific, sequence-tagged-site (STS) primers. Five subtypes of *Blastocystis* were detected: ST3 (59%), ST2 (19.7%), ST1 (13.1%), ST6 (3.3%), ST7 (3.3%), and two mixed infections with ST1/ST3 (1.6%). ST1 was detected exclusively in travelers to hot climate zones and ST2 was found more frequently in people visiting other continents compared to those who never left Poland. We found no correlation between gastrointestinal tract disorders, *Blastocystis* STs, and parasite load. There was no age predisposition to the *Blastocystis* infection. We established the distribution of *Blastocystis* STs among Poles traveling to different continents and never leaving Poland. Our study sheds more light on the problem of importing *Blastocystis* infection. It shows that certain subtypes detected in Europe can be imported due to travel or migration. Collecting data on the travel history of the surveyed persons is necessary to clarify this matter.

1. Introduction

Blastocystis is a unicellular, anaerobic, eukaryotic protist occurring in the intestines of humans and a variety of animals, including primates, mammals, birds, reptiles, amphibians and even insects (Wawrzyniak et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016). Its prevalence in humans ranges from 2.5% to 56% in developed countries and up to 100% in developing countries and differs within geographical regions, countries, and communities (Yoshikawa et al., 2004; Scanlan et al., 2014; El Safadi et al., 2014; Seyer et al., 2017). This divergence is primarily explained by the varying levels of sanitation infrastructure and hygiene habits, as well as by the diversity of the studied populations such as age group (children/adults), health status (symptomatic/asymptomatic), residence (village/town) (Yoshikawa et al., 2004; Javanmard et al., 2018).

Until 2007, the name *Blastocystis hominis* was used because it was firmly believed that *Blastocystis* in humans was a different species than those occurring in animals. Further genetic diversity studies have led to the identification of 17 subtypes of *Blastocystis* and have shown that some subtypes can occur both in humans and animals (Wawrzyniak et al., 2013). This led to changes in the nomenclature: *Blastocystis*

hominis was replaced by *Blastocystis*, followed by a subtype number (e.g., ST1) (Stensvold et al., 2007). Ten STs (ST1–ST9, ST12) were identified in humans, but the majority of human infections (90–95%) are caused by ST1–ST4 (Clark et al., 2013) (Ramírez et al., 2016) (Forsell et al., 2017).

Subtypes (morphologically indistinguishable) identified in humans are also found in mammals: pets, livestock, wilds, and birds (except for ST9 that was detected so far only in people). High similarity or even identity of DNA sequences of *Blastocystis* STs from humans and animals suggest the potential of zoonotic transmission (Thathaisong et al., 2003; Tanizaki et al., 2005; Fathy, 2011; Wang et al., 2014; Wang et al., 2018). The most likely way of infection is a faecal-oral route through contaminated water or food (Leelayoova et al., 2008; Fathy, 2011; Plutzer and Karanis, 2016).

The pathogenicity of *Blastocystis* has not been unequivocally proven. Many researchers have point out a wide range of clinical manifestations in people with *Blastocystis* from acute watery diarrhoea through mild chronic abdominal discomfort (abdominal pain, nausea, bloating, constipation, flatulence), to a total lack of symptoms (Dogruman-Al et al., 2010). The contribution of *Blastocystis* in irritable bowel syndrome (IBS) and irritation bowel disease (IBD) development is also ongoing debate

* Corresponding author at: Medical University of Gdańsk, Department of Tropical Medicine and Epidemiology, Powstania Styczniowego 9B, 81-519 Gdynia, Poland.
 E-mail address: mrudz@gumed.edu.pl (M. Rudzińska).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103926>

Received 6 March 2019; Received in revised form 12 June 2019; Accepted 16 June 2019

Available online 18 June 2019

1567-1348/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Yakoob et al., 2010; Fouad et al., 2011; Poirier et al., 2012). Extra-intestinal symptoms such as a headache, chronic fatigue, itching and skin rash, and even depression have been described as well (Tan, 2008). The extent and severity of symptoms may be the result of the pathogenicity of the strain and the immunological status of the infected person (Clark et al., 2013; Alinaghizade et al., 2017; Seyer et al., 2017). The opportunistic potential of *Blastocystis* cannot be ruled out because it is frequently found in immunocompromised patients (cancer patients or HIV positive individuals) (Tan et al., 2009; Poirier et al., 2011).

Molecular epidemiology studies of *Blastocystis* infections have been conducted in many regions of the world, showing geographic variation in the prevalence and distribution of STs as well as conflicting data on the association of particular STs with clinical symptoms (Clark et al., 2013). In Poland, knowledge about the distribution of *Blastocystis* STs is very scarce. To date, there are only a few reports describing small groups of *Blastocystis*-positive subjects (Wesolowska et al., 2016; Lepczyńska et al., 2016; Sałamatın et al., 2016; Kaczmarek et al., 2017).

In this study, we aimed to investigate the distribution of *Blastocystis* STs among Polish citizens in relation to symptoms of the gastrointestinal tract (GIT) and history of travels to the warm zone. We hope it will help to enrich knowledge about the geographical distribution, transmission and the potential correlation between *Blastocystis* STs and disease.

2. Material and methods

A total of 122 *Blastocystis* positive stool samples collected from patients of the Tropical Medicine and Epidemiology Department (TM&ED) of the Medical University in Gdańsk in 2012–2013 were analysed. The study group consisted of people after returning from the tropics ($n = 92$), and people who had never left Poland ($n = 30$) independently of clinical symptoms. All samples were obtained during routine microscopic stool examination for ova and cysts (saline and iodine wet mounts, Kato-Katz and formol-ethyl-acetate-concentration methods) performed three times at a one – two-day interval. In the microscopic assessment of the intensity of *Blastocystis* invasion (using a 40× objective), four levels of parasite load (according to system developed in the TM&ED) were used: I - very low: single cells in a whole preparation; II - low: single cells in almost every field of vision; III - medium: 5–10 cells in every field of vision; IV - high: > 10 cells in every field of vision. The parasite load varied in individual patients in subsequent stool examinations. To assess accurately the potential association between the intensity of invasion and the occurrence of clinical symptoms, the sample with the highest level of parasite for each patient were used for examination. A standardized questionnaire was designed to collect information about each participating subject including sex, age, history of travels and presence of digestive disorders.

Stool samples were cultured in Jones' medium (Jones, 1946) supplemented with 10% cattle serum (Sigma-Aldrich Biomed, Poland) at 37 °C. After 48 h, each culture was screened for the presence of *Blastocystis* cells with a light microscope using a 40× objective and then centrifuged at 500 × g for 5 min. The pellet was washed two times with 0.9% saline. The supernatant was discarded, and the pellet was frozen at –20 °C. DNA was extracted from the pellet using the Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) according to the manufacturer's instruction. Subtyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) with seven pairs of subtype-specific sequence-tagged-site (STS) primers (SB83, SB155, SB227, SB332, SB340, SB336, and SB337) described by Yoshikawa et al. (2004). The nomenclature of the subtypes used in this report is according to the consensus terminology for *Blastocystis* STs described by Stensvold et al. (2007) (Table 1). DNA amplification was carried out in 50 µl reaction mixtures consisting of 5 µl of PCR buffer (10× concentration), 5 µl of dNTP mixture (the concentration of each dNTP was 2.5 mM), 1 µl of each primer (a concentration 10 µM each), 1 U of RUN polymerase (A&A Biotechnology, Poland), 2 µl of genomic DNA, and 35 µl of distilled water. The PCR

Table 1
Primers used in our study.^a

Subtypes names	STS primer sets	Sequences of forward (F) and reverse (R) primers (5' to 3')
ST1	SB83	F - GAAGGACTCTGACGATGA R - GTCCAAATGAAAGGCAGC
ST2	SB340	F - TGTTCTTGTCTTCTCAGCTC R - TTCTTTCACACTCCCGTCAT
ST3	SB 227	F - TAGGATTTGGTGTGGAGA R - TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAG
ST4	SB 337	F - GTCTTCCCTGTCTATTTCTGCA R - AATTGGGTCTGCTTCTCTG
ST5	SB336	F - GTGGTAGAGGAAAGAAAACA R - AGAACAAAGTCGTAAGTGAGAT
ST6	SB 332	F - GCATCCAGACTACTATCAACATT R - CCAATTTTCAGACCAACCTTA
ST7	SB 155	F - ATCAGCTACAACTCTCTC R - ATGGCCACTTCTCAAT

^a According to consensus nomenclature by Stensvold et al. (2007) which is different from that in the original primer description by Yoshikawa et al. (2004).

conditions were all the same for all primer sets and consisted of the following steps: initial activation for 3 min at 94 °C; 30 cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, annealing 30 s at 59 °C, elongation 1 min at 72 °C, followed by a final elongation step for 5 min at 72 °C and a hold step at 4 °C in a thermal cycler (Mastercycler, Eppendorf, Germany). The PCR products and molecular marker (100 base-pair ladder, Fermentas, USA) were electrophoresed on a 1.5% agarose gel (Sigma, St. Louis, Missouri) at 150 V for 40 min with Tris-borate-EDTA buffer. Bands were visualized by ethidium bromide using an ultraviolet gel documentation system GelDoc-It.

Statistical analysis and mathematical modelling were performed using the R programme (R Core Team, 2015). The procedures and functions for creation frequency and contingency tables, a graphical representation of the results, and independence tests have been taken from the “vcdExtra” package of this software. In all analyses, a significance level < 0.05 was regarded as statistically significant. The Fisher's Exact Test for count data for “n” given in Tables 2–6 was used to check the independence of the considered characteristics. The Wilcoxon rank sum test (for two groups) and Kruskal-Wallis test (for more groups) were used to examine the intensity of invasion with respect to disorders, traveling and non-leaving Poland, and *Blastocystis* STs, the length of stay abroad as well as the age of individuals.

All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Declaration of Helsinki, and its later amendments or comparable

Table 2
The occurrence of *Blastocystis* STs depending on sex, and travels outside the borders of Poland.

		<i>Blastocystis</i> STs							p-value ^a
		ST1	ST2	ST3	ST6	ST7	ST1/ST3	Total	
Female	n	3	5	20	2	2	2	34	0.134
	%r	8.8	14.7	58.8	5.9	5.9	5.9	100	
Male	n	13	19	52	2	2	0	88	0.0008
	%r	14.8	21.6	59.1	2.3	2.3	0	100	
Not-leaving Poland	n	0	3	21	3	3	0	30	0.0008
	%r	0	10	70	10	10	0	100	
Travelers	n	16	21	51	1	1	2	92	0.0008
	%r	17.4	22.8	55.4	1.1	1.1	2.2	100	
Total	n	16	24	72	4	4	2	122	0.0008
	%r	13.1	19.7	59	3.3	3.3	1.6	100	

n - number of elements in subgroups, %r - percentage of the number relative to the sum of counts for the given row.

^a Fisher's exact test.

Table 3
The occurrence of *Blastocystis* STs in travelers depending on the length of stay abroad.

			Blastocystis STs						p-value ^a
			ST1	ST2	ST3	ST6	ST7	ST1/ST3	Total
Stay abroad	Long	n	13	14	39	0	1	2	69
		%r	18.8	20.3	56.5	0	1.4	2.9	100
Travelers	Short	n	3	7	12	1	0	0	23
		%r	13	30.4	52.2	4.3	0	0	100
	Total	n	16	21	51	1	1	2	92
		%r	17.4	22.8	55.4	1.1	1.1	2.2	100

n - number of elements in subgroups, %r - percentage of the number relative to the sum of counts for the given row.

^a Fisher's exact test.

Table 4
Blastocystis STs detected in individuals after returning from different continents.

Continent	Blastocystis STs							p-value ^a
	ST1	ST2	ST3	ST6	ST7	ST1/ST3	Total	
Asia ^b	n	9	14	31	0	1	1	56
	%r	16.1	25	55.4	0	1.8	1.8	100
Africa	n	6	4	14	1	0	1	26
	%r	23.1	15.4	53.8	3.8	0	3.8	100
South America	n	0	2	3	0	0	0	5
	%r	0	40	60	0	0	0	100
All above continents	n	1	1	3	0	0	0	5
	%r	20	20	60	0	0	0	100
Total	n	16	21	51	1	1	2	92
	%r	17.4	22.8	55.4	1.1	1.1	2.2	100

n - number of elements in subgroups, %r - percentage of the number relative to the sum of counts for the given row.

^a Fisher's exact test.

^b Stays in south-eastern Asia, mainly India.

Table 5
The occurrence of *Blastocystis* STs depending on presence or absence of disorders.

	Blastocystis STs						p-value ^a
	ST1	ST2	ST3	ST6	ST7	Total	
Symptomatic ^{b,c}	n	8	9	23	1	2	43
	%r	18.6	20.9	53.5	2.3	4.7	100
Asymptomatic ^c	n	8	11	46	3	2	70
	%r	11.4	15.7	65.7	4.3	2.9	100
Total	n	16	20	69	4	4	113
	%r	14.2	17.7	61.1	3.5	3.5	100

n - number of elements in subgroups, %r - percentage of the number relative to the sum of counts for the given row.

^a Fisher's exact test.

^b Not included seven individuals with symptoms of GIT who apart from *Blastocystis* had other parasitic protozoa (including one with *E. histolytica* sensu lato).

^c Not included one individual with mixed infection.

ethical standards. This study had the approval of the Independent Bioethics Commission for research at the Medical University of Gdansk. All participants provided written consent.

3. Results

The study group (n = 122) included 34 female and 88 male subjects; 30 had never left Poland, and 92 had had an experience of traveling to various zones with hot climates, with 23 and 69 having < 1 month' (tourists) and > 5 months' (occupational activity) stay time (respectively). 71 were asymptomatic, and 51 complained of a variety of symptoms mainly of the GIT. Gastrointestinal protozoa were detected

Table 6
The occurrence of *Blastocystis* STs depending on the age.

Age groups	Blastocystis STs							p-value ^a
	ST1	ST2	ST3	ST6	ST7	ST1/ST3	Total	
< 20-30 >	n	9	7	19	0	1	1	37
	%r	24.3	18.9	51.4	0	2.7	2.7	100
< 31-40 >	n	2	7	20	1	2	0	32
	%r	6.25	21.88	62.5	3.13	6.25	0	100
< 41-50 >	n	3	3	14	0	0	0	20
	%r	15	15	70	0	0	0	100
> 51	n	2	7	19	3	1	1	33
	%r	6.1	21.2	57.6	9.1	3	3	100
Total	n	16	24	72	4	4	2	122
	%r	13.1	19.7	59	3.3	3.3	1.6	100

n - number of elements in subgroups, %r - percentage of the number relative to the sum of counts for the given row.

^a Fisher's exact test.

microscopically in 24 individuals: 15 of them had pathogenic species (*Dientamoeba fragilis*, *Giardia intestinalis*), while eight had non-pathogenic ones (*Entamoeba coli*, *Endolimax nana*). *Entamoeba histolytica* /*dispar* /*moshkovski* (microscopically indistinguishable) was found in one person. Seven individuals with symptoms of the GIT who had parasitic protozoa (including one with suspicion of pathogenic *E. histolytica*) were not included in the clinical assessment. Similarly, to avoid possible disturbance of mixed *Blastocystis* STs, two patients co-infected with ST1 and ST3 were excluded from the clinical assessment. Thus, the clinical evaluation was based on 113 subjects (70 symptomatic, 43 asymptomatic). The patients were divided into age groups: 20-30, 31-40, 41-50 and over 50 years old. The mean age of participants was 40 years (the age range was 20 to 80 years).

Screening of the 122 *Blastocystis*-positive stool cultures with the seven pairs of STS primers revealed five STs: ST1, ST2, ST3, ST6, ST7. ST3 was the most abundant (n = 72, 59.0%) followed by ST2 (n = 24, 19.7%) and ST1 (n = 16, 13.1%). ST6 and ST7 were identified in 4 patients (3.3%) each. Two patients revealed mixed infections with ST1/ST3 (1.6%) (Fig. 1). The occurrence of particular STs depending on sex and travel outside the borders of Poland was summarized in Table 2. A statistically significant difference was found only in the occurrence of ST1 between the group of travelers and people not leaving Poland (p = .0008). No association was found between the length of stay abroad and *Blastocystis* STs detected in travelers (p-value = .4732) (Table 3). Table 4 shows the *Blastocystis* STs detected in individuals after returning from different continents. There was no association (p-value = .6549) between *Blastocystis* STs and the presence or absence of disorders (Table 5).

No statistically significant differences were found between the intensity of *Blastocystis* invasion and symptoms (p-value = .3205), travels (p-value = .4121), the length of stay abroad (p-value = 1), *Blastocystis* STs (p-value = .1384), and the age of participants (p-value = .6136) (Supplementary Figs. 1-5). Similarly, no significant differences were

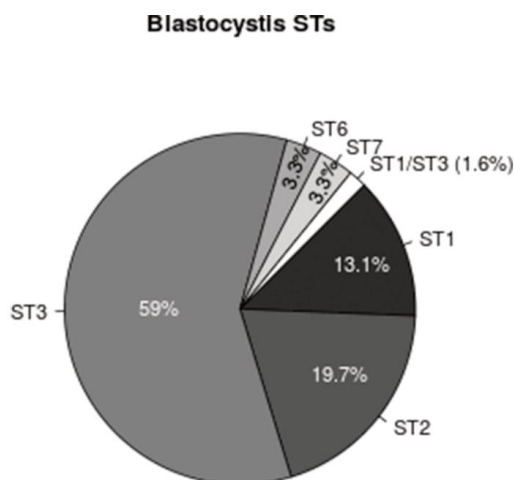


Fig. 1. *Blastocystis* STs distribution in the surveyed group.

found between the age of the patients and *Blastocystis* STs (p -value = .5671) (Table 6).

4. Discussion

Numerous reports from different world regions show that *Blastocystis* is one of the most frequently reported parasite in human intestines (Stensvold and Clark, 2016). This is in line with the observations being conducted in our department since 1992, which have shown that *Blastocystis* is the most commonly observed parasite in the stool samples of our patients. The number of patients with *Blastocystis* has increased 14-fold during that time – from 1.34% to 18.8% – while the incidence of other reported gastrointestinal parasites such as *Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia intestinalis*, *Dientamoeba fragilis*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura* and *Taenia* sp. has shown a marked downward trend (Kowalewska et al., 2013). Up to now reports on the distribution of *Blastocystis* STs in Poland have been scarce. ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7 were reported in small groups of subjects (from 6 to 31) (Lepczyńska et al., 2016; Salamatin et al., 2016; Kaczmarek et al., 2017). ST3 was the most numerous in all these reports, followed by ST1, and rarely ST6 and ST7. Wesolowska et al. (2016) identified only ST3.

4.1. STs distribution in travelers and non-travelers

In our study, five *Blastocystis* STs were identified: ST3, followed by ST2 and ST1. The least numerous were ST6 and ST7 (Fig. 1) which is in line with the worldwide STs distribution (Alfellani et al., 2013). ST3 was predominant in both groups: travelers and those who never left Poland. This subtype is probably of human origin and its predominance in humans was explained by large-scale human-to-human transmission (Tan, 2008; Kaneda et al., 2001; Souppart et al., 2010). Our study has shown that ST2 in travelers was over twice as likely as in people never leaving Poland, but the difference was not statistically significant (Table 2). ST2 prevailed in individuals returning from South America and Asia, and the lowest number was found in those returning from Africa (Table 4). A literature review on the prevalence of ST2 shows that the distribution of this subtype in different continents is very diverse. Usually it occurs less often than ST3 and ST1, but in many reports it was not detected (Alfellani et al., 2013; Piubelli et al., 2019). On the

other hand, in some countries of South America it was as frequent as ST3 (Ramírez et al., 2016). Therefore, the question of ST2 import requires further investigation. It is intriguing in our study that ST1 was only found in travelers (17.4%) after returning from Africa and Asia, suggesting a possibility of ST1 being imported to Poland from these continents. However, we cannot draw a definitive conclusion, for the participants were not examined before their stay in the tropics. Similarly, Bart et al. (2013) observed a more frequent occurrence of ST1 in patients of the Tropical Disease Department than other clinical departments of the Academic Medical Centre in Amsterdam. The report of Alfellani et al. (2013), who gathered data about subtype distribution all over the world, shows that ST1 generally is less frequent in Europe than in other continents, although in single reports from Germany, Greece and Denmark it was second in terms of frequency. However, the shortcoming of majority of reports from Europe is the lack of data on the travel history of *Blastocystis*-positive individuals, which does not allow to conclude on the geographical origin of ST1 in Europe. The only report containing data on the pre- and post-travel occurrence of *Blastocystis* shows that *Blastocystis* carriage in travelers is highly dynamic (van Hattem et al., 2018). In this study ST1 was the most frequently acquired subtype after travel to Africa but it also occurred in many patients before travel, however there is no information whether the travel was the first or subsequent of a given traveler. ST6 and ST7 are rarely met in humans, slightly more in Asia than Europe (Alfellani et al., 2013; Forsell et al., 2012). They are considered to be of bird origin (Stensvold and Clark, 2016; Alfellani et al., 2013; Ramírez et al., 2014; Cian et al., 2017) but they were also detected in *Bovidae*, less frequently in carnivores, and ST7 in non-human primates (Cian et al., 2017). Therefore, to explain whether human infections caused by ST6 and ST7 are the result of zoonotic transmission, more research is needed comparing ST6 and ST7 obtained from humans and animals. The lack of ST5 in the present study was not a surprise since ST5 has mostly been reported in livestock. In humans all over the world, ST5 is detected sporadically, mainly in Asia in people living near farms (Yan et al., 2007). The low transmission of ST5 from animals to humans in frequent and close contact with each other may suggest high host-specificity for ST5 and it needs further research. We were most surprised by the absence of ST4 in the surveyed group, since ST4 has been reported in all European countries where such studies have been conducted. In single reports from Denmark, France, and Spain, it was the most numerous while outside of Europe ST4 is rarely detected (Alfellani et al., 2013). In the abovementioned Polish studies on *Blastocystis* STs, ST4 was identified only in one of four reports in small percentage of samples (Lepczyńska et al., 2016).

To sum up, the STs distribution in our surveyed group was more like the STs from outside Europe than those from Europe, suggesting that *Blastocystis* infection was probably acquired during the stay out of Poland. The STs distribution was not affected by the length of stay abroad (Table 3).

4.2. *Blastocystis* STs and clinical symptoms

To date, the pathogenicity of *Blastocystis* and blastocystosis related to STs still remains unclear. There are as many reports showing the connection between *Blastocystis* STs and the occurrence of disorders, as well as those denying these findings. In our study, there were no differences in STs distribution in patients with and without disorders. (Table 5). Similar results were found by Yoshikawa et al. (2004), Alinaghizade et al. (2017), Seyer et al. (2017), Souppart et al. (2009), Souppart et al. (2010), Ozyurt et al. (2008), Motazedian et al. (2008). On the other hand Kaneda et al. (2001), Yan et al. (2006) and Hussein et al. (2008) reported the occurrence of symptoms in individuals colonized by ST1, and Abdel-Hameed and Hassanin (2011), Hameed et al. (2011) and Mohamed et al. (2017) in those colonized by ST3. Kaneda et al. (2001) in turn suggested a relation of ST2 and ST4 with disorders of the GIT. The ST4 association with bowel disorders and diarrhoea was

also noted by Domínguez-Márquez et al. (2009) and Stensvold et al. (2011). The latter believes ST4 as the only subtype associated with the occurrence of diarrhoea and IBS.

Seeking the causes of differential clinical symptoms or their absence in infected patients, the development of disorders depending on the parasite load has been suggested. Fathy (2011), Tan (2008) and El-Marhoumy et al. (2015) noticed a positive correlation between the intensity of invasion and the clinical presentation, accepting the intensity of above 5 organisms per field of vision as a pathogenic criterion. On the other hand Poirier et al. (2011) Özyurt et al. (2008), and Doyle et al. (1990) did not find such a correlation between them. Statistical analysis of our data did not show any significant differences between the parasite load and the presence of disorders, history of travels, the length of stay abroad or *Blastocystis* STs (Supplementary Figs. 1–4). The issue of the potential relationship between the above factors requires further research.

We did not find an age predisposition for the *Blastocystis* infection. The average age of our patients was 40 years (ranged 20–80 years) in both (symptomatic and asymptomatic) groups. The same conclusion was drawn by Scanlan et al. (2014) in analysing asymptomatic carriers, and by Yakooob et al. (2010) in analysing patients with *Blastocystis* and IBS. In contrast, Doyle et al. (1990) observed the highest infection rate in patients who were 33–34 years old. Children seem to be less infected; however, the highest presence of *Blastocystis* ever observed worldwide (100%) was in a group of 93 children in the Senegal River Basin (El Safadi et al., 2014). In our study the intensity of invasion and infection with particular STs did not depend on the age of patients (Supplementary Fig. 5).

Some researchers tried to connect the occurrence of symptoms in *Blastocystis* infected individuals with the morphological form of the parasite. Tan (2008), Tan and Suresh (2006), Katsarou-Katsari et al. (2008) and Vassalos et al. (2010) noted that amoeboid form occurred only in people with symptoms, thus this form may be responsible for the development of disorders. In the microscopic examination of our patients' samples both with and without symptoms, we observed only vacuolar forms. Therefore, we cannot support the above hypothesis.

5. Conclusion

We established the distribution of *Blastocystis* STs among Poles traveling to different continents and never leaving Poland. Five *Blastocystis* STs were identified, with a predominance of ST3 in both groups. **ST1 was identified only in the group of travelers to hot climate zones, and ST2 occurred twice as often in this group than in non-travelers.** Our results showed **no association between particular STs and clinical symptoms.** The crucial value of our research is the **observation that certain *Blastocystis* STs (here ST2, and especially ST1) might have been acquired during stays outside of Europe which sheds more light on the issue of *Blastocystis* infection import.** These data may be the first step to decipher and explain the origin of *Blastocystis* STs in Europe, and show that **transmission of the parasite requires further research especially in the context of the increasing number of people traveling to hot climate zones.** Accurate data on the travel history as well as pre- and post-travel *Blastocystis* carriage of the persons surveyed are necessary for clarification of **which STs detected in Europe are indigenous and which ones could be imported due to travel or migration.**

Declarations of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103926>.


References

- Abdel-Hameed, D.M., Hassanin, O.M., 2011. Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitol. Res.* 109, 321–327. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2259-x>.
- Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E.S.U., Fagbenro-Beyioku, A.F., Clark, C.G., 2013. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 126, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.011>.
- Alinaghizade, A., Mirjalali, H., Mohebali, M., Stensvold, C.R., Rezaeian, M., 2017. Inter- and intra-subtype variation of *Blastocystis* subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infect. Genet. Evol.* 50, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.016>.
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E.M., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C.J., van Vugt, M., Goorhuis, A., van Gool, T., 2013. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect. Dis.* 13, 389. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-389>.
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delgado-Viscogliosi, P., Guyot, K., Li, L.L., Monchy, S., Noël, C., Poirier, P., Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Bosc, S., Chabé, M., Petit, T., Certad, G., Viscogliosi, E., 2017. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS One* 12, 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169659>.
- Clark, C.G., van der Giezen, M., Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., 2013. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00001-0>.
- Dogruman-Al, F., Simsek, Z., Boorum, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C., et al., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015484>.
- Domínguez-Márquez, M.V., Guna, R., Muñoz, C., Gómez-Muñoz, M.T., 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, 949–955. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1485-y>.
- Doyle, P.W., Helgason, M.M., Mathias, R.G., Proctor, E.M., 1990. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 116–121.
- 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 Infect. Dis.* 14, 164. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-164>.
- El-Marhoumy, S.M., El-Nouby, K.A., Shoheib, Z.S., Salama, A.M., 2015. Prevalence and diagnostic approach for a neglected protozoan *Blastocystis hominis*. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 5, 51–59. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60626-5](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60626-5).
- Fathy, F.M., 2011. A study on *Blastocystis hominis* in food-handlers: diagnosis and potential pathogenicity. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 41, 433–453.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1416-6>.
- Forsell, J., Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Johansson, A., Evengård, B., Granlund, M., 2017. The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC Microbiol.* 17, 231. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1139-7>.
- Fouad, S.A., Basyoni, M.M.A., Fahmy, R.A., Kobaisi, M.H., 2011. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab. J. Gastroenterol.* 12, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.ajg.2011.11.005>.
- Hameed, D.M.A., Hassanin, O.M., Zuel-Fakkar, N.M., 2011. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol. Res.* 108, 553–560. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2097-2>.
- van Hattem, J.M., Arcilla, M.S., Schultsz, C., Bootsma, M.C., Verhaar, N., Rebers, S.P., Goorhuis, A., Grobusch, M.P., Penders, J., de Jong, M.D., van Gool, T., Bart, A., van Genderen, P.J., Melles, D.C., Molhoek, N., Oude Lashof, A.M., Stobberingh, E.E., Verbrugh, H.A., 2018. Carriage of *Blastocystis* spp. in travellers - a prospective longitudinal study. *Travel Med. Infect. Dis.* 0 (1). <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.06.005>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0833-z>.
- Javanmard, E., Niyati, M., Ghasemi, E., Mirjalali, H., Asadzadeh Aghdaei, H., Zali, M.R., 2018. Impacts of human development index and climate conditions on prevalence of *Blastocystis*: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 185, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.05.014>.
- Jones, W.R., 1946. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 40, 130–140.
- Kaczmarek, A., Gołab, E., Żarnowska-Prymek, H., Rawska, A., Jańczak, D., Lewicki, A., Wesołowska, M., Rożej-Bielicka, W., Cielecka, D., Salamatin, R., 2017. Genetic diversity of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland =

- Zróznicowanie genetyczne *Blastocystis hominis* sensu lato wyizolowanych od ludzi w Polsce. *Przeegl. Epidemiol.* 71, 539–546.
- Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X.J., Fujita, Y., Maruyama, M., Tachibana, H., 2001. Ribodomes of *Blastocystis Hominis* isolated in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 393–396. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.393>.
- 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 [13]. *Acta Derm. Venereol.* 88, 80–81. <https://doi.org/10.2340/00015555-0338>.
- Kowalewska, B., Rudzińska, M., Zarudzka, D., Kotłowski, A., 2013. Ocena częstości zarażeń pasożytami jelitowymi wśród pacjentów przychodni Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni w okresie ostatnich 30 lat An evaluation of the intensity of intestinal parasitic infections among patients of out-patient division. *Diagnostyka Lab.* 49, 9–15.
- Leelayoova, S., Siripattananippong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj, P., Mungthin, M., 2008. Drinking water: a possible source of *blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in Central Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 401–406.
- Lepczyńska, M., Dzika, E., Stensvold, C.R., 2016. Genetic diversity of *Blastocystis* spp. in the human population of the Olsztyn area. *Ann. Parasitol.* 62, 28.
- Mohamed, R.T., El-Bali, M.A., Mohamed, A.A., Abdel-Fatah, M.A., El-Malky, M.A., Mowafy, N.M., Zaghloul, D.A., Bakri, R.A., Al-Harhi, S.A., 2017. Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. *Parasit. Vectors* 10, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2114-8>.
- Motazedian, H., Ghasemi, H., Sadjadi, S.M., 2008. Genomic diversity of *Blastocystis hominis* from patients in southern Iran. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 102, 85–88. <https://doi.org/10.1179/136485908X252197>.
- Ozyurt, M., Kurt, O., Molbak, K., Nielsen, H.V., Haznedaroglu, T., Stensvold, C.R., 2008. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol. Int.* 57, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.01.004>.
- Piubelli, C., Soleymanpoor, H., Giorli, G., Formenti, F., Buonfrate, D., Bisoffi, Z., Perandini, F., 2019. *Blastocystis* prevalence and subtypes in autochthonous and immigrant patients in a referral centre for parasitic infections in Italy. *PLoS One* 14, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210171>.
- Plutzer, J., Karanis, P., 2016. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Res.* 101, 318–332. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.085>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-10>.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C.P., Delbac, F., El Alaoui, H., 2012. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 8, 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002545>.
- R Core Team, 2015. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Core Team. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramirez, J.D., Sánchez, L.V., Bautista, D.C., Corredor, A.F., Flórez, A.C., Stensvold, C.R., 2014. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect. Genet. Evol.* 22, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.020>.
- Ramirez, J.D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M.C., Giraldo, J.C., Reyes, P., López, M.C., García, L., Cooper, P.J., Vicuña, Y., Mongi, F., Casero, R.D., 2016. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect. Genet. Evol.* 41, 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.017>.
- Salamatin, R., Kaczmarek, A., Rozej-bielicka, W., Cielecka, D., Jańczak, D., Lewicki, A., Wesolowska, M., Mlocicki, D., Gołab, E., 2016. Genotype characterisation of *Blastocystis* isolates from polish patients – preliminary results. *Ann. Parasitol.* 62, 93.
- Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G.H.J., 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. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12396>.
- Seyer, A., Karasartova, D., Ruh, E., Gureser, A.S., Turgal, E., Imir, T., Taylan-Ozkan, A., 2017. Epidemiology and prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 1164–1170. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0706>.
- Souppart, L., Sancier, G., Cian, A., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Capron, M., et al., 2009. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol. Res.* 105, 413–421.
- Souppart, L., Moussa, H., Cian, A., Sancier, G., Poirier, P., El Alaoui, H., Delbac, F., Boorom, K., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Viscogliosi, E., 2010. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol. Res.* 106, 505–511. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1693-5>.
- Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2016. Current status of *Blastocystis*: a personal view. *Parasitol. Int.* 65, 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>.
- Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S.W., Thompson, R.C.A., Traub, R.J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., Clark, C.G., 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends Parasitol.* 23, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.004>.
- 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. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0005>.
- Tan, K.S.W., 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 639–665. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08>.
- Tan, T.C., Suresh, K.G., 2006. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol. Res.* 98, 189–193. <https://doi.org/10.1080/10421590500312847>.
- Tan, T.C., Ong, S.C., Suresh, K.G., 2009. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitol. Res.* 105, 1283–1286. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1551-5>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1326-6>.
- Thathaisong, U., Worapong, J., Tan-ariya, P., Viputtigul, K., Mungthin, M., Sudatis, A., Noonai, A., Leelayoova, S., 2003. *Blastocystis* isolates from a Pig and a Horse Are Closely Related to *Blastocystis hominis Blastocystis* Isolates from a Pig and a Horse Are Closely Related to *Blastocystis Hominis* 41. pp. 967–975. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.967>.
- 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, 251–258. <https://doi.org/10.1309/AJCPDOWQSL6ESDMN>.
- Wang, W., Owen, H., Traub, R.J., Cuttill, L., Inpankaew, T., Bielefeldt-Ohmann, H., 2014. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet. Parasitol.* 203, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.006>.
- Wang, J., Gong, B., Liu, X., Zhao, W., Bu, T., Zhang, W., Liu, A., Yang, F., 2018. Distribution and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in various mammal and bird species in northeastern China. *Parasites Vectors* 11, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3106-z>.
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Texier, C., Delbac, F., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Alaoui, H.E., 2013. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 1, 167–178. <https://doi.org/10.1177/2049936113504754>.
- Wesolowska, W., Kicia, M., Szetela, B., Kopacz, Z., Salamatin, R., Rymer, W., Szymczak, A., Knysz, B., 2016. Prevalence of *Blastocystis hominis* among HIV-positive and HIV-negative patients in Poland. In: 12th Eur. Multicolloquium Parasitol. EMOP XII. Turku, Finland, July 20–24th 2016, Abstr. P6.11.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1761-x>.
- Yan, Y., Su, S., Lai, R., Liao, H., Ye, J., Li, X., Luo, X., Chen, G., 2006. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol. Res.* 99, 597–601. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0186-z>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0672-y>.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I.K.M.D., Hossain, M.B., Zaman, V., Haque, R., Takahashi, Y., 2004. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol. Res.* 92, 22–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0995-2>.

Article

First Report on the Occurrence and Subtypes of *Blastocystis* in Pigs in Poland Using Sequence-Tagged-Site PCR and Barcode Region Sequencing

Monika Rudzińska ^{1,*} , Beata Kowalewska ¹, Beata Szostakowska ², Maciej Grzybek ², Katarzyna Sikorska ¹ and Agnieszka Świątalska ³

¹ Department of Tropical Medicine and Epidemiology, Institute of Maritime and Tropical Medicine, Medical University of Gdańsk, 81-519 Gdynia, Poland; bkowal@gumed.edu.pl (B.K.); ksikorska@gumed.edu.pl (K.S.)

² Department of Tropical Parasitology, Institute of Maritime and Tropical Medicine, Medical University of Gdańsk, 81-519 Gdynia, Poland; bszost@gumed.edu.pl (B.S.); maciej.grzybek@gumed.edu.pl (M.G.)

³ Veterinary Hygiene Station, 80-316 Gdańsk, Poland; a.swiatalska@gdansk.wiw.gov.pl

* Correspondence: mrudz@gumed.edu.pl; Fax: +485-8622-3354

Received: 5 June 2020; Accepted: 14 July 2020; Published: 21 July 2020



Abstract: *Blastocystis* is an enteric microorganism commonly found in humans and animals worldwide. Its pathogenic role in humans and transmission patterns has not been fully explained. However, nine subtypes (ST1–8, ST12) are considered as potentially zoonotic. Studies from various regions of the world show that pigs are mainly infected with ST5. Although pigs are important farmed animals in Poland, the question of *Blastocystis* infection in these animals has not yet been investigated. Herein, 149 pig stool samples from 10 Polish pig farms were analyzed using sequence-tagged-site PCR and barcode region sequencing. The percentage of samples in which *Blastocystis* was identified using each method separately was similar: 38.25% and 37.58%, respectively. However, the percentage of positive results obtained by combining both methods was 46.97%, which means that, depending on the method used, the number of undetected samples varied between 8.72% and 9.39%. This shows the methodological limitations of up-to-date molecular approaches commonly used in *Blastocystis* research. A moderate infection rate (44.4–50%) observed in different pig age groups with a vital predominance of ST5 (94.28%) in every age group shows that pigs are a likely natural host of ST5. A small percentage of mixed infections, namely ST5/ST1 (5.26%), ST5/ST3 (1.75%), and ST3/ST1 (1.75%), was observed only in animals of older age, suggesting that ST3 and ST1 can be acquired by pigs during contact with humans. This study provides the first data on the prevalence and *Blastocystis* subtypes (STs) distribution in pigs in Poland. The results also highlight the need for the development of new methods capable of detecting highly genetically diverse *Blastocystis* isolates and mixed infections.

Keywords: *Blastocystis*; pigs; Poland; molecular methods; epidemiology

1. Introduction

Blastocystis is a common enteric eukaryotic microorganism distributed worldwide, colonizing probably more than one billion people and a wide variety of mammals (wild, farm, and companion animals) as well as birds and insects [1–3]. *Blastocystis* pathogenicity and importance to public health is controversial since the organism is found in both asymptomatic and symptomatic individuals [4]. In the latter group, *Blastocystis* has been linked to gastrointestinal disorders (such as nausea, abdominal

pain, diarrhoea, constipation, flatulence) as well a contribution to the development of irritable bowel syndrome (IBS) and irritation bowel disease (IBD), or rarely to skin reactions (urticaria, pruritus) [5–7]. *Blastocystis* exhibits extensive genetic diversity within the small subunit of ribosomal RNA (SSU rDNA) gene [8]. Studies on the sequence similarity within the SSU rDNA led to the identification of at least 17 microscopically indistinguishable subtypes named ST1–ST17 [9]. Nine of them (ST1–ST8, ST12) are found in both humans and animals [1,10], hence the suspicion that these subtypes may have zoonotic potential. However, neither the contribution of the animal reservoir to human infection nor the way of transmission has been fully clarified [11]. Contact with animals, their faeces, or water contaminated with cysts probably promote transmission, which presumably takes place via the faecal-oral route [12]. These pathways of infection have been confirmed by a higher frequency of *Blastocystis* infection in animal handlers [13,14] as well as by numerous reports showing that humans and animals remaining in close contact with each other were hosts of the same *Blastocystis* STs [15–19]. Identification of *Blastocystis* in pig manure slurry [20], sewage [21], and untreated drinking water [22,23] also indicate the possibility of being infected this way. Pigs, among many animal hosts, are often colonized by *Blastocystis* (from 7.5% to 100% in different world regions), and the most common subtype found in pigs is ST5 (for review see [24]). In some locations in Asia, this subtype (generally rare in humans) has been detected in people who had contact with pigs, suggesting a possible pattern of zoonosis [15,25–27]. In Poland, which is the fifth-largest producer of pork in Europe (with a pig population over 11 million heads) [28], *Blastocystis* is the most frequently detected eukaryotic organism in human stool samples [29]. Six *Blastocystis* subtypes (ST1–ST4, ST6, and ST7) have been reported in Poles by various authors [30–33] whereas large-scale animal testing has not been yet carried out.

Blastocystis is a highly polymorphic organism. At least 4 morphological forms differing in appearance and body size range were described [12,34]. Due to this, as well as a delicate, easily destructive structure, the detection of *Blastocystis* in routine microscopic stool smears is difficult and often unreliable since *Blastocystis* cells are easily overlooked or confused with other microorganisms present in faeces. The use of molecular methods significantly improved the sensitivity and specificity of *Blastocystis* detection in stool samples [14,17,35]. Of the several PCR-based methods, two techniques are most commonly used by *Blastocystis* researchers. The first involves the use of primers complementary to sequence-tagged-sites (STS), i.e., short, easy-to-recognize single DNA sequences specific for individual *Blastocystis* subtypes [36]. The vital drawback of the “STS method” is the necessity of performing separate PCR reactions with all available STS primer pairs for each sample and the ability to detect only seven *Blastocystis* subtypes, but its advantage is the ability for detecting mixed infections. The second is based on the amplification of a gene fragment encoding the 18S rRNA subunit (known as the barcode region), followed by sequencing of the resulting DNA amplification product [37]. In the “barcode method”, it is sufficient to perform only one amplification reaction for each sample, then the PCR product is sequenced and the subtype of *Blastocystis* can be further identified using programs available online (e.g., <http://publmst.org/blastocystis/>). This method allows detection of all the 17 so far identified *Blastocystis* subtypes as well as potentially novel ones, but it fails in case of mixed infections.

The study aimed to obtain the first data on the prevalence and subtypes of *Blastocystis* in pigs in Poland to better understand the host specificity and epidemiology of *Blastocystis* infection. In order not to miss any *Blastocystis* subtype (particularly in mixed infections), we used both the above-mentioned PCR methods in our study.

2. Results

After testing 149 pig stool samples for *Blastocystis* using two PCR research methods, the results obtained by each method were not completely consistent. *Blastocystis* DNA was detected in 57 samples (38.25%) tested with STS primers and 56 (37.58%) samples tested with barcode region analysis. In 43 samples (28.85%), *Blastocystis* was detected consistently with both methods used, whereas in 14 samples (9.39%), *Blastocystis* was found using only STS PCR, and in 13 (8.72%) using only “barcode method”. After adding up the results obtained with one or both of these methods, the actual number

of *Blastocystis*-positive samples was 70 (46.97%). There were no statistical differences neither between the results obtained by two methods used in our study nor between each of these methods and the results obtained by the combination of both ($p > 0.05$). In 79 samples (53.02%), *Blastocystis* was not detected with any method (Figure 1).

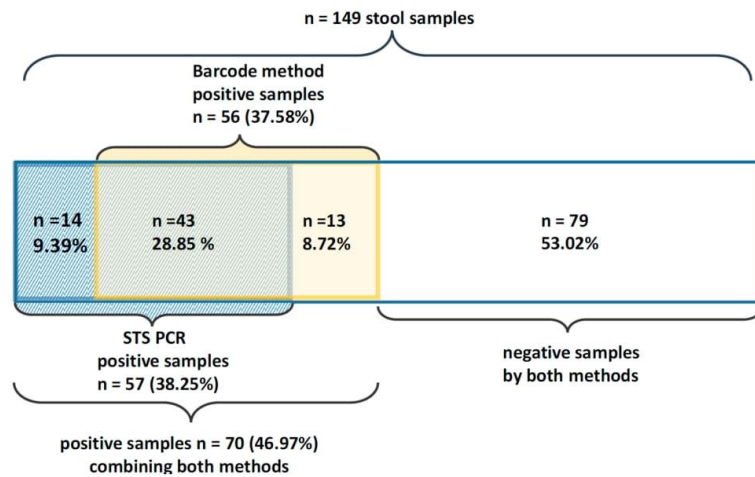


Figure 1. Comparison of *Blastocystis* detection results by STS PCR and barcode sequencing analysis.

2.1. Results of STS PCR

Among all *Blastocystis* positive samples detected with STS PCR, 51 out of 57 samples (89.47%) represented ST5 and one in 57 (1.75%) with ST1. Five mixed infections were also detected: ST5/ST1 (three in 57, 5.26%), ST5/ST3 (one in 57, 1.75%), ST3/ST1 (one in 57, 1.75%). Summarizing the above, ST5 was found in 55 out of 57 (96.49%), ST1 in five out of 57 (8.77%), and ST3 in two out of 57 (3.51%) of samples (the sum of the percentages does not add up to 100% because of mixed infections) (Table 1).

Table 1. Results obtained with STS PCR and barcode sequence analysis.

No of Samples n = 149	Barcode Sequence Analysis		STS PCR (Positive n = 57)
	Product of Barcode PCR (Positive n = 66)	Identification Based on Nucleotide Sequence (Positive n = 56 **)	
37	+	ST5	ST5
1	+	ST1	ST1
3	+	ST5	ST5/ST1
1	+	ST5	ST5/ST3
1	+	ST1	ST3/ST1
11	+	ST5	-
2	+	ST-In ***	-
3	+	fungus	ST5
3	+	unreadable	ST5
8	-	-	ST5
1*	+	fungus	-
3*	+	unreadable	-
75	-	-	-

* were included in *Blastocystis* negative giving the total number of 79 negative samples. ** nucleotide sequence corresponding to *Blastocystis*. *** subtype indeterminate.

2.2. Results of Barcode Region Analysis

Out of 66 samples that gave the product using barcode PCR, in 56 of them, obtained sequences corresponded to *Blastocystis*. Analysis of barcode region PCR products revealed ST5 in 52 out of 56 samples (92.85%) and ST1 in two of 56 samples (3.57%). The DNA sequences of these samples showed mostly high similarity (97–100%) to *Blastocystis* sequences deposited in GenBank. Sequences of the remaining two out of 56 samples (3.57%) (which gave no product with STS primers) had 87% and 76% similarity with *Blastocystis* sequences but not with a specific subtype. The sequence query facility recognized ST17 as the closest match to these sequences. However, due to low-quality of the DNA products the allocation remains highly uncertain. Hence, we classified these samples as *Blastocystis* ST indeterminate. In four cases the obtained sequences instead to *Blastocystis* corresponded to fungi of the genus *Galactomyces*, *Picchia*, and *Yarrowia*, while in six cases, the sequences were unreadable due to sequences overlapping and numerous gaps in the alignment. In all samples in which mixed infection was detected by STS primers, direct sequencing of the barcode region allowed to identify only one subtype: ST1 in a mixed sample of ST1/ST3, and ST5 in samples containing ST5/ST1 and ST5/ST3. In the case of 27 samples, the methods used gave inconsistent results. Details are presented in Table 1 and Figure 1.

In summary, analysis of the results of all 70 positive samples obtained with one of the two methods described above, or the combination of both, showed ST5 in 94.28% (66/70) of *Blastocystis* positive samples, ST1 in 7.14% (5/70), and ST3 in 2.85% (2/70). In two of 70 samples (2.85%), subtypes could not be identified.

2.3. Prevalence of *Blastocystis* and Subtypes Distribution within Pig Age Groups

The overall prevalence of *Blastocystis* for all analyzed animals (n = 149) was 46.97% (95CL: 38.7–55.5%). *Blastocystis* colonized pigs from all age groups however, there was no significant difference in the prevalence between age groups ($F_{3,145} = 0.57$, $p = 0.98$). The percentage of infected animals was as follows: 50% in piglets aged <4 weeks, 44.4% in 1–3-month-old weaners, 46.3% in 3–9-month-old porkers, and 46.7% in >12-month-old sows (Figure 2).

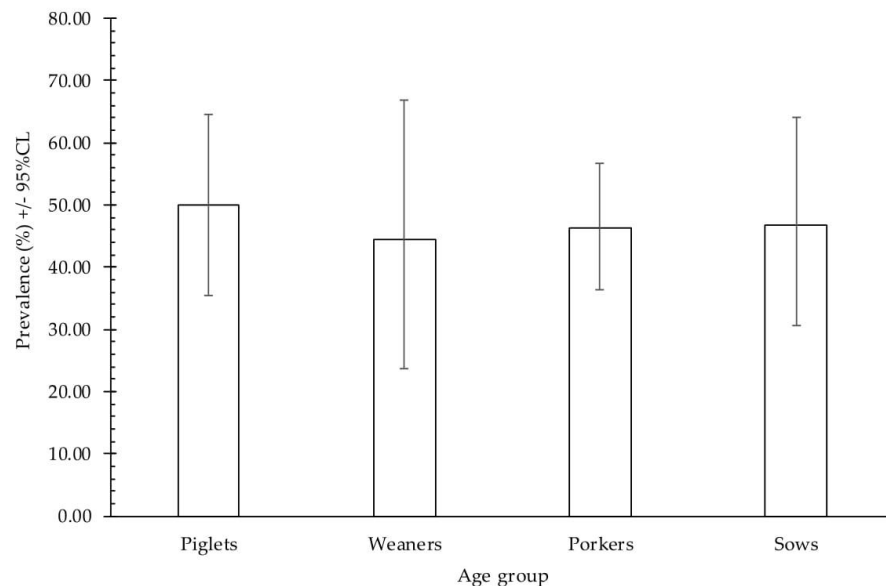


Figure 2. Prevalence of *Blastocystis* within pig age groups.

ST5 was predominant in all age groups of pigs, with ST1 and mixed infections only found in isolated cases (Table 2).

Table 2. *Blastocystis* subtypes distribution within pig age groups.

Age Group	No. of Examined/Infected Pigs	<i>Blastocystis</i> ST (n)
Piglets <4 weeks	32/16	ST5 (16)
Weaners 1–3 months	18/8	ST5 (7), ST5/ST3 (1)
Porkers 3–9 months	54/25	ST5 (21), ST1 (1), ST5/ST1 (2), ST-In * (1)
Sows >12 months	45/21	ST5 (18), ST5/ST1 (1), ST3/ST1 (1), ST-In * (1)

* subtype indeterminate.

3. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study providing information about *Blastocystis* prevalence and subtypes in pigs in Poland. *Blastocystis* has been reported as a common gut eukaryote in domestic pigs in several geographical regions of the world with the prevalence ranging from 7.5% to 100% [24].

In our study, the prevalence of *Blastocystis* in pigs was 46.97% which is similar to that obtained (also by PCR methods) in Spain (44.5%), Japan (44.1%), and Cambodia (45.2%), but lower than in most reports from Asian countries where infection rate often exceeds 70%, and in some of these countries it can even reach 100% [11,24–26,38,39]. These differences may be affected by the age of animals tested, the season of sampling for testing, the manner of animal keeping or environmental or sanitary conditions [25,39]. In comparison to abundant data from Asia on the prevalence of *Blastocystis* in pigs, data from European countries are scarce and highly diverse. In contrast to the mentioned study from Spain showing 44.5% of *Blastocystis* carriage in pigs, Alfelani et al. [11] reported 28.5% of infected pigs in the UK while Suli et al. [40] reported 81.2% in Serbia. These varied results do not allow a conclusion about the real *Blastocystis* prevalence in pigs in Europe and indicate the need for further research in this field.

Some authors noted the age of animals as a factor that could affect their susceptibility to *Blastocystis* infection. Pakandl et al. [41] noticed for the first time that colonization of *Blastocystis* had already begun in three-day-old piglets, reaching 90% in one-week-old piglets, and persisted at slightly varying levels (84–93%) for the rest of the animals' life. The highest prevalence of *Blastocystis* in the youngest animals was observed by Navarro et al. [39] who explained this by the fact that very young animals without prior contact with *Blastocystis* are more susceptible to infection since they lack their sufficient immune response. On the contrary, the lowest prevalence observed in the youngest group of pigs was explained by effective immune protection due to the presence of maternal antibodies [42]. In our study, there was no significant difference between the age groups. The assessment of *Blastocystis* prevalence in pig age groups based on results obtained by different authors is not fully possible since age groups are defined differently in different studies.

To date, *Blastocystis* ST1–ST3 and ST5–ST7 have been reported in pigs worldwide with a definite predominance of ST5 followed by ST1 and ST3 [15,26,27,42–44]. ST10 was also reported, but only in one piglet in one study only [24]. Recently, ST15 was also identified in pig faecal samples [45]. In our study, ST5 was the most frequent subtype identified. However, apart from detecting ST5 and ST1, barcode region analysis also revealed two *Blastocystis*-positive samples which subtypes could not be determined probably because of the poor quality of the PCR products. It cannot be excluded that they contained *Blastocystis* subtypes other than ST1–ST7, which would explain the negative results obtained for these samples using STS primers. In addition to ST5 and ST1, ST3 was detected in two samples tested using STS primers. However, this subtype was present exclusively in a mixed infection

together with ST5 or ST1. The ST3 was not detected in these samples using barcode method because direct sequencing of PCR product in mixed infections allows for detection of only the subtype whose DNA is predominant in the sample (here ST5 or ST1) [46]. For this reason, and because of the RD5 primer's cross-reactivity with species other than *Blastocystis* [37], in three samples, sequencing revealed fungi of the genus *Galactomyces*, *Pichia*, and *Yarrowia* that are often present in the stool. Their detection, however, does not exclude the presence of *Blastocystis* in these samples, since ST5 was found in these samples using STS primers.

Despite our considerable effort, we failed to obtain PCR products in eleven samples using STS primers, although barcode region sequencing confirmed the presence of *Blastocystis* ST5 in these samples. Similar discrepancies about ST1–ST3 were observed by Stensvold [47]. STS primers were designed based on sequence data generated from randomly amplified polymorphic DNAs and still little is known about genetic diversity both between and within STS targets [46,48,49]. Therefore, it cannot be excluded that PCR products were not obtained because STS primers were not fully complementary to the binding sites in our DNA templates.

This plight has also occurred in the opposite direction, i.e., eight samples identified as *Blastocystis* ST5 with STS primers were negative with barcode PCR. Possibly, the worse quality of DNA templates of these samples caused that shorter DNA fragments (approximately ~300 bp) were successfully amplified (with STS primers) while amplification of the longer ~600 bp region failed, or it could be a sensitivity issue. Similar problems were encountered by Yoshikawa [50] when some samples positive with STS primers were negative in PCR with a 1.1 kbp SSU rDNA fragment.

Ultimately, the results of the study showed that, although the percentage of samples in which *Blastocystis* was identified using each method separately was almost identical, some samples determined as positive by one method remained undetected by the other one and vice versa. This shows that the use of anyone of these commonly adopted approaches separately may potentially lead to false-negative results in some samples. In our study, the underestimation of positive samples was 8.72% with STS PCR and 9.39% with barcode PCR and sequencing concerning the actual number of samples containing *Blastocystis* (Figure 1). However, the differences were not statistically significant ($p > 0.05$). This inconsistency in the results obtained using each method also highlighted what a challenge is to design *Blastocystis* specific primers [46,51].

In the recent decade, *Blastocystis* prevalence and subtypes in pigs have been studied mainly in countries of Southeast Asia [15,24–27,42,43] and a lesser extent in Australia [25,51] and USA [52,53]. To date, the most common subtype reported in pigs in these regions was ST5. In our study, ST5 was also the most frequently identified subtype, which suggests that there is no geographic restriction in the occurrence of ST5 in pigs. However, more research from Europe as well as other world regions are needed to confirm this observation. Scarce data from Europe showed the predominance of ST5 in pigs in Denmark [16] while ST1 was the most prevalent subtype in France [54] and Spain [39]. These data are difficult to assess and compare since they are mostly from before 2013 and apply to small groups of animals (≤ 20). The largest examined group (from Spain) consisted of 395 pigs. However, only eight of 122 *Blastocystis*-positive samples were randomly selected for sequencing [39]. In turn, authors from Serbia [40] who examined a group of 48 animals did not determine *Blastocystis* subtypes but focused on the frequency of *Blastocystis* in this group.

Apart of pigs, ST5 was also identified in other livestock animals including cattle [11,16,55,56], goats [57,58], sheep [44,59], and poultry [60]. However, in these groups of animals, ST5 was less common than in pigs. On the other hand, some authors did not find ST5 in these animals [11,43,44,61]. This suggests that pigs are the main host of ST5 and probable source of *Blastocystis* infection for other livestock animals which are often kept together or have contact with each other on farms. The sporadic detection of ST6 and ST7 in pigs (subtypes mostly found in birds, including domestic birds [16,62]) can denote that these subtypes, although specific for birds, could have been acquired by pigs through faecal-oral route [26]. This shows the probability of easy transmission of *Blastocystis* between different animal species.

Humans have been shown to harbour ten *Blastocystis* STs (ST1–ST9, ST12) but the majority of infections (~90%) are caused by four subtypes with a predominance of ST3 followed by ST1, ST2, and ST4, with proportions varying by geographical region. To date, ST5 has been sporadically reported in humans [63]. A handful of reports suggest that humans could have acquired this subtype by contact with pigs [15,25,27,38]. On the other hand, *Blastocystis* transmission in the opposite direction, i.e., from humans to pigs, seems to occur as well [26,27]. The following examples best describe different variants of this probably two-way transmission.

In a study in pigs and their in-contact humans, performed by Wang et al. [25], all *Blastocystis* positive pigs had ST5. Additionally, ST1 and ST3 were found in a small percentage of samples, and exclusively in mixed infection with ST5. Inversely, piggery workers harboured mainly ST3 and ST1, although mixed infection with ST5/ST3 or ST5 alone was found in some of them. Moreover, a comparison of the sequences of ST1, ST3, and ST5 obtained from pigs and their in-contact humans revealed 100% identity in the case of ST1 and ST3, as well as almost 100% (with a single nucleotide polymorphism) in the case of ST5, suggesting possible cross-infection with these subtypes between pigs and their caregivers.

Similarly, Pintong et al. [27] noticed that some sequences of ST5 and ST1 found in pigs and people working on or living near pig farms were highly similar (98–99%) to each other as well as to sequences of ST5 and ST1 derived from humans, pigs and cattle, previously reported in GenBank, which suggest the possibility of multi-directional transmission of these subtypes between livestock animals and people.

In another study, apart from ST5 that was found in all pigs in the study group, the authors also found ST1 in 16.4% and ST2 in 11% of animals. These two subtypes were common in children living in an area where the study was conducted. Interestingly, none of the children harboured ST5 despite the poor hygiene conditions prevailing in this village [26]. However, Udonsom et al. [43] reported that people living around the pig farms did not host ST5, which was found in pigs, and vice-versa—ST1, ST2, or ST3, although present in these people, were not detected in pigs. When compared to the GenBank database, only one ST5 isolated from a pig was closely related to *Blastocystis* sequence derived from a human, which shows that transmission between humans and animals does not always occur.

These examples show that, although pigs seem to be a natural host for ST5, this subtype can adapt to a human host, and can be transmitted from pigs to humans, which may be favoured by poor sanitation, improper waste management in pig farms, lack of personal hygiene, or no access to clean potable water [25,27]. Although, as shown above, contact or sharing living space with pigs does not always result in such a transmission.

On the other hand, the presence of ST3 (which predominates in humans) and ST1 (also common in humans) in pigs indefinitely smaller quantities than ST5, and often in mixed infection together with ST5 (as took place in our own and some of the mentioned studies), suggests that pigs probably acquire these subtypes by contact with humans. The ability of *Blastocystis* to be transmitted from humans to pigs was noticed for the first time in 1993 by Pakandl et al. [64] who performed the successful experimental transfer of a human *Blastocystis* isolate (of unknown ST) to a gnotobiotic piglet (although only one of 16 piglets became infected).

An interesting observation in our study is that ST5 was the only subtype found in the youngest group of pigs (piglets up to four weeks old). In older groups, in addition to the presence of ST5, other *Blastocystis* subtypes were also detected either in mixed or homogenous infections. This suggests that older animals, i.e., those that have had longer contact with people, have acquired subtypes usually harboured by humans (Table 2).

To date, there is no Polish publication about the occurrence of *Blastocystis* in animals. Only a few conference reports are available regarding small groups of birds [65,66] and animals from the Wrocław Zoo [67]. Among them, ST5 was found in chickens and among zoo animals but the authors did not provide any information in what animal species. Livestock has not been examined so far. When it comes to humans, ST5 was not detected in any of the human samples tested in a few regions

of Poland. However, no information is available on whether these people have had any contact with animals [30–33,68].

4. Materials and Methods

4.1. Stool Sampling and Processing

Between November 2017 and February 2018, 149 pig stool samples including 32 piglets (<4 weeks old), 18 weaners (1–3 months old), 54 porkers (3–9 months old) and 45 sows (>12 months old) were collected from 15 piggeries in the Pomerania Province. Then, ten samples were taken from each of 14 piggeries and nine samples from one piggery. One stool sample was taken from each animal pen.

Stool samples were collected from the ground after animal defecation (from the top of droppings to minimize contamination), placed into plastic stool collection containers, transported to the Department of Tropical Medicine and Epidemiology (Medical University of Gdańsk) under cool conditions, then suspended in 70% ethanol and stored at 4 °C until DNA extraction.

4.2. DNA Extraction and PCR Amplification

Immediately before DNA extraction, alcohol was washed off the stool samples with phosphate-buffered saline (PBS) two times and then one time with sterile distilled water by centrifugation at 2000× g for 10 min. Each time the supernatant was discarded carefully with a pipette.

Genomic DNA was extracted from washed samples using Genomic Mini AX Stool Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) according to the manufacturer's instruction. All PCR templates were additionally treated with an Anti-Inhibitor Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) to remove PCR inhibitors that could disturb reaction. Extracted DNAs were stored at –20 °C before PCR amplification.

For specific detection of *Blastocystis* two conventional PCR methods were performed:

- (i) PCR with subtype-specific sequence-tagged-site (STS) diagnostic primers described by Yoshikawa et al. [36] (Table 3). DNA amplification was carried out in 25 µL reaction mixtures consisting of 12.5 µL PCR Mix HGC Plus (ready-to-use PCR mixture containing Taq DNA polymerase, PCR buffer, MgCl₂, and dNTPs; A&A Biotechnology), 1 µL of each primer (concentration 10 µM), 2 µL of genomic DNA, supplemented with deionized water up to 25 µL. The PCR conditions were the same for all primer sets and consisted of the following steps: 3 min at 94 °C (initial denaturation) followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 59 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension step of 5 min at 72 °C. STS PCR results were considered positive if a specific band was visible in the gel.
- (ii) Amplification and sequencing of a ~600 bp fragment of the SSU rDNA gene (called barcode region) with the *Blastocystis*-specific BhrDr and the broad-eukaryote-specific RD5 primers described by Scicluna et al. [37] (Table 3). The reaction mixture was as above. The PCR conditions were as follows: 4 min at 94 °C (initial denaturation) followed by 35 cycles of 15 s at 95 °C, 15 s at 60 °C, 30 s at 72 °C, and a final extension step of 5 min at 72 °C.

Negative (water instead of extracted DNA) and positive (a sample successfully sequenced for *Blastocystis* before this study) control was placed in each amplification batch. PCRs were conducted in a thermal cycler (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Germany). The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 150 V for 40 min with Tris-borate-EDTA buffer. Bands were visualized by Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics Europe, Duren, Germany) using an ultraviolet gel documentation system Gel Doc-It (UVP LLC, Upland, CA, USA).

Table 3. Primers used in this study.

Target <i>Blastocystis</i> ST	Primer Sets	Sequences of Forward (F) and Reverse (R) Primers (5' to 3')
ST1 ^a	SB83	F: GAAGGACTCTCTGACGATGA R: GTCCAAATGAAAGGCAGC
ST2 ^a	SB340	F: TGTTCCTGTGCTTCTCAGCTC R: TTCTTTCACACTCCCGTCAAT
ST3 ^a	SB 227	F: TAGGATTTGGTGTTGGAGA R: TTAGAAAGTGAAGGAGATGGAAG
ST4 ^a	SB 337	F: GCTTTCCCTGTCTATTCTTGCA R: AATTCGGTCTGCTTCTTCTG
ST5 ^a	SB336	F: GTGGGTAGAGGAAGGAAAACA R: AGAACAAGTCGATGAAGTGAGAT
ST6 ^a	SB 332	F: GCATCCAGACTACTATCAACATT R: CCATTTTCAGACAACCACTTA
ST7 ^a	SB 155	F: ATCAGCCTACAATCTCCTC R: ATCGCCACTTCTCCAAT
All	RD5 BhRDr	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT GAGCTTTTAACTGCAACAACG

^a according to consensus nomenclature by Stensvold et al. [69] which is different from that in the original primer description by Yoshikawa et al. [36].

4.3. Barcode Sequence Analysis

Direct sequencing of barcode region PCR products was performed in both directions by standard procedure with the primers used for amplification. The obtained sequences were then analyzed using GeneStudio Pro Software (GeneStudio Inc., Suwanee, GA, USA) and compared with sequences available in GenBank using NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Barcode PCR results were considered positive if direct sequencing of the products confirmed *Blastocystis*. The chosen *Blastocystis* sequences identified in this study have been deposited in the GenBank database under accession numbers of MT373829 to MT373878. *Blastocystis* subtypes affiliation was determined using the sequence query facility at www.pubmlst.org/blastocystis recommended by Stensvold [47], which is under the consensus terminology for *Blastocystis* subtypes established in 2007 [69].

4.4. Statistical Analysis

Prevalence values (percentage of positive samples) are given with 95% confidence limits in parenthesis (CL95) or error bars on figures, calculated using bespoke software "PERCENTAGE CONFIDENCE LIMITS VS 13" (courtesy of Prof. F.S. Gilbert and Prof. J.M. Behnke, University of Nottingham) based on the tables of Rolf and Sokal [70,71]. Differences between age groups were analyzed using ANOVA. Differences between diagnostic methods were analyzed using Student's *t*-test. Descriptive analysis (percentages) was used to recognize *Blastocystis* STs distribution.

5. Conclusions

To the best of our knowledge, this study is the first to evaluate the colonization and *Blastocystis* subtypes' distribution in pigs in Poland. A moderate *Blastocystis* infection rate (44.4–50%) was observed in different age groups of pigs with a vital predominance of ST5 in every age group, suggesting that pigs are natural host of ST5. The observation that, in animals, mixed infections (ST5/ST1, ST3/ST1) appear with age may indicate that ST3 and ST1 could have been acquired by pigs during contact with humans. This shows clearly the need for further research in pigs and their in-contact humans from multiple world regions to understand the specificity and relationship of different *Blastocystis* STs within and between individual host groups. This will help to establish whether pigs are a reservoir of *Blastocystis* and determine their role in spreading this infection to humans.

The results also highlighted methodological limitations of up-to-date molecular approaches used commonly in *Blastocystis* identification, i.e., the possibility of missing some infections during diagnostics. Consequently, it also demonstrated the need to include in the assessment molecular methods less frequently used by researchers to identify *Blastocystis* in order to select and use a PCR method capable of detecting the highly genetically diverse *Blastocystis* isolates as well as mixed infections at one go.

Author Contributions: Conceptualization M.R.; Methodology M.R. and B.S.; Formal analysis M.R. and M.G.; Investigation M.R. and B.K.; Data curation M.R., B.K., and A.Ś.; Writing—Original draft preparation M.R.; Visualization B.K.; Application of statistical techniques to analyze/synthesize study data M.G. and B.K.; Writing—Review & Editing M.R., B.K., and B.S.; Project administration M.R. and B.S.; Validation B.S. and K.S.; Resources B.S. and A.Ś.; Supervision K.S. and B.S.; software M.G.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: MG was supported by the National Science Centre, Poland under BiodivERsA3 (2019/31/Z/NZ8/04028).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Ethics Statement: The study protocol was approved by the Ethics Committee of Medical University in Gdańsk (NKBBN/334/2017).

References

1. Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Current status of Blastocystis: A personal view. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 763–771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Yoshikawa, H.; Koyama, Y.; Tsuchiya, E.; Takami, K. Blastocystis phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 750–759. [[CrossRef](#)]
3. Jiménez, P.A.; Jaimes, J.E.; Ramírez, J.D. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. *Parasit. Vectors.* **2019**, *12*, 376.
4. Andersen, L.O.; Stensvold, C.R. Blastocystis in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 524–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Poirier, P.; Wawrzyniak, I.; Vivarès, C.P.; Delbac, F.; El Alaoui, H. New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Bahrami, F.; Babaei, E.; Badirzadeh, A.; Riabi, T.R.; Abdoli, A. Blastocystis, urticaria, and skin disorders: Review of the current evidences. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
7. Shirvani, G.; Fasihi-Harandi, M.; Raiesi, O.; Bazargan, N.; Zahedi, M.J.; Sharifi, I.; Kalantari-Khandani, B.; Nooshadokht, M.; Shabandoust, H.; Mohammadi, M.A.; et al. Prevalence and Molecular Subtyping of Blastocystis from Patients with Irritable Bowel Syndrome, Inflammatory Bowel Disease and Chronic Urticaria in Iran. *Acta Parasitol.* **2019**, *65*, 90–96. [[CrossRef](#)]
8. Gentekaki, E.; Curtis, B.A.; Stairs, C.W.; Klimeš, V.; Eliáš, M.; Salas-Leiva, D.E.; Herman, E.K.; Eme, L.; Arias, M.C.; Henrissat, B.; et al. Extreme Genome Diversity in the Hyper-Prevalent Parasitic Eukaryote Blastocystis. *PLoS Biol.* **2017**, *15*, e2003769. [[CrossRef](#)]
9. Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Pre-empting Pandora’s Box: *Blastocystis* Subtypes Revisited. *Trends Parasitol.* **2020**, *36*, 229–232. [[CrossRef](#)]
10. Wawrzyniak, I.; Poirier, P.; Texier, C.; Delbac, F.; Viscogliosi, E.; Dionigia, M.; Alaoui, H.E. Blastocystis, an unrecognized parasite: An overview of pathogenesis and diagnosis. *Adv. Infect. Dis.* **2013**, *1*, 167–178. [[CrossRef](#)]
11. Alfellani, M.A.; Taner-Mulla, D.; Jacob, A.S.; Imeede, C.A.; Yoshikawa, H.; Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Genetic Diversity of Blastocystis in Livestock and Zoo Animals. *Protist* **2013**, *164*, 497–509. [[CrossRef](#)]
12. Clark, C.G.; van der Giezen, M.; Alfellani, M.A.; Stensvold, C.R. *Recent Developments in Blastocystis Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; Volume 82, ISBN 9780124077065.
13. Salim, H.R.; Kumar, G.S.; Vellayan, S.; Mak, J.W.; Khairul Anuar, A.; Init, I.; Vennila, G.D.; Saminathan, R.; Ramakrishnan, K. Blastocystis in animal handlers. *Parasitol. Res.* **1999**, *85*, 1032–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dagci, H.; Kurt, Ö.; Demirel, M.; Mandiracioglu, A.; Aydemir, S.; Saz, U.; Bart, A.; Van Gool, T. Epidemiological and diagnostic features of blastocystis infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. *Iran. J. Parasitol.* **2014**, *9*, 519. [[PubMed](#)]

15. Yan, Y.; Su, S.; Ye, J.; Lai, X.; Lai, R.; Liao, H.; Chen, G.; Zhang, R.; Hou, Z.; Luo, X. *Blastocystis* sp. subtype 5: A possibly zoonotic genotype. *Parasitol. Res.* **2007**, *101*, 1527–1532. [CrossRef] [PubMed]
16. Stensvold, C.R.; Alfellani, M.A.; Nørskov-Lauritsen, S.; Prip, K.; Victory, E.L.; Maddox, C.; Nielsen, H.V.; Clark, C.G. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 473–479. [CrossRef]
17. Parkar, U.; Traub, R.J.; Vitali, S.; Elliot, A.; Levecke, B.; Robertson, I.; Geurden, T.; Steele, J.; Drake, B.; Thompson, R.C.A. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet. Parasitol.* **2010**, *169*, 8–17. [CrossRef]
18. Nagel, R.; Cuttall, L.; Stensvold, C.R.; Mills, P.C.; Bielefeldt-Ohmann, H.; Traub, R.J. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Intern. Med. J.* **2012**, *42*, 1187–1195. [CrossRef]
19. Lee, L.I.; Chye, T.T.; Karmacharya, B.M.; Govind, S.K. *Blastocystis* sp.: Waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites Vectors* **2012**, *5*, 1. [CrossRef]
20. Snell-Castro, R.; Godon, J.J.; Delgenès, J.P.; Dabert, P. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *Fems Microbiol. Ecol.* **2005**, *52*, 229–242. [CrossRef]
21. Suresh, K.; Smith, H.V.; Tan, T.C. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 5619–5620. [CrossRef]
22. Leelayoova, S.; Siripattanapong, S.; Thathaisong, U.; Naaglor, T.; Taamasri, P.; Piyaraj, P.; Mungthin, M. Drinking water: A possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *79*, 401–406. [CrossRef] [PubMed]
23. Noradilah, S.A.; Lee, I.L.; Anuar, T.S.; Salleh, F.M.; Manap, S.N.A.A.; Mohtar, N.S.H.M.; Azrul, S.M.; Abdullah, W.O.; Mokhtar, N. Occurrence of *Blastocystis* sp. in water catchments at Malay villages and Aboriginal settlement during wet and dry seasons in Peninsular Malaysia. *PeerJ* **2016**, *2016*, 1–20. [CrossRef]
24. Song, J.K.; Hu, R.S.; Fan, X.C.; Wang, S.S.; Zhang, H.J.; Zhao, G.H. Molecular characterization of *Blastocystis* from pigs in Shaanxi province of China. *Acta Trop.* **2017**, *173*, 130–135. [CrossRef] [PubMed]
25. Wang, W.; Owen, H.; Traub, R.J.; Cuttall, L.; Inpankaew, T.; Bielefeldt-Ohmann, H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet. Parasitol.* **2014**, *203*, 264–269. [CrossRef] [PubMed]
26. Yoshikawa, H.; Tokoro, M.; Nagamoto, T.; Arayama, S.; Asih, P.B.S.; Rozi, I.E.; Syafruddin, D. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 780–784. [CrossRef]
27. Pintong, A.; Sunyanusin, S.; Prasertbun, R.; Mahittikorn, A.; Mori, H.; Changbunjong, T.; Komalamisra, C.; Sukthana, Y.; Popruk, S. *Blastocystis* subtype 5: Predominant subtype on pig farms, Thailand. *Parasitol. Int.* **2018**, *67*, 824–828. [CrossRef]
28. GUS. Pogłowie świń 2019. Available online: <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/produkcja-zwierzecz-zwierzeta-gospodarskie/poglowie-swin-wedlug-stanu-w-grudniu-2019-roku,7,12.html> (accessed on 30 April 2019).
29. Kowalewska, B.; Rudzińska, M.; Zarudzka, D.; Kotłowski, A. Ocena częstości zarażeń pasożytami jelitowymi wśród pacjentów przychodni Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni w okresie ostatnich 30 lat An evaluation of the intensity of intestinal parasitic infections among patients of out-patient Division. *Diagn. Lab.* **2013**, *49*, 9–15.
30. Wesolowska, W.; Kicia, M.; Szetela, B.; Kopacz, Z.; Salamatin, R.; Rymer, W.; Szymczak, A.; Knysz, B. Prevalence of *Blastocystis hominis* among HIV-positive and HIV-negative patients in Poland. *Prevalence* **2016**, *6*, 11.
31. Lepczyńska, M.; Białkowska, J.; Dzika, E.; Piskorz-Ogórek, K.; Korycińska, J. *Blastocystis*: How do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 1531–1540. [CrossRef]
32. Kaczmarek, A.; Gołąb, E.; Żarnowska-Prymek, H.; Rawska, A.; Jańczak, D.; Lewicki, A.; Wesolowska, M.; Rozej-Bielicka, W.; Cielecka, D.; Salamatin, R. Genetic diversity of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland = Zróżnicowanie genetyczne *Blastocystis hominis* sensu lato wyizolowanych od ludzi w Polsce. *Przegl. Epidemiol.* **2017**, *71*, 539–546.




33. Rudzińska, M.; Kowalewska, B.; Waż, P.; Sikorska, K.; Szostakowska, B. *Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland—A single center study. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *75*, 103926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tan, K.S.W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 639–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Dogruman-AI, F.; Simsek, Z.; Boorum, K.; Ekici, E.; Sahin, M.; Tuncer, C.; Kustimur, S.; Altinbas, A. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yoshikawa, H.; Wu, Z.; Kimata, I.; Iseki, M.; Ali, I.K.M.D.; Hossain, M.B.; Zaman, V.; Haque, R.; Takahashi, Y. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol. Res.* **2004**, *92*, 22–29. [[CrossRef](#)]
37. Scicluna, S.M.; Tawari, B.; Clark, C.G. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* **2006**, *157*, 77–85. [[CrossRef](#)]
38. Thathaisong, U.; Worapong, J.; Tan-ariya, P.; Viputtigul, K.; Mungthin, M.; Sudatis, A.; Noonai, A.; Leelayoova, S. *Blastocystis* Isolates from a Pig and a Horse Are Closely Related to *Blastocystis hominis*. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 967–975. [[CrossRef](#)]
39. 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. High prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs reared under intensive growing systems: Frequency of ribotypes and associated risk factors. *Vet. Parasitol.* **2008**, *153*, 347–358. [[CrossRef](#)]
40. Süli, T.; Kozoderović, G.; Potkonjak, A.; Simin, S.; Simin, V.; Lalošević, V. Comparison of conventional and molecular diagnostic techniques for detection of *Blastocystis* sp. In pig faeces. *Iran. J. Parasitol.* **2018**, *13*, 594–601.
41. Pakandl, M. Occurrence of *Blastocystis* sp. in pigs. *Folia Parasitol. (Praha)*. **1991**, *38*, 297–301.
42. Paik, S.; Jung, B.Y.; Lee, H.; Hwang, M.H.; Han, J.E.; Rhee, M.H.; Kim, T.H.; Kwon, O.D.; Kwak, D. Molecular Detection and Subtyping of *Blastocystis* in Korean Pigs. *Korean J. Parasitol.* **2019**, *57*, 525–529. [[CrossRef](#)]
43. Udonsom, R.; Prasertbun, R.; Mahittikorn, A.; Mori, H.; Changbunjong, T.; Komalamisra, C.; Pintong, A.; Sukthana, Y.; Popruk, S. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *65*, 107–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wang, J.; Gong, B.; Yang, F.; Zhang, W.; Zheng, Y.; Liu, A. Subtype distribution and genetic characterizations of *Blastocystis* in pigs, cattle, sheep and goats in northeastern China's Heilongjiang Province. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *57*, 171–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wylezich, C.; Belka, A.; Hanke, D.; Beer, M.; Blome, S.; Höper, D. Metagenomics for broad and improved parasite detection: A proof-of concept study using swine faecal samples. *Int. J. Parasitol.* **2019**, *49*, 769–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Scanlan, P.D.; Stensvold, C.R.; Cotter, P.D. Development and application of a *Blastocystis* subtype-specific PCR assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 4071–4076. [[CrossRef](#)]
47. Stensvold, C.R. Comparison of sequencing (Barcode Region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 190–194. [[CrossRef](#)]
48. Yoshikawa, H.; Abe, N.; Wu, Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology* **2004**, *150*, 1147–1151. [[CrossRef](#)]
49. Stensvold, C.R.; Alfellani, M.; Clark, C.G. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2012**, *12*, 263–273. [[CrossRef](#)]
50. Yoshikawa, H.; Dogruman-AI, F.; Turk, S.; Kustimur, S.; Balaban, N.; Sultan, N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 1045–1050. [[CrossRef](#)]
51. Roberts, T.; Stark, D.; Harkness, J.; Ellis, J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Vet. Parasitol.* **2013**, *196*, 85–89. [[CrossRef](#)]
52. Santín, M.; Gómez-Muñoz, M.T.; Solano-Aguilar, G.; Fayer, R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 205–212. [[CrossRef](#)]

53. Fayer, R.; Elsasser, T.; Gould, R.; Solano, G.; Urban, J.; Santin, M. Blastocystis tropism in the pig intestine. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 1465–1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Noël, C.; Peyronnet, C.; Gerbod, D.; Edgcomb, V.P.; Delgado-Viscogliosi, P.; Sogin, M.L.; Capron, M.; Viscogliosi, E.; Zenner, L. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Mol Biochem Parasitol.* **2003**, *126*, 119–123. [[CrossRef](#)]
55. Badparva, E.; Sadraee, J.; Kheirandish, F. Genetic Diversity of Blastocystis Isolated from Cattle in Khorramabad, Iran. *Jundishapur J. Microbiol.* **2015**, *8*, 4–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Weining, Z.; Tao, W.; Gong, B.; Yang, H.; Li, Y.; Song, M.; Lu, Y.; Li, W. First report of Blastocystis infections in cattle in China. *Vet. Parasitol.* **2017**, *246*, 38–42. [[CrossRef](#)]
57. Song, J.K.; Yin, Y.L.; Yuan, Y.J.; Tang, H.; Ren, G.J.; Zhang, H.J.; Li, Z.X.; Zhang, Y.M.; Zhao, G.H. First genotyping of *Blastocystis* sp. in dairy, meat, and cashmere goats in northwestern China. *Acta Trop.* **2017**, *176*, 277–282. [[CrossRef](#)]
58. Betts, E.L.; Gentekaki, E.; Thomasz, A.; Breakell, V.; Carpenter, A.I.; Tsaousis, A.D. Genetic diversity of Blastocystis in non-primate animals. *Parasitology* **2017**, 1–7. [[CrossRef](#)]
59. Li, W.C.; Wang, K.; Gu, Y. Occurrence of *Blastocystis* sp. and *Pentatrichomonas hominis* in sheep and goats in China. *Parasit. Vectors* **2018**, 1–7. [[CrossRef](#)]
60. Valença-Barbosa, C.; Do Bomfim, T.C.B.; Teixeira, B.R.; Gentile, R.; Da Costa Neto, S.F.; Magalhães, B.S.N.; De Almeida Balthazar, D.; Da Silva, F.A.; Biot, R.; D’Avila Levy, C.M.; et al. Molecular epidemiology of Blastocystis isolated from animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e210740. [[CrossRef](#)]
61. Tan, T.C.; Tan, P.; Sharma, R.; Sugnaseelan, S.; Suresh, K. Genetic diversity of caprine Blastocystis from Peninsular Malaysia. *Parasitol. Res.* **2013**, *112*, 85–89. [[CrossRef](#)]
62. Greige, S.; El Safadi, D.; Bécu, N.; Gantois, N.; Pereira, B.; Chabé, M.; Benamrouz-Vanneste, S.; Certad, G.; El Hage, R.; Chemaly, M.; et al. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 1–10. [[CrossRef](#)]
63. Alfellani, M.A.; Stensvold, C.R.; Vidal-Lapiedra, A.; Onuoha, E.S.U.; Fagbenro-Beyioku, A.F.; Clark, C.G. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* **2013**, *126*, 11–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Pakandl, M.; Koudela, B.; Vitovec, J. An experimental infection of conventional and gnotobiotic piglets with human and porcine strains of Blastocystis. *Folia Parasitol. (Praha)* **1993**, *40*, 319–320. [[PubMed](#)]
65. Lewicki, A.; Rożej-Bielicka, W.; Sałamatın, R. *Blastocystis hominis* s. l. ST6—Parasite of chickens—New zoonotic agent in Poland. *Ann. Parasitol.* **2016**, *62*, 203.
66. Kaczmarek, A.; Lewicki, A.; Dziedzic, K.; Sulecki, K.; Rożej-bielicka, W.; Wesołowska, M.; Gołąb, E. A survey of Blastocystis in domestic chickens from Poland and Madagascar. *Ann. Parasitol.* **2019**, *65*, s30.
67. Wesołowska, M.; Paszta, W.; Michrowska, A.; Piekarska, J.; Wesołowska, M.; Górczykowski, M.; Kaczmarek, A.; Sałamatın, R. Molecular characterization of *Blastocystis* subtypes isolated from various mammalian groups living in Wrocław ZOO, Poland. *Ann. Parasitol.* **2019**, *65*, s47.
68. Sałamatın, R.; Kaczmarek, A.; Rożej-bielicka, W.; Cielecka, D.; Jańczak, D.; Lewicki, A.; Wesołowska, M.; Młocicki, D.; Gołąb, E. Genotype characterisation of Blastocystis isolates from Polish patients—Preliminary results. *Ann. Parasitol.* **2016**, *62*, 93.
69. Stensvold, C.R.; Suresh, G.K.; Tan, K.S.W.; Thompson, R.C.A.; Traub, R.J.; Viscogliosi, E.; Yoshikawa, H.; Clark, C.G. Terminology for *Blastocystis* subtypes—A consensus. *Trends Parasitol.* **2007**, *23*, 93–96. [[CrossRef](#)]
70. Rolf, F.J.; Sokal, R.R. *Statistical Tables*, 3rd ed.; Freeman: New York, NY, USA, 1995.
71. Grzybek, M.; Bajer, A.; Bednarska, M.; Al-Sarraf, M.; Behnke-Borowczyk, J.; Harris, P.D.; Price, S.J.; Brown, G.S.; Osborne, S.-J.; Siński, E.; et al. Long-term spatiotemporal stability and dynamic changes in helminth infracommunities of bank voles (*Myodes glareolus*) in NE Poland. *Parasitology* **2015**, *142*, 1722–1743. [[CrossRef](#)]



Article

Molecular Characterization of *Blastocystis* from Animals and Their Caregivers at the Gdańsk Zoo (Poland) and the Assessment of Zoonotic Transmission

Monika Rudzińska ^{1,*} , Beata Kowalewska ¹, Małgorzata Waleron ² , Mirosław Kalicki ³, Katarzyna Sikorska ¹  and Beata Szostakowska ⁴

- ¹ Department of Tropical Medicine and Epidemiology, Faculty of Health Sciences, Medical University of Gdańsk, 80-210 Gdańsk, Poland; bkowal@gumed.edu.pl (B.K.); ksikorska@gumed.edu.pl (K.S.)
² Laboratory of Plant Protection and Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk, Abrahama 58, 80-307 Gdańsk, Poland; malgorzata.waleron@biotech.ug.edu.pl
³ Zoological Garden of Gdańsk, Karwieńska 3, 80-328 Gdańsk, Poland; mkalicki@zoo.gda.pl
⁴ Department of Tropical Parasitology, Faculty of Health Sciences, Medical University of Gdańsk, 80-210 Gdańsk, Poland; beata.szostakowska@gumed.edu.pl
 * Correspondence: monika.rudzinska@gumed.edu.pl; Tel.: +48-583-491-762



Citation: Rudzińska, M.; Kowalewska, B.; Waleron, M.; Kalicki, M.; Sikorska, K.; Szostakowska, B. Molecular Characterization of *Blastocystis* from Animals and Their Caregivers at the Gdańsk Zoo (Poland) and the Assessment of Zoonotic Transmission. *Biology* 2021, 10, 984. <https://doi.org/10.3390/biology10100984>

Academic Editors: Anastasios D. Tsaoasis and Eleni Gentekaki

Received: 26 August 2021

Accepted: 24 September 2021

Published: 30 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: *Blastocystis* is one of the most common microorganisms living in the intestines of humans and various animals worldwide. Although the presence of this microorganism does not cause any ailments in many people, in some others *Blastocystis* is a source of various gastrointestinal disorders, such as abdominal pain, nausea, diarrhea, constipation, flatulence, or lack of appetite, as well as extraintestinal complaints, such as itching and skin rash. Transmission of *Blastocystis* is possible by direct contact with contaminated individuals, and by consuming water or food contaminated with cysts. It has been suggested that contact between animals and humans may pose a risk of human *Blastocystis* infection. In our study, we compared *Blastocystis* isolated from zoo animals and their keepers. The detection of identical sequences of *Blastocystis* in three monkeys and the man who looked after them showed that transmission of this microorganism between non-human primates (NHPs) and humans is possible under favorable conditions. Our research has shown that further investigation of animals and their in-contact humans is needed to better understand the transmission of *Blastocystis* between animals and humans and to find out which animals pose a risk of human infection, and to what extent.

Abstract: *Blastocystis* is a highly genetically diverse gut protist commonly found in humans and various animals. The role of animals in human infection is only partly understood. The aim of this study was to determine the host specificity and possibility of zoonotic transmission of this microorganism. Subtypes of *Blastocystis* isolated from 201 zoo animals and their 35 caregivers were identified by sequencing of the SSU rRNA gene. *Blastocystis* was found in 26.86% of animal and 17.14% of human samples. Both mammalian (ST1–ST3, ST5, ST8, ST10, ST13, ST14) and non-mammalian subtypes were detected. Of the subtypes found in non-human primates (ST1, ST2, ST3, and ST13), two subtypes (ST1 and ST3) were also detected in humans. The presence of identical ST1 sequences in three monkeys and their caregiver indicates the possibility of direct transmission of *Blastocystis* between these animals and humans. Detection of ST5 only in wild boars and peccaries, ST8 only in Marsupial, ST10 and ST14 only in Bovidae, and non-mammalian subtypes in reptiles suggests higher host specificity for these subtypes, and indicates that their transmission between animals and humans is unlikely. Additionally, this was probably the first time that ST5 was found in peccaries, ST2 in patas monkeys, and ST8 in red kangaroos.

Keywords: *Blastocystis*; subtypes; genetic diversity; molecular phylogeny; animals; humans; Poland

1. Introduction

Blastocystis is a cosmopolitan micro-eukaryote living in the intestines of humans and a wide range of animal species. *Blastocystis* probably infects over 1 billion people worldwide, and the reports on the influence of the organism on human health are contradictory [1]. On the one hand, human *Blastocystis* infection has been linked with the occurrence of intestinal complaints, such as nausea, abdominal pain, diarrhea, and flatulence; possible contribution of *Blastocystis* to the development of irritable bowel syndrome and/or cutaneous lesions has also been noted [2,3]. On the other hand, long-term asymptomatic *Blastocystis* carriage has been documented [4]. Others noted that colonization by *Blastocystis* was associated with the presence of more diverse and healthy gut microbiota than gut dysbiosis, hence *Blastocystis* carriage should not be viewed in isolation from the accompanying intestinal microbiome [5–7].

The mode of transmission of *Blastocystis* has not been fully elucidated; however, infection by the fecal–oral route via cyst-like forms, as well as by water and food contaminated with cysts, is considered the most probable means of infection [8].

Apart from humans, *Blastocystis* has been widely reported in various animal hosts including livestock, pets and wild animals, and animals living in zoos. Although *Blastocystis* isolates are indistinguishable morphologically, they show high genetic diversity. Based on variability within the small subunit of ribosomal RNA (SSU rRNA) genes, mammalian and avian *Blastocystis* isolates has been divided into 17–25 subtypes (STs) [9,10]. All of them (apart from ST9 sporadically found in humans) have been reported in different proportions in non-human primates (NHPs), other mammals, and birds [11–17]. Some subtypes found in animals with which humans come into frequent, but also less frequent, contact (e.g., ST5 most common in pigs, ST6 and ST7 in birds, and ST4 in rodents) are also reported in humans, while others (such as ST10 and ST14 common in cattle) are not found in humans [17–19]. The majority of human infections are caused by ST1–ST4, with a remarkable predominance of ST3, considered as a subtype of human origin. All this suggests diverse host specificity in *Blastocystis* subtypes and a possible zoonotic source for some human *Blastocystis* infections [20]. The evidence supporting the zoonotic potential of some *Blastocystis* subtypes includes the detection of very similar, or even identical, sequences of ST5 isolates in pigs or ST6 isolates in poultry, and in people who had contact with these animals [17,21], or the detection of ST2 isolates in both children and rhesus monkeys living in the same area [22]. Such a suspicion is also raised by the identification of ST8 in NHPs from a zoo along with their caregivers, or ST1, ST3, and ST4 in both pet animals and their owners [12,23]. The possibility of the human-to-animal transmission of *Blastocystis* has also been documented by successful attempts to infect rats, chickens, and gnotobiotic piglets with human *Blastocystis* isolates [24,25].

Further extensive molecular epidemiological research carried out on animals and their in-contact humans is needed to better understand the transmission of *Blastocystis* between animals and humans, and to find out which animals pose a risk of human infection, and to what extent.

In this study, we analyzed *Blastocystis* isolates from 201 animals representing 62 species kept in the zoological garden in Gdańsk (Poland), and from their caregivers, in order to better understand the host specificity of subtypes and the transmission of *Blastocystis* between animals and humans.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Sampling was performed from November 2018 to April 2019 in the zoological garden located in northern Poland in Gdańsk, which covers an area of 125 hectares of landscaped park. The Gdańsk Zoo has almost 900 animals belonging to 164 species, and is visited by approximately 500,000 people a year. The animals are housed in large spaces in conditions as similar as possible to the natural habitat of each species. Some of the animals live alone in

single cages, while others live in groups (for the map of locations of animals in the Gdańsk Zoo see this link: <https://zoo.gda.pl/en/visit/zoo-map/>) (assessed on 25 August 2021).

A total of 201 stool samples were gathered from different animals—mammals, birds and reptiles—as well as 35 stool samples from the humans who took care of them (Table 1). Prevalence values (percentage of animals infected), which are given with 95% confidence limits in parentheses ($\pm CL_{95}$) were calculated by bespoke software “PERCENTAGE CONFIDENCE LIMITS VS 13” (courtesy of Dr. F.S. Gilbert and Prof. J.M. Behnke, University of Nottingham).

Table 1. The total number of human and animal stool samples collected for this study and the percentage of positive samples obtained by the PCR method.

Host Name	Scientific Name	No. Examined	No. of Positives	% Positives ($\pm CL_{95}$)
Human	<i>Homo sapiens</i>	35	6	17.14 (8.2–31.3)
NHPs total		39	23	58.97 (43.0–73.7)
Rhesus macaque	<i>Macaca mulatta</i>	1	1	
Bornean orangutan	<i>Pongo pygmaeus</i>	2	0	
Black howler	<i>Alouatta caraya</i>	4	0	
Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	5	3	
Patas monkey	<i>Erythrocebus patas</i>	5	4	
Mandrill	<i>Mandrillus sphinx</i>	8	4	
Javan lutung	<i>Trachypitecus auratus</i>	5	5	
Guereza	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	4	4	
Buff-cheeked gibbon	<i>Nomascus gabriellae</i>	1	1	
White-cheeked gibbon	<i>Nomascus leucogenys</i>	1	1	
Emperor tamarin	<i>Saguinus imperator subgriseus</i>	3	0	
Carnivora total		20	0	
Canidae				
European grey wolf	<i>Canis lupus</i>	2	0	
Maned wolf	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	2	0	
Fennec fox	<i>Vulpes zerda</i>	1	0	
Ursidae				
Brown bear	<i>Ursus arctos</i>	1	0	
Felidae				
African lion	<i>Panthera leo bleyenberghi</i>	6	0	
Amur tiger	<i>Panthera tigris altaica</i>	2	0	
Persian leopard	<i>Panthera pardus saxicolor</i>	2	0	
Serval	<i>Leptailurus serval</i>	2	0	
Procyonidae				
Brown-nosed coati	<i>Nasua nasua</i>	2	0	
Artiodactyla total		77	25	32.46 (22.1–44.6)
Suidae				
Wild boar	<i>Sus scrofa</i>	10	8	
Tayassuidae				
Collared peccary	<i>Pecari tajacu</i>	10	9	
Hippopotamidae				
Pigmy hippopotamus	<i>Choeropsis liberiensis</i>	2	0	
Hippopotamus	<i>Hippopotamus amphibius</i>	1	0	
Bovidae		23	8	34.78 (17.8–56.7)
European wisent	<i>Bison bonasus bonasus</i>	5	0	
Yak	<i>Bos grunniens</i>	5	0	
Mishmi takin	<i>Budorcas taxicolor</i>	3	0*	
Domestic goat	<i>Capra hircus</i>	8	7	
Polish heath sheep	<i>Ovis aries polish_heath</i>	2	1	

Table 1. Cont.

Host Name	Scientific Name	No. Examined	No. of Positives	% Positives (\pm CL ₉₅)
Camelidae total		29	0	
Alpaca	<i>Vicugna pacos</i>	8	0	
Llama	<i>Lama glama</i>	12	0	
Dromedary	<i>Camelus dromedarius</i>	5	0	
Bactrian camel	<i>Camelus bactrianus</i>	4	0	
Perissodactyla				
South American tapir	<i>Tapirus terrestris</i>	2	0	
Metatheria total		15	1	6.66 (0.4–30.2)
Red-necked wallaby	<i>Macropus rufogriseus</i>	10	0	
Red kangaroo	<i>Macropus rufus</i>	5	1	
Leporidae				
European rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	3	0	
Rodentia				
Capybara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	6	0	
Common gundi	<i>Ctenodactylus gundi</i>	1	0	
Aves total		25	0	
Eurasian eagle owl	<i>Bubo bubo</i>	1	0	
Great horned owl	<i>Bubo virginianus</i>	1	0	
Greater rhea	<i>Rhea Americana</i>	5	0*	
Violet turaco	<i>Musophaga violacea</i>	1	0	
Salmon-crested cockatoo	<i>Cacatua moluccensis</i>	1	0	
Military macaw	<i>Ara militaris mexicana</i>	2	0	
Yellow-crowned amazon	<i>Amazona ochrocephala ochrocephala</i>	1	0	
Greater flamingo	<i>Phoenicopterus roseus</i>	5	0	
Great curassow	<i>Crax rubra rubra</i>	2	0	
Southern ground hornbill	<i>Bucorvus leadbeateri</i>	3	0	
Andean condor	<i>Vultur gryphus</i>	3	0*	
Reptilia total		12	5	41.66 (18.1–70.6)
Nile crocodile	<i>Crocodylus niloticus</i>	1	0	
Reticulate Gila monster	<i>Heloderma suspectum suspectum</i>	1	0	
African rock python	<i>Python sebae</i>	1	0	
Cuban tree boa	<i>Chilabothrus angulifer</i>	1	0	
Boa constrictor	<i>Boa constrictor</i>	1	0	
Yellow anaconda	<i>Eunectes notaeus</i>	1	0	
Leopard tortoise	<i>Stigmochelys pardalis</i>	1	1	
Spur-thighed tortoise (Greek tortoise)	<i>Testudo graeca</i>	1	1	
Giant Asian pond turtle	<i>Heosemys grandis</i>	1	1	
Radiated tortoise	<i>Astrochelys radiata</i>	1	1	
African spurred tortoise	<i>Centrochelys sulcata</i>	1	1	
Malaysian giant pond turtle	<i>Orlitia borneensis</i>	1	0	
Animals total		201	54	26.86 (23.1–31.0)

* excluded from phylogenetic analysis due to unresolved sequence data despite repeating PCR.

Animal stool samples (only fresh and after spontaneous defecation) were collected by their caregivers according to the zoo veterinarian's guidelines during the daily morning cleaning of animals' enclosures. Stool samples (placed into clean plastic containers) were transported to the laboratory a maximum of two hours later, and then stored in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until DNA extraction.

2.2. DNA Extraction and Amplification

Genomic DNA was extracted from animal and human stool samples, thawed immediately before extraction using the Genomic Mini AX Stool Kit (A&A Biotechnology, Gdynia,

Poland) according to the manufacturer's recommendation, and then stored at -20°C until further processing.

The obtained DNA templates were examined for the presence of *Blastocystis* by amplification of an approximately ~620bp fragment of 18S rRNA gene (called barcode region) using the forward RD5 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') and reverse BhrDr (5'-GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3') primers [26] as described in [27].

2.3. Nucleotide Sequencing and Phylogenetic Analysis

The PCR products were sequenced in both directions using a standard procedure with the primers used for amplification. The obtained sequences were assembled and aligned with the most similar *Blastocystis* sequences available at GenBank (in November 2020) using the MUSCLE algorithm with the default settings in Geneious Pro 9.1.8R (www.geneious.com, (assessed on 25 August 2021)). The alignment was edited manually to remove regions of ambiguity.

The phylogenetic analyses were performed with MEGA7 software (www.megasoftware.net, (assessed on 25 August 2021)) [28] using a maximum likelihood (ML) algorithm based on the Hasegawa-Kishino-Yano model [29] with 1000 bootstrap replicates. The best-fit model of nucleotide substitution was determined using the Akaike information criterion in Modeltest version 3.7 software [30]. The gene sequences of *Proteromonas lacertae* LA (NGBS01001136) were used as an outgroup. In order to classify the obtained sequences into STs, the open database for the classification of STs *Blastocystis* typing database (https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst_blastocystis_seqdef) (assessed on 25 August 2021) was used.

3. Results and Discussion

3.1. Infection Rate of *Blastocystis*

Of the 35 and 201 stool samples from humans and animals, respectively, six (17.14%) and 58 (28.43%) yielded PCR products congruent with *Blastocystis*. PCR products of *Blastocystis* isolates of four animals (two takins, a condor, and a rhea) were excluded from the phylogenetic analysis because of short length and poor quality despite the repetition of PCR, which ultimately yielded 54 (26.86%) animal representative sequences of *Blastocystis*. The percentage of infected animals in concerned host groups varied and was as follows: 80% in wild boars (Suidae), 90% in peccaries (Tayassuidae), 58.97% in NHPs, 34.78% in Bovidae, and 6.66% in Marsupials. Among reptiles, *Blastocystis* was detected in five of six turtles while in crocodiles, snakes and a *Hododerm* it was not found, resulting in a total of 41.66% of reptiles infected. No positive sample was found among carnivores and Aves (Table 1).

3.2. Detected Subtypes of *Blastocystis*

Among the six positive human samples, two subtypes, namely ST1 and ST3, were identified, each in three samples (50% each). In 49 out of 54 positive animal samples, eight subtypes were detected: ST1 (7.4%; 4/54), ST2 (13%; 7/54), ST3 (11.1%; 6/54), with ST13 (11.1%; 6/54) found only in NHPs, ST5 (31.5%; 17/54) only in wild boars and peccaries, ST10 (3.7%; 2/54) and ST14 (11.1%; 6/54) only in Bovidae, and ST8 (1.9%; 1/54) in a kangaroo. *Blastocystis* detected in five samples from turtles (9.3%) did not belong to any of the known mammalian and avian subtypes. The classification of the obtained sequences into STs based on the phylogenetic analysis was in agreement with the results of ST identification with the application of the open access bacterial population genomics: BIGSdb software, available on the PubMLST.org website. Detailed information on subtype distribution by the host is depicted in Table 2. Five of the eight subtypes detected in the zoo animals of Gdańsk (ST1, ST2, ST3, ST5, ST8; altogether 64.8%) are considered potentially zoonotic.

Table 2. Subtypes of *Blastocystis* detected in individual hosts. The ST are numbered according to ST designation in the PubMLST.org.

Sample id	Host	No of Identified Sequences	ST1 (n)	ST2 (n)	ST3 (n)	ST5 (n)	ST8 (n)	ST10 (n)	ST13 (n)	ST14 (n)	NMA ST (n)
6CZ, 7CZ, 10CZ, 22CZ, 23CZ, 33CZ	Human	6	3	-	3	-	-	-	-	-	-
	NHPs total	23	4	7	6	-	-	-	6	-	-
135R	Rhesus macaque	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
2S, 4S, 5S	Chimpanzee	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-
1P, 3P, 4P, 34P	Patas monkey	4	1	1	2	-	-	-	-	-	-
3M, 5M, 25M, 27M	Mandrill	4	3	-	1	-	-	-	-	-	-
1L-5L	Javan lutung	5	-	-	-	-	-	-	5	-	-
14GE-17GE	Guereza	4	-	3	-	-	-	-	1	-	-
18GI	Buff-cheeked gibbon	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
19GI	White-cheeked gibbon	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	Suidae										
171DZ-173DZ-175DZ-179DZ	Wild boar	8	-	-	-	8	-	-	-	-	-
	Tayassuidae										
161PE-164PE-166PE-170PE	Collared peccary	9	-	-	-	9	-	-	-	-	-
	Bovidae total	8	-	-	-	-	-	2	-	6	-
181-186KO	Domestic goat	7	-	-	-	-	-	2	-	5	-
189OW	Polish heath sheep	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	Metatheria										
86KA	Red kangaroo	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	Reptilia total	5	-	-	-	-	-	-	-	-	5
2Z	Leopard tortoise	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
3Z	Spur-thighed tortoise (Greek tortoise)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
5Z	Giant Asian pond turtle	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
4Z	Radiated tortoise	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
10Z	African spurred tortoise	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Animals total	54	4	7	6	17	1	2	6	6	5

3.3. Genetic Diversity of Detected *Blastocystis*

The results of phylogenetic analysis (Figure 1) showed that in the case of *Blastocystis* isolated from humans, only two subtypes, i.e., ST1 and ST3, were identified. *Blastocystis* of both of these subtypes found in humans were also detected in Old World monkeys, i.e., mandrills and patas (ST1) as well as in rhesus and gibbons (ST3).

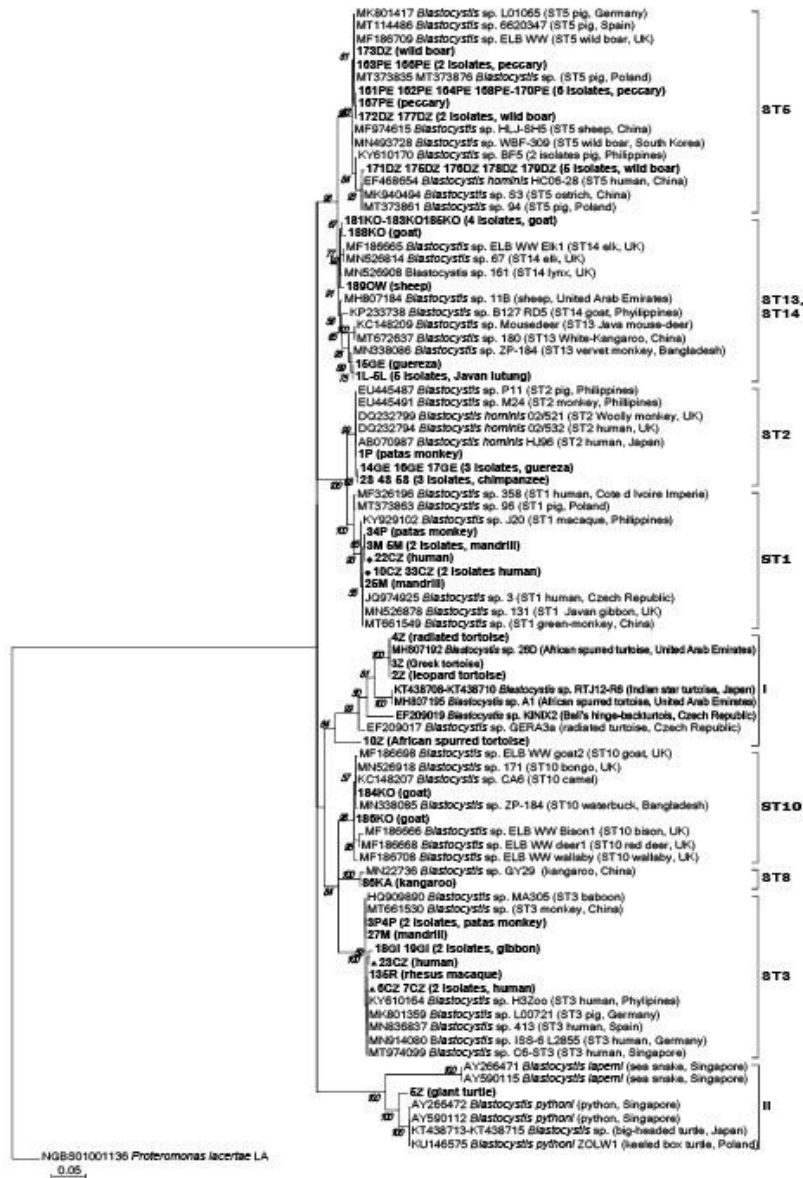


Figure 1. Molecular phylogenetic relationships of *Blastocystis* isolated from various animals and their caregivers from the Gdańsk Zoo. The phylogenetic analyses were performed with MEGA7 software using the maximum likelihood method and *Proteromonas lacertae* as an outgroup. Bootstrap values > 50% from 1000 replicates are shown on the nodes. The reference SSU rRNA *Blastocystis* sequences available at GenBank (in November 2020) are labeled with accession numbers, subtype number, the host, and locality if available. The *Blastocystis* sequences from this study with their host designations are shown in bold font. The sequences of *Blastocystis* ST1 and ST3 obtained from humans in this study are indicated by a dot and a triangle shape, respectively.

The ST1 sequence of a human (id. 22CZ) was identical with the sequences from two mandrills (id. 3M, 5M) and one patas (id. 34P). All of the four sequences had two single point mutations in the analyzed 574bp fragment of the 18S rRNA gene in comparison to *Blastocystis* sequences from GenBank, i.e., A-T transversion at the 207bp position and C-G transversion at 240bp, counting from the beginning of the alignment (Figure 2). The above-mentioned sequences are unique and have not been described hitherto in any other *Blastocystis* isolate apart from this study.

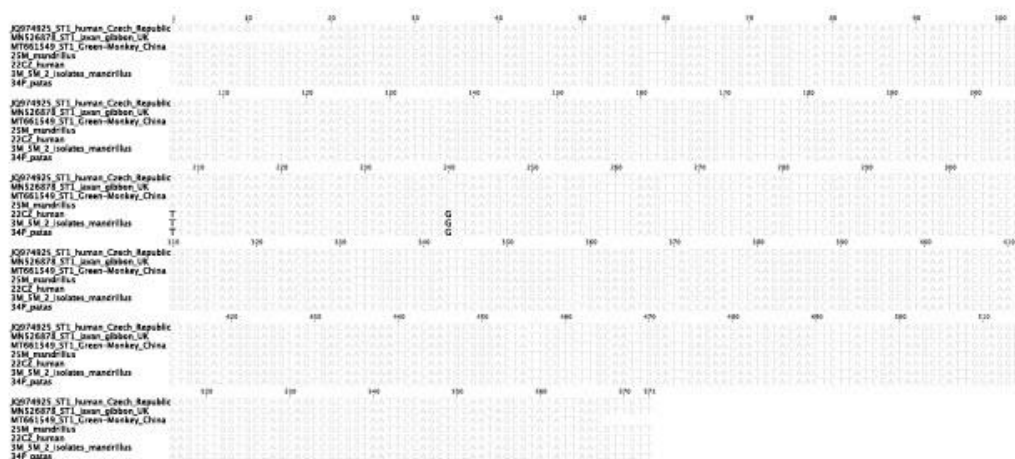


Figure 2. Sequence alignment of the 18S rRNA gene fragment of *Blastocystis* ST1 isolates. Nucleotides in bold represent SNPs at positions 207 and 240bp that are unique to Polish *Blastocystis* isolates 22CZ (from a human), 3M, 5M (from mandrills), and 34P (from a patas).

The sequence analysis showed that the sequences of ST3 were variable. Among them, a total of 17 polymorphic positions were observed (Figure 3). Among ST3 sequences detected in zoo workers in Gdańsk (id. 6CZ, 7CZ, 23CZ), five different SNPs were observed. They were clustered together with other *Blastocystis* sequences originating from humans from different countries and with the sequences obtained in this study from mandrill (27M), rhesus (135R), gibbons (18GI, 19GI), and patas monkeys (3P and 4P). However, the characteristic insertion of three nucleotides ATA at the 515–517bp positions, counting from the beginning of alignment, was observed only in the *Blastocystis* isolate originated from rhesus (Figure 3). In addition, nine polymorphic positions were noted in the gibbons' *Blastocystis* sequences, which may be the result of infection with different genetic variants of *Blastocystis*, as was reported by Vega et al. [31]. However, this hypothesis must be confirmed by cloning and separating different types of sequences.

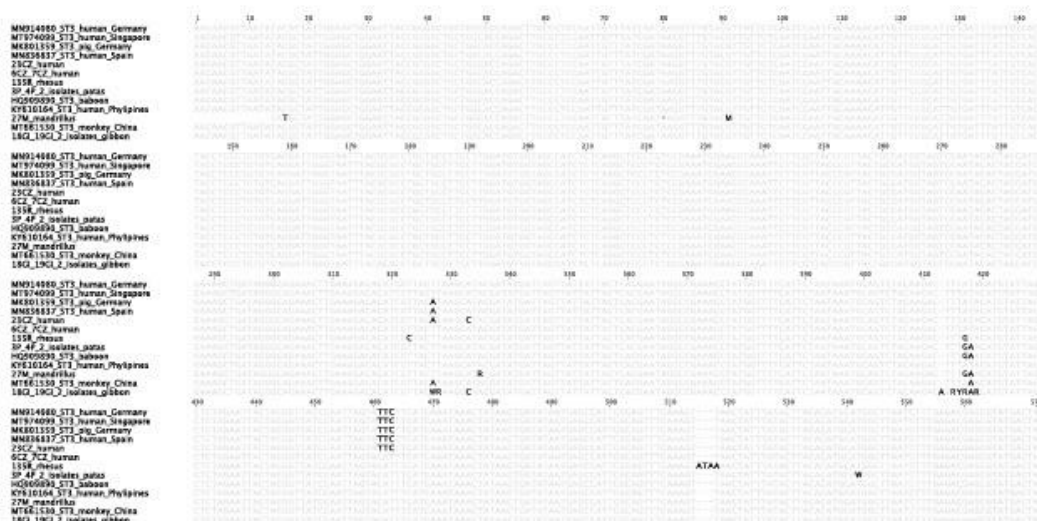


Figure 3. Sequence alignment of the 18S rRNA gene fragment of *Blastocystis* ST3 isolates. Nucleotides in bold represent unique mismatches with the reference sequences and insertions in the 18S rRNA gene sequence 135R of *Blastocystis* isolated from rhesus monkey.

Available data indicate that the infection rate of *Blastocystis* observed in both humans and animals varies depending on the study group, geographical region, and methods used in research. Since *Blastocystis* is a highly polymorphic organism and its cells are fragile and susceptible to damage, the use of molecular methods instead of microscopy provides more sensitive and accurate results, especially in low-intensity infections [1,32,33]. In the present study, the highest rate of *Blastocystis* infection, i.e., 80% and 90%, was observed respectively in wild boars and peccaries, followed by 58.97% in NHPs, and 34.78% in Bovidae (Table 1). Available reports on the occurrence of *Blastocystis* in wild boars recorded infection rates of 25% and 44% by microscopy [34,35] and 10.4%, 61.9%, and 76.9% when molecular methods were used [36–38]. A high infection rate for this protist (occasionally reaching 100%) has been described in the majority of reports concerning domestic pigs (closely related to wild boars) in various geographic regions of the world [21,27,39–43].

As for Bovidae, our study revealed *Blastocystis* in goats and sheep. In both cases, the observed infection rates of 87.5% (±CL₉₅ 50.0–99.4) for goats and 50% (±CL₉₅ 2.5–97.5) for sheep were in the upper range of *Blastocystis* prevalence previously recorded by different methods for these animals (0.3–94.7% for goats and 3.16–63.6% for sheep) [13,15,40,42,44–49]. The frequency of *Blastocystis* in NHPs in this study was in line with the data of many authors indicating that the percentage of infected individuals often exceeded 50% and even reached 100% [14,15,50–53].

As above-mentioned, ST5 was the only subtype detected in wild boars and peccaries in our study (Table 2). Similarly, ST5 was only observed in wild boars by Lee et al. [36], while Russini et al. [37], apart from ST5, recorded ST15 and a small number of ST3 in these animals. Hitherto ST5 was found mainly in pigs, and to a much lesser extent in other farm animals, such as cattle, goats, and sheep, which suggests that these animals are also sensitive to ST5 and may acquire this subtype from pigs when they live together or in close vicinity [11,19,45]. Occasionally, ST5 was also identified in humans working on pig farms with pigs harboring this subtype, indicating the possible transmission of ST5 from pigs to humans [21].

In our study, the sequences of all nine *Blastocystis* isolates obtained from peccaries and three isolates from wild boars were part of one clade. Along with these sequences,

this clade included two sequences of *Blastocystis* isolates from pigs reared in Poland and from wild boars from Germany, Spain, and Great Britain. *Blastocystis* sequences from the remaining five wild boars from the Gdańsk Zoo clustered in the second clade along with *Blastocystis* sequences from a pig reared in Poland, and human and ostrich sequences from China (Figure 1). Of note, captive animals eat and defecate in the same relatively small space, so if one animal becomes infected, the rest of the animals in the herd can easily acquire the infection. This seemed to occur in the herds of wild boars and peccaries in our study, as the enclosures for peccaries and wild boars were adjacent to each other. Both the species enjoy foraging in the mud, which may have favored the spread of *Blastocystis* within and between herds. To our knowledge, only one study has reported the occurrence of *Blastocystis* in a peccary's stool sample derived from the Center for the Conservation of Wild Fauna in Brazil. The sequence analysis confirmed the presence of *Blastocystis* in this sample; however, subtyping was unsuccessful [54]. Thus, our study was probably the first to identify the subtype of *Blastocystis*, namely ST5, in peccaries. It is worth noting that neither the people caring for wild boars and peccaries in the Gdańsk Zoo, nor other animals in the zoo, had ST5, which seems to confirm the high host specificity of this subtype. The obtained results confirmed that Suidae are the main hosts of ST5, and showed that peccaries, which belong to suborder Suina, like wild boars and pigs, are also susceptible to ST5.

ST10 and ST14 were detected in two and five goats tested, respectively. ST14 was also identified in one of the two sheep (Table 2). This is in line with other reports showing these subtypes as predominant in goats and sheep, and generally in wild and domesticated ruminants. Additionally, in previous studies, ST1, ST3–ST7, ST12, ST14, and ST15 were detected in these ruminants, but each of them much less frequently than ST10 and ST14 [13,19,44–47,49]. Importantly, goats and sheep from our survey stayed in the so-called “Little Zoo”—a separate enclosure where children can feed and touch tame animals, such as sheep, goats, and rabbits. Despite frequent contact with high numbers of zoo visitors, the goats and sheep did not acquire any subtype common in humans. Similarly, the results did not reveal any transfer of ST10 and ST14 from goats and sheep to their caregivers. This points out that ST10 and ST14 support a predilection for Bovidae while humans are not susceptible to these subtypes.

The sequence congruent to ST8 we identified only once—in one of the five red kangaroos sampled (Table 2). So far, a few kangaroos have been tested for *Blastocystis*, and different subtypes (ST4, ST10, ST12, ST13, and ST16) were identified in these animals [13,14,47,53,55]. To the best of our knowledge, this study was the first to identify ST8 in a red kangaroo. It follows that kangaroos are susceptible to infection with different subtypes and may constitute a reservoir of *Blastocystis*.

ST13 was detected in only two monkey species: in all five lutungs and in one of four guerezas (Table 2). Moreover, all six sequences were 100% identical (Figure 1). ST13 was observed in lutungs also by Li et al. [56] and in guerezas by Petrášová et al. [50]. Additionally, this subtype was also reported in golden snub-nosed monkeys [53] and vervet monkeys [50]. Originally ST13 was recognized in Australia in quokka (Marsupial) [55], followed by Western grey kangaroo [14], Java mouse-deer [15], and recently also in reindeer in China [48]. This shows that ST13, although rarely reported in animals, might have a wider host range. However, in the Gdańsk Zoo, this subtype was not detected in any of the animals, except for the mentioned species of monkeys. The presence of the identical sequences of ST13 in all tested lutungs and in only one of four guerezas (the remaining three had ST2) raises the question of whether the guereza acquired this subtype from the lutungs. Importantly, the enclosures of guerezas and lutungs in the Gdańsk Zoo are not adjacent to each other and are separated by the enclosures of patas and howler monkeys, in which ST13 did not occur. None of these species of monkeys had contact with each other in the zoo. Thus, it is highly likely that the ST13 was transferred from the yard of the lutungs to the yard of the guerezas by people caring for the monkeys, e.g., on their shoes.

Among the animals tested in this study, ST1, ST2, and ST3 were only detected in NHPs: ST1 in two species, ST2 in three species, and ST3 in four species (Table 2). To visualize the available data on *Blastocystis* STs in NHPs, we present the results obtained in monkeys from the Gdańsk Zoo and data reported for the same species by other authors in Table 3. These data show that among the eight subtypes reported hitherto in these species, ST1–ST3 clearly predominated, followed by ST5, while the remaining ST8, ST11, ST13, and ST15 occurred less frequently, or episodically.

Table 3. Comparison of *Blastocystis* subtypes identified in NHPs in this study with data obtained by other authors; A—monkeys native to Africa, As—monkeys native to Asia.

Host	<i>Blastocystis</i> STs								Reference
	-	ST2	-	-	-	-	-	-	
Chimpanzee (A) <i>Pan troglodytes</i>	-	ST2	ST3	ST5	-	-	-	ST15	This study [57]
	-	ST2	-	ST5	-	-	-	-	[15]
	-	ST2	-	-	-	-	-	-	[38]
	ST1	-	-	-	-	ST11	-	-	[14]
	-	ST2	-	-	-	-	-	-	[53]
	ST1	-	-	ST5	-	-	-	-	[58]
	ST1	-	-	-	-	-	-	-	[59]
	ST1	-	-	-	-	-	-	-	[11]
	ST1	-	-	-	-	-	-	-	[50]
ST1	ST2	ST3	ST5	-	-	-	-	[12]	
Buff-cheeked gibbon (As) <i>Nomascus gabriellae</i>	-	-	ST3	-	-	-	-	-	This study [57]
	ST1	-	ST3	-	-	-	-	-	[16]
	ST1	ST2	ST3	ST5	ST8	-	-	ST15	[15]
	ST1	-	-	-	-	-	-	-	[58]
	ST1	-	ST3	-	-	-	-	-	[12]
White-cheeked gibbon (As) <i>Nomascus leucogenys</i>	-	-	ST3	-	-	-	-	-	This study [60]
	ST1	ST2	ST3	-	-	-	-	-	[57]
Mandrill (A) <i>Mandrillus sphinx</i>	ST1	-	ST3	-	-	-	-	-	This study [57]
	ST1	-	-	-	-	-	-	-	[15]
	-	-	ST3	-	-	-	-	-	[53]
	ST1	-	ST3	-	-	-	-	-	[58]
	-	-	ST3	-	-	-	-	-	[54]
Rhesus macaque (As) <i>Macaca mulatta</i>	-	-	ST3	-	-	-	-	-	This study [53]
	ST1	ST2	ST3	-	-	-	-	-	[60]
	ST1	-	-	-	-	-	-	-	[61]
	ST1	ST2	ST3	-	-	-	-	-	[56]
	-	ST2	ST3	-	ST8	-	-	-	[38]
	-	ST2	ST3	-	-	-	-	-	[58]
	-	-	-	ST5	-	-	-	-	[11]
	ST1	ST2	-	-	-	-	-	-	[22]
Guerza (A) <i>Colobus guereza</i>	-	ST2	-	-	-	-	ST13	-	This study [57]
	ST1	ST2	ST3	-	-	-	-	-	[15]
	ST1	ST2	ST3	-	-	-	ST13	-	[50]
Patas monkey (A) <i>Erythrocebus patas</i>	ST1	ST2	ST3	-	-	-	-	-	This study [57]
	ST1	-	ST3	-	-	-	-	-	[57]
Javan lutung (As) <i>Trachypithecus auratus</i>	-	-	-	-	-	-	ST13	-	This study [57]
	ST1	-	ST3	ST5	-	-	ST13	-	[56]

It is worth noting that in our study in patas monkeys, three subtypes: ST1, ST2, and ST3 were identified, while in the only other study in which patas were tested, ST1 and ST3 alone were detected [57]. We found no other data on the occurrence of *Blastocystis* in patas, hence it appears that this study is the first to detect ST2 in patas monkeys.

Of the eight *Blastocystis* subtypes identified in this study, only ST1 and ST3 were present in both humans and animals (specifically monkeys) while the remaining subtypes were only detected in animals. The presence of ST1 and ST3 in NHPs and humans suggests that these hosts are susceptible to infection with the same subtypes and therefore mutual contagion is possible. However, the mere presence of the same STs in animals and humans cannot be sufficient evidence for zoonotic transmission of *Blastocystis*. Stensvold et al. noted that the ST3 found in NHPs were more genetically diverse than the ST3 isolated from humans [62]. Evidently, in nature, as humans usually are not in contact with monkeys, the human and monkey *Blastocystis* gene pools do not mix and evolve separately. However, in one case of our study, we observed that not only the same subtype, namely ST1, but also the sequences of that subtype obtained from two mandrills and one patas, were identical to the sequence of ST1 isolated from the man who had contact with the monkeys (Figure 1). The highly probable transmission of *Blastocystis* from monkeys to humans was described by Stensvold et al. who identified ST8 (normally very rare in humans) in four out of sixteen animal handlers who had contacts with monkeys harboring this subtype [12]. In another study, the comparison of the 150bp variable region of the SSU rRNA gene of ST2 isolated from four children and rhesus monkeys living in the same area showed that the sequences were identical [22]. Our own and cited observations indicate that under favorable conditions, *Blastocystis* can spread between NHPs and humans, but it may be difficult or impossible to determine the direction of the transmission.

It is also worth noting that mandrills and patas monkeys (as is the case with lutungs and guerezas) have no contact with each other in the Gdańsk Zoo, and their enclosures are not adjacent to each other. This raises the suspicion that ST1 may have been transferred from the mandrill herd to the patas monkey by the humans caring for them, and confirms that related species are open to infection with the same subtypes. The relatively close relationship between monkeys and humans may explain the fact that the same subtypes (ST1, ST2, and ST3) were dominant in both of these hosts.

In this study, *Blastocystis* was not detected in any of the wild carnivores tested (Table 1). This is in concordance with several other reports [13,40,53,55,63]. In a few other studies this microorganism was found in wild carnivores, although the number of positive results in relation to the number of examined samples was always low, e.g., 4 of 213 Arctic foxes, 4 of 181 red foxes [64], 3 of 40 raccoon dogs [48], 1 of 7 African wild dogs [65], 1 of 4 grey wolves [15], 2 of 23 red pandas, and 10 of 81 giant pandas [66]. A similar low percentage of infected individuals were observed among wild felids, such as Scottish wildcats (1 of 13), lynxes (2 of 9) [16], white Bengal tigers (1 of 9), Siberian tigers (1 of 13) [65] and snow leopards (1 of 6) [14] as well as in carnivorous common genet (1 of 11) belonging to the Viverridae [64]. Our study included only single individuals of carnivores of different species, and this could have been the reason why *Blastocystis* was not detected in these animals. According to Farah Haziqah et al. [67], the factor responsible for the low frequency of *Blastocystis* in this group of animals may be the highly acidic pH in the gastrointestinal tract of carnivores (that may adversely affect the viability of *Blastocystis* cells). Although numerous subtypes of *Blastocystis* (ST1–ST6, ST8, ST10, ST14, and ST17) have been recorded in carnivores so far, none of them is specifically assigned to this group of animals. However, it is worth noting that in domestic dogs and cats, ST1–ST4 are predominant [68–71], which seems to suggest the possibility of *Blastocystis* transmission from humans to household dogs and cats. In the study of Nagel et al. [68] concerning people with gastrointestinal disorders and their dogs and cats, at least one common *Blastocystis* ST was observed in a pair: an animal and its owner.

As for birds, similar to carnivores, only single individuals of various bird species were tested in our study. Among them two samples (from a condor and a rhea) yielded

products congruent with *Blastocystis*; however, their subtypes could not be determined due to unrecognized sequence data (Table 1). Until now, studies involved mainly chickens (*Gallus gallus domesticus*), while other domestic fowl and wild birds were examined less frequently. Among numerous subtypes recorded in birds (ST1, ST2, ST4–ST8, ST10, ST13, ST14, ST24, ST27, ST28), the vast majority were ST6 and ST7, considered therefore as “avian subtypes” [11,17,19,65,72–74]. Notably, the ST3, one of the most common subtypes in humans, has not been recorded in birds as yet, while ST6 and ST7, which are most common in birds, are rarely seen in humans [75,76]. Regarding wild and zoo birds, attention has been drawn by reports on the results of studies on ostriches, in which the ST5 was most often identified, but ST6, ST4 and ST10 were also observed sporadically [14,15,40,53,65,74]. In a study by Cian et al. [15] involving a group of over 70 birds of different families from two French zoos, *Blastocystis* was found in only seven samples. Similarly, from 109 samples of birds of different species, Maloney et al. found *Blastocystis* only in 16 of them [74]. This may suggest that *Blastocystis* in birds is either sparse or, for unknown reason, difficult to detect, and therefore may not have been detected in our group consisting of merely 25 individuals. To complete the picture of birds as a potential reservoir of *Blastocystis*, it should be added that the possibility of transmission of this microorganism between domestic birds (chickens, quails, and geese) as well as the infection of birds with human *Blastocystis* isolates has been documented [25,77].

Of the 12 reptile samples (each of a different species) tested in this study, *Blastocystis* was detected in five out of six turtles, resulting in 83.33% (\pm CL₉₅ 41.1–99.1) of the infection rate in the Testudinate group (Tables 1 and 2). Reptiles are a poorly studied group for *Blastocystis*. In the only report that included a larger group of turtles, i.e., 21 individuals, the percentage of infected animals was 28.5% [49]. Although the data on *Blastocystis* in reptiles are limited, they show a significant area of discrepancy between mammalian and avian *Blastocystis* sequences and those from reptiles, which may reflect evolutionary discrepancies between their respective hosts [15,49,78–80]. This discrepancy is also seen in our study in which *Blastocystis* isolated from turtles formed two independent clades, both distinct from those of mammals (Figure 1). The sequences of leopard, Greek, and radiated tortoises were identical and 99.49–99.66% concordant with the MH807192 sequence of a tortoise from the United Arab Emirates [49] with 7 SNPs. There is a high possibility of transmission of *Blastocystis* between these three tortoises in the Gdańsk Zoo, as they remain in full contact with each other during summer, when they are exposed together in the same outdoor enclosure and are fed with the same plant food (dandelion, iceberg lettuce, romaine lettuce, bananas, tomatoes, apples, beetroots, and parsley). Interestingly, the sequence of *Blastocystis* in the spurred tortoise, which also shares the enclosure with the above-mentioned tortoises in summer and eats the same food, differed significantly from their sequences and was only 85–91% concordant with other sequences of terrestrial herbivorous reptiles from GenBank (Figure 1). To explain the intriguing finding that the spurred tortoise maintained its own *Blastocystis* despite a similar lifestyle and sharing an enclosure with leopard, Greek, and radiated tortoises, further research on samples taken from turtles is needed. Another puzzling observation is that the sequence of *Blastocystis* in the giant Asian pond turtle was the only one that clustered separately together with the carnivorous aquatic reptile sequences: AY266472, AY590112 from pythons, KT438713–KT438715 from big-headed turtles, and KU146575 from keeled box turtle, with 100% bootstrap support (Figure 1). The giant turtle in the Gdańsk Zoo does not come into contact with other tortoises, and its diet, apart from above-mentioned plant food, includes beef. Under natural conditions, the diet of this turtle consists of worms, larvae, insects, snails, deceased animals, and aquatic and terrestrial plants [81]. It is highly probable that this omnivorous turtle kept in the Gdańsk Zoo hunts some of the invertebrates in its outdoor enclosure, which includes a pond, during the summer season. Therefore, it cannot be ruled out that this turtle became colonized by *Blastocystis* strains harbored by their victims. Hence, it would be worth examining the role of invertebrates in the transmission of *Blastocystis*. This supposition is supported by a recent study of cockroaches and golden monkeys living in the same area, in

which in 82.8% of cockroaches tested, only the ST2 was found, while among three subtypes (ST1, ST2, ST3) detected in monkeys, ST2 was predominant [58].

4. Conclusions

Our study confirmed the occurrence of different *Blastocystis* STs in different hosts. The lower host specificity was observed in the cases of ST1 and ST3, which were detected in both humans and NHPs, showing that both humans and NHPs are susceptible to these subtypes. Additionally, the detection of the identical sequences of ST1 in three monkeys and the human who had contact with them demonstrated that under favorable conditions, direct transmission of *Blastocystis* between NHPs and humans is almost certainly possible. The detection of ST5 only in Suina, ST8 only in a marsupial, and ST10 and ST14 only in Bovidae indicates a higher host specificity for these subtypes, and a lower probability of infecting humans with them.

The shortcoming of our study is that for carnivores, birds, and reptiles, we had samples only from single animals of each species, which did not allow us to draw conclusions in relation to these groups of animals. Despite this, some interesting observations emerged from this study, making a valuable contribution to the full understanding of the circulation of *Blastocystis* between animals and humans, and the role of various animals as reservoirs for human infection. Future research should be expanded to free and captive reptiles (derived from zoos, reptile breeders, and reptile hobbyists) to improve the understanding of the genetic diversity, host specificity, and transmission patterns of *Blastocystis* in this poorly studied group of animals. Furthermore, in the search for sources of *Blastocystis* infection, research of invertebrates should be considered, as they may be a potential reservoir and/or a vector of *Blastocystis* infection for animals and humans.

Author Contributions: Conceptualization, M.R. and B.S.; methodology, M.R.; validation, M.R. and B.S.; formal analysis, M.R., B.K., and M.W.; investigation, M.R., M.W., and B.K.; resources, M.K., M.W., K.S., and B.S.; data curation, M.R. and M.W.; writing—original draft preparation, M.R.; writing—review and editing, M.R., M.K., and B.S.; visualization, M.R. and B.K.; supervision, B.S. and K.S.; project administration, K.S.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant number ST-02-0131/07/773 from the Medical University of Gdańsk.

Institutional Review Board Statement: All the procedures used in this study were approved by the Ethics Committee of Medical University of Gdańsk (Poland), (No. NKBBN/334/2017) and were conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all zoo staff participating in the study.

Data Availability Statement: The sequences obtained and analyzed during this study were deposited in the GenBank database under the accession numbers MW682185–MW682218.

Acknowledgments: The authors thank the director of the Gdańsk Zoo, MICHAŁ TARGOWSKI for his consent and support in the accomplishment of this project, and the employees of the Zoo participating in the project for their cooperation. Monika Rudzińska dedicates this article to the memory of her husband DARIUSZ RUDZIŃSKI, who died on 27 August 2020, after losing his fight against cancer, and who was an unparalleled life companion and a reliable, constant support for his family.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 763–771. [CrossRef] [PubMed]
2. Roberts, T.; Stark, D.; Harkness, J.; Ellis, J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog.* **2014**, *6*, 17–25. [CrossRef] [PubMed]
3. Bahrami, F.; Babaei, E.; Badirzadeh, A.; Riabi, T.R.; Abdoli, A. *Blastocystis*, urticaria, and skin disorders: Review of the current evidences. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**. [CrossRef]
4. Scanlan, P.D.; Stensvold, C.R.; Rajilić-Stojanović, M.; Heilig, H.G.H.J.; De Vos, W.M.; O'Toole, P.W.; Cotter, P.D. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *90*, 326–330. [CrossRef] [PubMed]
5. Audebert, C.; Even, G.; Cian, A.; Loywick, A.; Merlin, S.; Viscogliosi, E.; Chabe, M. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25255. [CrossRef] [PubMed]
6. Andersen, L.O.B.; Stensvold, C.R. *Blastocystis* in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 524–528. [CrossRef]
7. Laforest-Lapointe, I.; Arrieta, M.-C. Microbial Eukaryotes: A Missing Link in Gut Microbiome Studies. *mSystems* **2018**, *3*, 1–5. [CrossRef]
8. Clark, C.G.; van der Giezen, M.; Alfellani, M.A.; Stensvold, C.R. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv. Parasitol.* **2013**, *82*, 1–32. [CrossRef]
9. Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Pre-empting Pandora's Box: *Blastocystis* Subtypes Revisited. *Trends Parasitol.* **2020**, *36*, 229–232. [CrossRef]
10. Maloney, J.G.; Santin, M. Mind the gap: New full-length sequences of *Blastocystis* subtypes generated via oxford nanopore minion sequencing allow for comparisons between full-length and partial sequences of the small subunit of the ribosomal rna gene. *Microorganisms* **2021**, *9*, 997. [CrossRef]
11. Yoshikawa, H.; Abe, N.; Wu, Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology* **2004**, *150*, 1147–1151. [CrossRef] [PubMed]
12. Stensvold, C.R.; Alfellani, M.A.; Nørskov-Lauritsen, S.; Prip, K.; Victory, E.L.; Maddox, C.; Nielsen, H.V.; Clark, C.G. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 473–479. [CrossRef] [PubMed]
13. Alfellani, M.A.; Taner-Mulla, D.; Jacob, A.S.; Imeede, C.A.; Yoshikawa, H.; Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. *Protist* **2013**, *164*, 497–509. [CrossRef]
14. Roberts, T.; Stark, D.; Harkness, J.; Ellis, J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Vet. Parasitol.* **2013**, *196*, 85–89. [CrossRef]
15. Cian, A.; El Safadi, D.; Osman, M.; Morinière, R.; Gantois, N.; Benamrouz-Vanneste, S.; Delgado-Viscogliosi, P.; Guyot, K.; Li, L.L.; Monchy, S.; et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169659. [CrossRef] [PubMed]
16. Betts, E.L.; Gentekaki, E.; Thomasz, A.; Breakell, V.; Carpenter, A.L.; Tsaousis, A.D. Genetic diversity of *Blastocystis* in non-primate animals. *Parasitology* **2017**, *1–7*. [CrossRef]
17. Greige, S.; El Safadi, D.; Bécu, N.; Gantois, N.; Pereira, B.; Chabé, M.; Benamrouz-Vanneste, S.; Certad, G.; El Hage, R.; Chemaly, M.; et al. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 1–10. [CrossRef]
18. Weining, Z.; Tao, W.; Gong, B.; Yang, H.; Li, Y.; Song, M.; Lu, Y.; Li, W. First report of *Blastocystis* infections in cattle in China. *Vet. Parasitol.* **2017**, *246*, 38–42. [CrossRef]
19. Wang, J.; Gong, B.; Yang, F.; Zhang, W.; Zheng, Y.; Liu, A. Subtype distribution and genetic characterizations of *Blastocystis* in pigs, cattle, sheep and goats in northeastern China's Heilongjiang Province. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *57*, 171–176. [CrossRef]
20. Wawrzyniak, I.; Poirier, P.; Texier, C.; Delbac, F.; Viscogliosi, E.; Dionigia, M.; Alaoui, H.E. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: An overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **2013**, *1*, 167–178. [CrossRef]
21. Wang, W.; Owen, H.; Traub, R.J.; Cuttill, L.; Inpankaew, T.; Bielefeldt-Ohmann, H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet. Parasitol.* **2014**, *203*, 264–269. [CrossRef]
22. Yoshikawa, H.; Wu, Z.; Pandey, K.; Pandey, B.D.; Sherchand, J.B.; Yanagi, T.; Kanbara, H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet. Parasitol.* **2009**, *160*, 295–300. [CrossRef]
23. Ruau, C.G.; Stang, B.V. Prevalence of *Blastocystis* in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e0107496. [CrossRef]
24. Pakandl, M.; Koudela, B.; Vitovec, J. An experimental infection of conventional and gnotobiotic piglets with human and porcine strains of *Blastocystis*. *Folia Parasitol* **1993**, *40*, 319–320.
25. Iguchi, A.; Ebisu, A.; Nagata, S.; Saitou, Y.; Yoshikawa, H.; Iwatani, S.; Kimata, I. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol. Int.* **2007**, *56*, 107–112. [CrossRef]
26. Scicluna, S.M.; Tawari, B.; Clark, C.G. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* **2006**, *157*, 77–85. [CrossRef]

27. Rudzińska, M.; Kowalewska, B.; Szostakowska, B.; Grzybek, M.; Sikorska, K.; Świątańska, A. First report on the occurrence and subtypes of *Blastocystis* in pigs in Poland using sequence-tagged-site pcr and barcode region sequencing. *Pathogens* **2020**, *9*, 595. [CrossRef] [PubMed]
28. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [CrossRef] [PubMed]
29. Hasegawa, M.; Kishino, H.; Yano, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mo. Evol.* **1985**, *22*, 160–174. [CrossRef] [PubMed]
30. Posada, D.; Crandall, K.A. A note on chaotic unimodal maps and applications. *Bioinformatics* **1998**, *14*, 817–818. [CrossRef]
31. Vega, L.; Herrera, G.; Muñoz, M.; Patarroyo, M.A.; Maloney, J.G.; Santín, M.; Ramirez, J.D. Gut microbiota profiles in diarrhetic patients with co-occurrence of *Clostridioides difficile* and *Blastocystis*. *PLoS ONE* **2021**, *16*, 1–23. [CrossRef]
32. Dogruman-AI, F.; Simsek, Z.; Boorum, K.; Ekici, E.; Sahin, M.; Tuncer, C.; Kustimur, S.; Altinbas, A. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15484. [CrossRef] [PubMed]
33. Roberts, T.; Barratt, J.; Harkness, J.; Ellis, J.; Stark, D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *84*, 308–312. [CrossRef]
34. Solaymani-Mohammadi, S.; Rezaian, M.; Hooshyar, H.; Mowlavi, G.R.; Babaei, Z.; Anwar, M.A. Intestinal protozoa in wild boars (*Sus scrofa*) in western Iran. *J. Wildl. Dis.* **2004**, *40*, 801–803. [CrossRef] [PubMed]
35. Yaghoobi, K.; Sarkari, B.; Mansouri, M.; Motazedian, M.H. Zoonotic intestinal protozoan of the wild boars, *Sus scrofa*, in Persian Gulf's coastal area (Bushehr province), Southwestern Iran. *Vet. World* **2016**, *9*, 1047–1050. [CrossRef]
36. Lee, H.; Seo, M.-G.; Oem, J.-K.; Kim, Y.-S.; Lee, S.-Y.; Kim, J.; Jeong, H.; Jheong, W.-H.; Kim, Y.; Lee, W.-J.; et al. Molecular Detection and Subtyping of *Blastocystis* Detected in Wild Boars (*Sus scrofa*) in South Korea. *J. Wildl. Dis.* **2020**, *56*, 662–666. [CrossRef] [PubMed]
37. Russini, V.; Di Filippo, M.M.; Fanelli, R.; Polidori, M.; Berrilli, F.; Di Cave, D.; Novelletto, A.; Calderini, P. Characterization of prevalence and genetic subtypes of *Blastocystis* sp. in wild and domestic Suidae of central Italy aided by amplicon NGS. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* **2020**, *22*, 100472. [CrossRef] [PubMed]
38. Valença-Barbosa, C.; Do Bomfim, T.C.B.; Teixeira, B.R.; Gentile, R.; Da Costa Neto, S.F.; Magalhães, B.S.N.; De Almeida Balthazar, D.; Da Silva, E.A.; Biot, R.; D'Avila Levy, C.M.; et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* isolated from animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210740. [CrossRef]
39. Yan, Y.; Su, S.; Ye, J.; Lai, X.; Lai, R.; Liao, H.; Chen, G.; Zhang, R.; Hou, Z.; Luo, X. *Blastocystis* sp. subtype 5: A possibly zoonotic genotype. *Parasitol. Res.* **2007**, *101*, 1527–1532. [CrossRef]
40. Chandrasekaran, H.; Chandrawathani, P.; Bathmanaban, P. The diagnosis of *Blastocystis* sp. from animals - an emerging zoonosis. *Malays. J. Vet. Res.* **2014**, *5*, 15–22.
41. Song, J.K.; Hu, R.S.; Fan, X.C.; Wang, S.S.; Zhang, H.J.; Zhao, G.H. Molecular characterization of *Blastocystis* from pigs in Shaanxi province of China. *Acta Trop.* **2017**, *173*, 130–135. [CrossRef]
42. Moura, R.G.F.; de Oliveira-Silva, M.B.; Pedrosa, A.L.; Nascentes, G.A.N.; Cabrine-Santos, M. Occurrence of *Blastocystis* spp. In domestic animals in triângulo mineiro area of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2018**, *51*, 240–243. [CrossRef] [PubMed]
43. Rivero-Juarez, A.; Dashti, A.; López-López, P.; Muadica, A.S.; Risalde, M.D.L.A.; Risalde, M.D.L.A.; Köster, P.C.; Machuca, I.; Bailo, B.; De Mingo, M.H.; et al. Protist enteroparasites in wild boar (*Sus scrofa ferus*) and black Iberian pig (*Sus scrofa domesticus*) in southern Spain: A protective effect on hepatitis e acquisition? *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
44. Tan, T.C.; Tan, P.; Sharma, R.; Sugnaseelan, S.; Suresh, K. Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia. *Parasitol. Res.* **2013**, *112*, 85–89. [CrossRef] [PubMed]
45. Song, J.K.; Yin, Y.L.; Yuan, Y.J.; Tang, H.; Ren, G.J.; Zhang, H.J.; Li, Z.X.; Zhang, Y.M.; Zhao, G.H. First genotyping of *Blastocystis* sp. in dairy, meat, and cashmere goats in northwestern China. *Acta Trop.* **2017**, *176*, 277–282. [CrossRef] [PubMed]
46. Li, W.C.; Wang, K.; Gu, Y. Occurrence of *Blastocystis* sp. and *Pentatrichomonas hominis* in sheep and goats in China. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 1–7. [CrossRef]
47. Udonsom, R.; Prasertbun, R.; Mahittikorn, A.; Mori, H.; Changbunjong, T.; Komalamista, C.; Pintong, A.R.; Sukthana, Y.; Popruk, S. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *65*, 107–111. [CrossRef]
48. Wang, J.; Gong, B.; Liu, X.; Zhao, W.; Bu, T.; Zhang, W.; Liu, A.; Yang, F. Distribution and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in various mammal and bird species in northeastern China. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 1–7. [CrossRef]
49. AbuOdeh, R.; Ezzedine, S.; Madkour, M.; Stensvold, C.R.; Samie, A.; Nasrallah, G.; AlAbisi, E.; ElBakri, A. Molecular Subtyping of *Blastocystis* from Diverse Animals in the United Arab Emirates. *Protist* **2019**, *170*, 125679. [CrossRef]
50. Petrášová, J.; Uzlíková, M.; Kostka, M.; Petřelková, K.J.; Huffman, M.A.; Modrý, D. Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41*, 1113–1120. [CrossRef] [PubMed]
51. Helenbrook, W.D.; Shields, W.M.; Whipps, C.M. Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata* aequatorialis, living in close proximity to one another. *Parasitol. Res.* **2015**, *114*, 2517–2525. [CrossRef] [PubMed]

52. Zarzani, S.A.; Gazzonis, A.L.; Epis, S.; Manfredi, M.T. Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 307–312. [[CrossRef](#)]
53. Zhao, G.H.; Hu, X.F.; Liu, T.L.; Hu, R.S.; Yu, Z.Q.; Yang, W.B.; Wu, Y.L.; Yu, S.K.; Song, J.K. Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qindling Mountains. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 2327–2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Oliveira-Arbex, A.P.; David, É.B.; Tenório, M.d.S.; Cicchi, P.J.P.; Patti, M.; Coradi, S.T.; Lucheis, S.B.; Jim, J.; Guimarães, S. Diversity of *Blastocystis* subtypes in wild mammals from a zoo and two conservation units in southeastern Brazil. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, *78*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Parkar, U.; Traub, R.J.; Vitali, S.; Elliot, A.; Levecke, B.; Robertson, I.; Geurden, T.; Steele, J.; Drake, B.; Thompson, R.C.A. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet. Parasitol.* **2010**, *169*, 8–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Li, J.; Karim, M.R.; Li, D.; Rahaman Sumon, S.M.M.; Siddiki, S.H.M.E.; Rume, F.I.; Sun, R.; Jia, Y.; Zhang, L. Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wildlife in Bangladesh National Zoo: Non-human primates with high prevalence and zoonotic significance. *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* **2019**, *10*, 314–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Alfellani, M.A.; Jacob, A.S.; Perea, N.O.; Krecek, R.C.; Taner-Mulla, D.; Verweij, J.J.; Levecke, B.; Tannich, E.; Clarck, C.G. Rune Stensvold Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology* **2013**, *140*, 966–971. [[CrossRef](#)]
58. Ma, L.; Zhang, Y.; Qiao, H.; Li, S.; Wang, H.; Zhang, N.; Zhang, X. Cockroach as a vector of *Blastocystis* sp. Is risk for golden monkeys in zoo. *Korean J. Parasitol.* **2020**, *58*, 583–587. [[CrossRef](#)]
59. Abe, N.; Wu, Z.; Yoshikawa, H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. *Vet. Parasitol.* **2003**, *113*, 321–325. [[CrossRef](#)]
60. Deng, L.; Yao, J.; Chen, S.; He, T.; Chai, Y.; Zhou, Z.; Shi, X.; Liu, H.; Zhong, Z.; Fu, H.; et al. First identification and molecular subtyping of *Blastocystis* sp. in zoo animals in southwestern China. *Parasit. Vectors* **2021**, *14*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Zhu, W.; Wei, Z.; Li, Q.; Lin, Y.; Yang, H.; Li, W. Prevalence and subtype diversity of *Blastocystis* in human and nonhuman primates in North China. *Parasitol. Res.* **2020**, *119*, 2719–2725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Stensvold, C.R.; Alfellani, M.; Clark, C.G. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12*, 263–273. [[CrossRef](#)]
63. Lim, Y.A.L.; Ngui, R.; Shukri, J.; Rohela, M.; Mat Naim, H.R. Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. *Vet. Parasitol.* **2008**, *157*, 154–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Calero-Bernal, R.; Santín, M.; Maloney, J.G.; Martín-Pérez, M.; Habela, M.A.; Fernández-García, J.L.; Figueiredo, A.; Nájera, F.; Palacios, M.J.; Mateo, M.; et al. *Blastocystis* sp. Subtype Diversity in Wild Carnivore Species from Spain. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2019**, *273*–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Li, X.D.; Zou, Y.; Pan, J.; Liang, Q.L.; Zeng, Z.; Meng, Y.M.; Wang, X.L.; Wang, H.N.; Zhu, X.Q. Prevalence and subtypes of *Blastocystis* sp. infection in zoo animals in three cities in China. *Parasitol. Res.* **2020**, *119*, 465–471. [[CrossRef](#)]
66. Deng, L.; Yao, J.X.; Liu, H.F.; Zhou, Z.Y.; Chai, Y.J.; Wang, W.Y.; Zhong, Z.J.; Deng, J.L.; Ren, Z.H.; Fu, H.L.; et al. First report of *Blastocystis* in giant pandas, red pandas, and various bird species in Sichuan province, southwestern China. *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* **2019**, *9*, 298–304. [[CrossRef](#)]
67. Farah Haziqah, M.T.; Chandrawathani, P.; Douadi, B.; Suresh, K.; Wilson, J.J.; Mohd Khalid, M.K.N.; Rajamanikam, A.; Lewis, J.W.; Mohd Zain, S.N. Impact of pH on the viability and morphology of *Blastocystis* isolates. *Trop. Biomed.* **2018**, *35*, 501–510.
68. Nagel, R.; Cuttler, L.; Stensvold, C.R.; Mills, P.C.; Bielefeldt-Ohmann, H.; Traub, R.J. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Intern. Med. J.* **2012**, *42*, 1187–1195. [[CrossRef](#)]
69. Belleza, M.L.B.; Reyes, J.C.B.; Tongol-Rivera, P.N.; Rivera, W.L. Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from human and canine hosts in an urban community in the Philippines. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 291–294. [[CrossRef](#)]
70. Liao, S.; Lin, X.; Sun, Y.; Qi, N.; Lv, M.; Wu, C.; Li, J.; Hu, J.; Yu, L.; Cai, H.; et al. Occurrence and genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Blastocystis* sp. in household, shelter, breeding, and pet market dogs in Guangzhou, southern China. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–11. [[CrossRef](#)]
71. Mohammadpour, I.; Bozorg-Ghalati, F.; Gazzonis, A.L.; Manfredi, M.T.; Motazedian, M.H.; Mohammadpour, N. First molecular subtyping and phylogeny of *Blastocystis* sp. isolated from domestic and synanthropic animals (dogs, cats and brown rats) in southern Iran. *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ramírez, J.D.; Sánchez, L.V.; Bautista, D.C.; Corredor, A.F.; Flórez, A.C.; Stensvold, C.R. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *22*, 223–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Asghari, A.; Sadrae, I.J.; Pirestani, M.M.I. First molecular identification and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolated from hooded crows (*Corvus cornix*) and pigeons (*Columba livia*) in Tehran Province, Iran. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *62*, 25–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Maloney, J.G.; Molokin, A.; da Cunha, M.J.R.; Cury, M.C.; Santin, M. *Blastocystis* subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using next generation amplicon sequencing. *Parasit. Epidemiol. Control.* **2020**, *9*, e00138. [[CrossRef](#)]
75. Hublin, J.S.Y.; Maloney, J.G.; Santin, M. *Blastocystis* in domesticated and wild mammals and birds. *Res. Vet. Sci.* **2021**, *135*, 260–282. [[CrossRef](#)]

76. Alfellani, M.A.; Stensvold, C.R.; Vidal-Lapiedra, A.; Onuoha, E.S.U.; Fagbenro-Beyioku, A.F.; Clark, C.G. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* **2013**, *126*, 11–18. [[CrossRef](#)]
77. Tanizaki, A.; Yoshikawa, H.; Iwatani, S.; Kimata, I. Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. *Parasitol. Res.* **2005**, *96*, 57–61. [[CrossRef](#)]
78. Teow, W.L.; Ng, G.C.; Chan, P.P.; Chan, Y.C.; Yap, E.H.; Zaman, V.; Singh, M. A survey of *Blastocystis* in reptiles. *Parasitol. Res.* **1992**, *78*, 453–455. [[CrossRef](#)]
79. Noël, C.; Dufernez, F.; Gerbod, D.; Edgcomb, V.P.; Delgado-Viscogliosi, P.; Ho, L.C.; Singh, M.; Wintjens, R.; Sogin, M.L.; Capron, M.; et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: Implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 348–355. [[CrossRef](#)]
80. Yoshikawa, H.; Koyama, Y.; Tsuchiya, E.; Takami, K. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 750–759. [[CrossRef](#)]
81. Lintner, M.; Weissenbacher, A.; Heiss, E. The Oropharyngeal Morphology in the Semiaquatic Giant Asian Pond Turtle, *Heosemys grandis*, and Its Evolutionary Implications. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

PRACA „DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZARAŻEŃ *BLASTOCYSTIS* – WYZWANIA I KONTROWERSJE”

Ze względu na znaczny polimorfizm oraz delikatną, łatwo ulegającą uszkodzeniu strukturę komórek *Blastocystis*, rozpoznanie zarażenia jest trudne i w dużym stopniu zależy od stosowanych metod diagnostycznych. W międzylaboratoryjnych badaniach porównawczych *Blastocystis* jest najbardziej niespójnie wykrywanym eukariontem jelitowym. Dodatkowym problemem w rozpoznaniu blastocystozy jest brak kryteriów odróżniających kolonizację od patologicznej inwazji.

WNIOSEK

Potrzebny jest ujednolicony schemat postępowania w diagnostyce blastocystozy.

PRACA „OCENA CZĘSTOŚCI ZARAŻEŃ PASOŻYTMAMI JELITOWYMI WŚRÓD PACJENTÓW PRZYCHODNI INSTYTUTU MEDYCyny MORSKIEJ I TROPIKALNEJ W GDYNI W OKRESIE OSTATNICH 30 LAT”

W badanej grupie pacjentów PCHZTP IMMiT w parazytologicznych badaniach koprologicznych *Blastocystis* był najczęściej wykrywanym eukariontem jelitowym, a w latach 1992-2010 częstość zarażenia nim ludzi wzrosła 14-krotnie.

WNIOSEK

Może to sugerować, że w Polsce wzrasta liczba osób zarażonych *Blastocystis* i wskazane byłoby poszukiwanie przyczyn tego zjawiska (np. związku z podróżowaniem czy identyfikacja ewentualnych rezerwuarów zwierzęcych zarażenia *Blastocystis* u ludzi).

PRACA "BLASTOCYSTIS SUBTYPES ISOLATED FROM TRAVELERS AND NON-TRAVELERS FROM THE NORTH OF POLAND – A SINGLE CENTER STUDY"

Na podstawie wyników badań osób wyjeżdżających i nigdy nieopuszczających Polski stwierdzono, że niektóre podtypy *Blastocystis* (tu: ST2, a zwłaszcza ST1) mogą być nabywane przez ludzi podczas pobytów w krajach strefy klimatu gorącego.

Nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem poszczególnych podtypów *Blastocystis* a wiekiem, płcią, długością pobytu w strefie klimatu gorącego ani obecnością lub brakiem dolegliwości.

Nie stwierdzono związku pomiędzy zasiedleniem przez poszczególne podtypy *Blastocystis* a nasileniem inwazji.

Nie stwierdzono związku pomiędzy nasileniem inwazji *Blastocystis* a podróżowaniem do strefy klimatu gorącego, długością takich pobytów, wiekiem ani występowaniem dolegliwości u badanych osób.

WNIOSEK

W obliczu rosnącej liczby osób podróżujących do różnych stref klimatycznych świata, jak i migrujących do lub przez Polskę, możliwość przywlekania *Blastocystis* z podróży wymaga dalszych badań, do których niezbędne są precyzyjne dane dotyczące historii podróży z uwzględnieniem obecności i określeniem podtypu *Blastocystis* u osób podróżujących zarówno po, jak i przed rozpoczęciem podróży.

Nadal nierozpoznany pozostaje związek pomiędzy zasiedleniem przewodu pokarmowego przez *Blastocystis* a rozwojem objawów chorobowych. Kwestia ta wymaga dalszych pogłębionych badań.

**PRACA "FIRST REPORT ON THE OCCURRENCE AND SUBTYPES OF
BLASTOCYSTIS IN PIGS IN POLAND USING SEQUENCE-TAGGED-SITE PCR
AND BARCODE REGION SEQUENCING"**

W badanej grupie trzody chlewnej *Blastocystis* występował u prawie połowy zwierząt z wyraźną dominacją ST5 we wszystkich grupach wiekowych. ST3 i ST1 obecne były tylko u pojedynczych zwierząt i tylko w starszych grupach wiekowych.

Metody STS-PCR i barcodingu stosowane osobno nie pozwoliły na wykrycie wszystkich przypadków zarażeń *Blastocystis*.

WNIOSEK

Trzoda chlewna jest prawdopodobnie naturalnym żywicielem ST5, a ST1 i ST3 mogły zostać nabyte przez świnie podczas kontaktu z ludźmi. W celu wyjaśnienia czy świnie mogą być rezerwuarem zarażenia *Blastocystis* dla ludzi, czy transmisja zachodzi w odwrotnym kierunku należy kontynuować badania tych zwierząt i ich opiekunów.

Należy poszukiwać takich metod wykrywania i identyfikacji *Blastocystis*, które połączą zalety metody STS-PCR oraz metody barcodingu tzn. umożliwią wykrywanie wszystkich przypadków zarażeń *Blastocystis*, także w infekcjach mieszanych.

PRACA “MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *BLASTOCYSTIS* FROM ANIMALS AND THEIR CAREGIVERS AT THE GDAŃSK ZOO (POLAND) AND THE ASSESSMENT OF ZONOTIC TRANSMISSION”

W badanej grupie ssaków wykryto osiem podtypów *Blastocystis*: ST1, ST2, ST3 i ST13 tylko u małp, ST5 tylko u dzików i pekari, ST8 tylko u kangura, a ST10 i ST14 tylko u owiec i kóz podczas gdy u osób opiekujących się zwierzętami dwa tj. ST1 i ST3.

Dwie sekwencje ST1 pochodzące od mandryli i jedna od patasa były identyczne z sekwencją ST1 izolowanego od osoby, która sprawowała opiekę nad tymi małpami.

WNIOSEK

ST1 i ST3 wykazują niską swoistość żywicielską. Na zarażenie nimi podatni są zarówno ludzie, jak i zwierzęta naczelne, a w sprzyjających warunkach może dochodzić do transmisji *Blastocystis* ST1 pomiędzy małpami i ludźmi, jednak trudno jest ustalić z pewnością rzeczywisty kierunek transmisji.

ST5, ST8, ST10 i ST14 wykazują wyższą swoistość żywicielską. Uzyskane wyniki wraz z danymi literaturowymi wskazują, że ryzyko przeniesienia tych podtypów ze zwierząt na ludzi jest mniejsze.

7. ZAŁĄCZNIK – „WYSTĘPOWANIE *BLASTOCYSTIS* U ZWIERZĄT TOWARZYSZĄCYCH I ICH WŁAŚCICIELI” (manuskrypt w przygotowaniu)

7.1 WPROWADZENIE

Zwierzęta towarzyszące człowiekowi, takie jak psy i koty mogą być źródłem wielu infekcji pasożytniczych dla ludzi (np. *Toxocara canis/catti*, *Diphylidium caninum*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp, *Sarcocystis* spp, *Toxoplasma gondii*). Ludzie ulegają zarażeniu *per os* przez bezpośredni kontakt ze zwierzętami lub poprzez wodę, żywność czy środowisko zanieczyszczone odchodami zwierząt zawierającymi formy rozwojowe pasożytów (Bajer i in., 2011; Esch i Petersen, 2013; W. Li i in., 2019; López D i in., 2006; Riggio i in., 2013). Według aktualnej wiedzy do transmisji *Blastocystis* dochodzi w ten sam sposób (Angelici i in., 2018; Koloren i in., 2018; Lee i in., 2012; Noradilah i in., 2016). Dlatego warto zwrócić uwagę na potencjał zoonotyczny tzw. pet animals jako rezerwuaru zarażenia *Blastocystis* dla ludzi. Celem tego badania pilotażowego było zbadanie występowania i (w przypadku stwierdzenia obecności) porównanie genotypów *Blastocystis* izolowanych od zwierząt towarzyszących i ich opiekunów w celu rozpoznania czy dochodzi do odzwierzęcej transmisji drobnoustroju.

7.2 MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem analizy było 145 próbek kału pobranych od różnych zwierząt towarzyszących oraz 67 od ich właścicieli. Próbkę pobierano od maja 2018 do maja 2020 w aglomeracji trójmiejskiej (woj. pomorskie, Polska) liczącej około 800.000 mieszkańców (file:/// C:/Users/brodw/Downloads/Pomorskie%20w%20liczbach.pdf) [dostęp 27.09.2021]. Właściciele zwierząt wypełniali ankietę zawierającą dane o rasie, wieku i warunkach bytowych zwierząt. Grupa zwierząt obejmowała głównie psy i koty (odpowiednio n = 64 i n = 54) oraz niewielką liczbę innych zwierząt, takich jak agamy brodate (n=6), króliki (n=4), świnki morskie (n=4), gekony lamparcie (n=3), szczury

(n=3), mały o nieustalonej rasie (n=2), szynszyle (n=2), koszatniczka (n=1), chomik syryjski (n=1) i żółw grecki (n=1).

Ze względu na ograniczenia finansowe, w przypadku zwierząt, którymi opiekowało się kilku członków rodziny, próbkę kału pobierano od tej osoby, która miała największy kontakt ze zwierzęciem. Nie wszyscy właściciele zwierząt dostarczyli własne próbki kału do badań, stąd duża różnica między liczebnością grupy zwierząt i właścicieli. W kilku przypadkach ten sam właściciel posiadał kilka zwierząt np. (sześć psów, dwa psy, dwa koty, pies i kot, trzy gekony). Tylko osiem psów mieszkało na podwórku, a pozostałych 56 przebywało z właścicielami w warunkach domowych. 34 koty były trzymane wyłącznie w warunkach domowych, a 20 było wypuszczanych na zewnątrz. Według ankietowanych wszystkie zwierzęta były zadbane, właściwie żywione, a w razie problemów zdrowotnych otoczone opieką weterynaryjną. Wszystkie psy i koty były regularnie odrobaczane.

Właściciele zwierząt otrzymali krótką instrukcję poboru materiału (próbki kału). Próbki pobierane były zaraz po wypróżnieniu do plastikowych, jednorazowych pojemników zawierających 70% etanol, a następnie przechowywane w temp. 4-5°C do czasu izolacji DNA.

Do izolacji materiału genetycznego z pozyskanych próbek kału wykorzystano komercyjny zestaw Genomic Mini AX Stool Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Procedurę izolacji przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Uzyskany materiał genetyczny zabezpieczono w -20°C, a następnie przeprowadzono PCR ze starterami pan-*Blastocystis*: RD5 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') i BhrDr (5'-GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3') – umożliwiającymi wykrycie wszystkich zidentyfikowanych, a także nowych podtypów *Blastocystis* (Scicluna i in., 2006). Reakcje zostały przeprowadzane zgodnie z opisem zamieszczonym w publikacji (Rudzińska i in., 2020).

Produkty PCR poddano sekwencjonowaniu w obu kierunkach w Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu stosując standardową procedurę ze starterami użytymi do amplifikacji. Uzyskane sekwencje SSU-rRNA zostały porównane z 55 sekwencjami referencyjnymi reprezentującymi najpopularniejsze podtypy *Blastocystis*, tj. ST1, ST2, ST3, ST4, ST4a, ST5, ST6, ST6a, ST7, ST8, ST9, ST10, ST12,

ST13, ST14, ST15, ST16, ST17 pobranymi z bazy danych GenBank. Sekwencje przycięto i złożono przy użyciu oprogramowania MEGA X. Analizę populacyjną przeprowadzono w programie MEGA X przy wykorzystaniu metody największej wiarygodności z użyciem 1000 powtórzeń bootstrap w celu określenia dokładnej pozycji i tożsamości izolatów *Blastocystis* (Kumar i in., 2016). Przynależność *Blastocystis* do podtypów została dodatkowo zweryfikowana za pomocą otwartej bazy danych typowania sekwencji PubMLST dostępnej na stronie internetowej (www.pubmlst.org/Blastocystis), [dostęp 25 sierpnia 2021], (Jolley i in., 2018; Stensvold i in., 2012).

W pracy dodatkowo przeanalizowano dane z literatury dotyczące występowania *Blastocystis* u psów bytujących w różnych warunkach (psy domowe, z terenów wiejskich, przebywające w schroniskach i bezpańskie) (tab. 3). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą ilorazu szans. Ponadto dokonano porównania występowania *Blastocystis* u psów z różnych środowisk za pomocą analizy Chi-square (Chi Square Calculator - socscistatistics.com).

Tabela 3 Częstość zarażenia i podtypy *Blastocystis* identyfikowane u psów z różnych krajów (w porządku alfabetycznym), pogrupowane według warunków życia zwierząt (w tabeli nie uwzględniono danych pochodzących z badań grup zwierząt liczących <5 osobników).

Kraj	Liczba zwierząt zbadanych	Liczba zwierząt zarażonych	(%)	Zidentyfikowane podtypy (n)	Piśmiennictwo
Psy domowe					
Australia	11	0	-	-	(Roberts i in., 2013)
Australia	80	2	2,5	ST1(2)	(Wang i in., 2013)
Brazylia	20	0	-	-	(Oliveira-Arbex i in., 2018a)
Brazylia	78	2	2,6	n.d.	(Moura i in., 2018)
Chiny	199	0	-	-	(Liao i in., 2020)
Chiny	315	6	1,9	ST1, ST2 (liczby nie podano)	(Li WC, Wang K, Qin M, Liu ZH, Yuan G, Liu DY, 2016)
Filipiny	145	20	13,8	ST2(1), ST3(2) ST4(2), ST5(2) ST1/3(1), ST2/3(1) ST4/5(1), STnz(10)	(Belleza i in., 2016)
Francja	116	4	3,4	ST2(2), ST10(2)	(Osman i in., 2015)
Grecja	30	0	-	-	(Spanakos i in., 2011)
Hiszpania	55	0	-	-	(Paulos i in., 2018)

Iran	120	22	18,3	n.d.	(Mohaghegh i in., 2018)
Iran	154	29	18,8	ST2(8), ST3(11), ST4(3), ST7(3), ST8(2), ST10(2)	(Mohammadpour i in., 2020)
Japonia	27	0	-	-	(Abe i in., 2002)
Kolumbia	175	32	18,3	n.d.	(González i Giraldo, 2015)
Kolumbia	8	1	12,5	ST1(1)	(Villamizar i in., 2019)
Polska	31	1	3,2	ST7	(Kaczmarek i in., 2020)
Tajlandia	13	1	7,7	ST3	(Udonsom i in., 2018)
USA	51	0	-	-	(Ruaux i Stang, 2014)
Psy z terenów wiejskich*					
Australia	5	0	-	-	(Parkar i in., 2007)
Australia	45	0	-	-	(Roberts i in., 2013)
Brazylia	11	0	-	-	(David i in., 2015)
Brazylia	38	0	-	-	j.w.
Chile	30	1	3	n.d.	(Opazo i in., 2019)
Kambodża	80	1	1,3	ST2	(Wang i in., 2013)
Psy ze schronisk					
Australia	72	51	70,8	n.d.	(Duda i in., 1998)
Australia	5	0	-	-	(Parkar i in., 2007)
Chiny	149	35	5,4	ST1(6), ST3(28) ST10(1)	(Liao i in., 2020)
USA	103	10	9,7	ST1, ST10	(Ruaux i Stang, 2014)
Włochy	99	21	21,2	ST3	(Gazzonis i in., 2019)
Psy bezpieczne					
Grecja	42	0	-	-	(Spanakos i in., 2011)
Indie	80	19	23,8	ST1(9), ST4(2) ST5(1), ST6(7)	(Wang i in., 2013)
Iran	181	37	20,4	n.d.	(Mohaghegh i in., 2018)
Japonia	27	0	-	n.d.	(Abe i in., 2002)
Inne psy**					
Australia (różne psy)	300	10	3	n.d.	(Gillespie i Bradbury, 2017)
Australia (różne psy)	10	2	20	ST1(1), STnz(1)	(Parkar i in., 2007)
Argentyna (brak danych)	139	4	2,9	n.d.	(La Sala i in., 2015)
Chiny (różne psy)	136	4	2,9	ST1(3), ST4(1)	(Wang i in., 2018)
Turcja (domowe i wiejskie)	200	0	-	-	(Onder i in., 2021)
Chiny (z hodowli)	237	0	-	-	(Liao i in., 2020)

Chiny (z targu)	60	0	-	-	j.w.
Chile (z biegunką)	972	351	36,1	n.d.	(López D i in., 2006)
Kolumbia (brak danych)	40	15	37,5	ST2	(Ramírez i in., 2014)

* w doniesieniach nie sprecyzowano czy były to psy tzw. podwórkowe czy mieszkające z właścicielami w warunkach domowych

** psy niekwalifikujące się do żadnej z powyższych grup ze względu na brak lub niepełne dane dotyczące warunków bytowych i liczby zwierząt

n.d. – nie dotyczy; badanie wykonano przy użyciu mikroskopu lub mikroskopu i hodowli *in vitro*

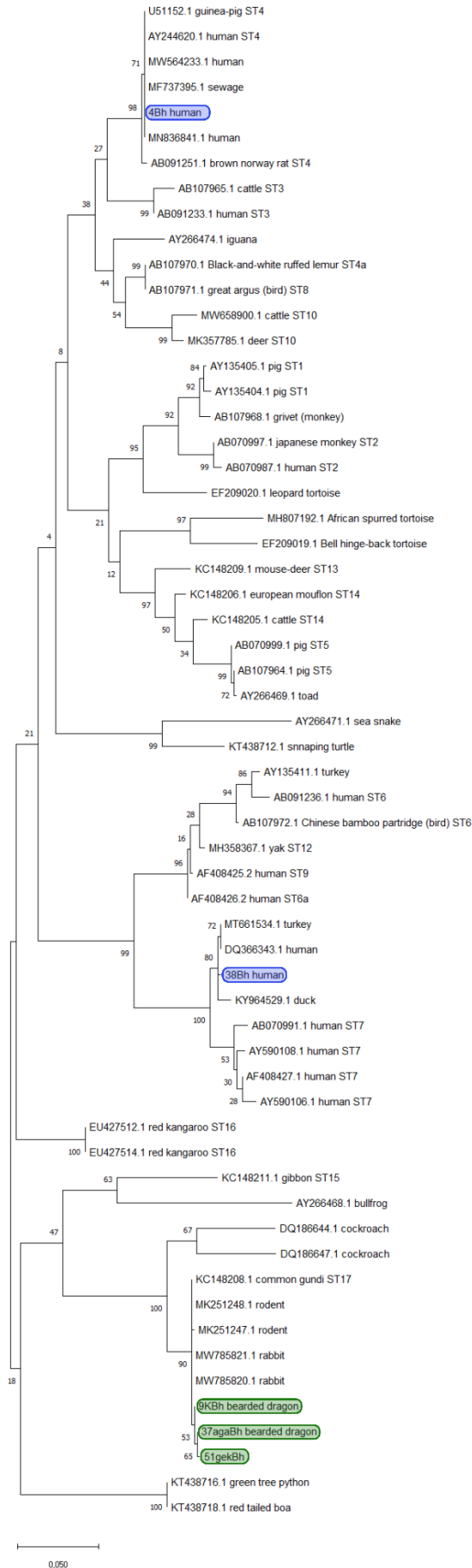
STnz – podtypu nie oznaczono

7.3 WYNIKI I DYKUSJA

łącznie w kierunku wykrycia *Blastocystis* przebadano próbki kału 145 zwierząt i 67 ich właścicieli. Tylko w 3 ze 145 (2,1%) próbek od zwierząt uzyskano produkty PCR wielkością odpowiadające *Blastocystis*, co potwierdziło sekwencjonowanie. Pozytywne próbki pochodziły od dwu agam brodatych i jednego gekona lamparciego, podczas gdy nie wykryto *Blastocystis* w żadnej z próbek kału psów, kotów ani pozostałych małych ssaków i żółwia.

Podobnie w przypadku właścicieli zwierząt, tylko w trzech z 67 (4,5%) próbek stwierdzono obecność *Blastocystis*. Sekwencjonowanie ujawniło, że były to ST4 i ST7, a podtypu *Blastocystis* z trzeciej próbki nie określono z powodu zbyt krótkiej sekwencji (z tego powodu nie została ona również wykorzystana w analizie populacyjnej).

Sekwencje *Blastocystis* uzyskane od gadów w tym badaniu różniły się znacznie od sekwencji referencyjnych *Blastocystis* z GenBank pochodzących od ludzi i ptaków (ryc. 10). Podobny układ obserwowano w innych badaniach z udziałem gadów ([AbuOdeh i in., 2019](#); [Rudzińska i in., 2021](#); [Yoshikawa i in., 2016](#)).



Rycina 10 Analiza populacyjna izolatów *Blastocystis* wykonana z wykorzystaniem metody największej wiarygodności (ang. *maximum likelihood method*) z 1000 powtórzeń; Kolor zielony – izolaty pochodzące od gadów. Kolor niebieski – izolaty pochodzące od ludzi.

Dotychczas spośród gadów najczęściej badane były żółwie i węże, i to wśród tych zwierząt uzyskano najwięcej wyników pozytywnych (Cian i in., 2017; Noël i in., 2005; Teow i in., 1992, 1991; Yoshikawa i in., 2016). Tylko jedno doniesienie wspomina o dwu badanych gekonach i jednej agamie brodanej, u których *Blastocystis* nie wykryto (AbuOdeh i in., 2019). Sekwencje *Blastocystis* izolowanych od gadów w obecnym badaniu umiejscowiły się na tej samej gałęzi, co sekwencje *Blastocystis* z GenBank pochodzące od królików, gundii pospolitych i gryzoni. Ich porównanie z sekwencjami referencyjnymi wykazało 99% podobieństwo do sekwencji ST17 (KC148208.1). ST17 jest drugim najczęściej identyfikowanym podtypem u gryzoni (m.in. w Meksyku (Martínez-Barbabosa i in., 2018), Libii (Alfellani i in., 2013b), Zjednoczonych Emiratach Arabskich (AbuOdeh i in., 2019), Chinach (Chai i in., 2020; Deng i in., 2021b)). Chociaż gady coraz chętniej i częściej trzymane są w domach jako tzw. pet animals to fakt, że są one nosicielami zupełnie innych *Blastocystis* niż te, które identyfikowane są u ludzi, pozwala sądzić, że ryzyko transmisji drobnoustroju pomiędzy nimi i ich opiekunami jest niewielkie. Jednak, aby potwierdzić to przypuszczenie, potrzebne są dalsze badania. Sekwencje *Blastocystis* uzyskane od gadów w obecnym badaniu były również w znacznym stopniu (odpowiednio 91% i 89%) zgodne z sekwencjami DQ1866441 oraz DQ186647.1 *Blastocystis* z GenBank pochodzącymi od owadów (karaluchów) (Yoshikawa i in., 2007). Być może wyjaśnieniem podobieństwa *Blastocystis* izolowanych od gadów i karaluchów jest fakt, że owady te – które z dużym prawdopodobieństwem mogą przyczyniać się do przenoszenia *Blastocystis* (Ma i in., 2020) – często są pokarmem gadów. Jednak, aby potwierdzić tę tezę konieczne są dalsze badania *Blastocystis* pochodzących od obu tych grup żywicieli.

Większość danych literaturowych na temat *Blastocystis* u zwierząt towarzyszących dotyczy psów i w znacznie mniejszym stopniu kotów. W tabeli 3. zebrano dane nt. częstości występowania *Blastocystis* u psów, zgłaszane przez autorów z różnych krajów, pogrupowane według warunków życia zwierząt (psy domowe, wiejskie, ze schronisk i bezpańskie). Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu nieparametrycznego Chi-kwadrat pozwoliła na porównanie występowania *Blastocystis* w ww. grupach psów. Porównanie tych grup wykazało różnice statystycznie istotne (tab.4).

Tabela 4 Wartości p-value dla analizy chi-kwadrat porównującej występowanie *Blastocystis* u psów bytujących w różnych warunkach obliczone na podstawie danych z tabeli 3.

psy	domowe	wiejskie	ze schronisk	bezzańskie
domowe	1	0,000455	<0,00001	<0,00001
wiejskie*	0,000455	1	<0,00001	<0,00001
ze schronisk	<0,00001	<0,00001	1	0,00054
bezzańskie	<0,00001	<0,00001	0,00054	1

Analiza wykazała, że u psów ze schronisk *Blastocystis* wykrywa się istotnie statystycznie częściej niż u psów domowych, wiejskich i bezzańskich. U psów bezzańskich istotnie częściej niż u psów domowych i wiejskich. Analiza wykazała również, że u psów pochodzących z terenów wiejskich *Blastocystis* występuje istotnie statystycznie rzadziej niż w przypadku pozostałych trzech grup. Na tej podstawie można wnioskować, że najczęściej zarażone są psy przebywające w schroniskach, a w następnej kolejności psy bezzańskie. Iloraz szans pokazał, że szansa wykrycia obecności *Blastocystis* u psów trzymanyh w schronisku jest odpowiednio 28,81; 3,75 i 1,35 razy większa niż u psów pochodzących z terenów wiejskich, psów domowych i psów bezzańskich. Szansa wykrycia obecności *Blastocystis* u bezzańskich psów jest odpowiednio 21,29 i 2,77 razy większa niż u psów z terenów wiejskich i psów domowych.

W obecnym badaniu *Blastocystis* nie został wykryty w żadnej próbce kału pochodzącej od psów i kotów. Podobnie zarażenia *Blastocystis* nie stwierdzono u psów w Hiszpanii (Paulos i in., 2018), Grecji (Spanakos i in., 2011), Japonii (Abe i in., 2002), Chinach (Liao i in., 2020), Australii (Parker i in., 2010; Roberts i in., 2013), USA (Ruaux i Stang, 2014) i Brazylii (David i in., 2015; Oliveira-Arbex i in., 2018b). W kilkunastu innych badaniach *Blastocystis* u psów wykryto w szerokim zakresie częstości od 1,9% do 70,8% (tab. 3), a niekiedy nawet 100% psów było zarażonych, jednak w tych przypadkach były to małe grupy liczące od 3 do 5 zwierząt (Eroglu i Koltas, 2010; Nagel i in., 2012; Parker i in., 2007). Analiza wyników tych badań pochodzących z wielu krajów pokazuje, że częstość infekcji może mieć związek z warunkami żywymi

zwierząt. Choć w każdej grupie obserwowano psy zarażone i niezarażone, to najczęściej zarażone były psy ze schronisk, a następnie psy bezpańskie, domowe i wiejskie. Do transmisji *Blastocystis* dochodzi przez wodę, żywność lub środowisko zanieczyszczone cystami, ponadto psy wykazują zachowanie koprofagiczne. Oznacza to, że psy znajdujące się w schroniskach na ograniczonym obszarze wybiegów, które często zamieszkiwane są przez kilka a nawet kilkanaście osobników częściej mają kontakt z kałem i powierzchniami zanieczyszczonymi cystami niż psy z innych grup. To prawdopodobnie wyjaśnia wysoką częstość zarażenia u psów ze schronisk. Wszystkie psy z obecnego badania były zadbane, dobrze odżywione, wyprowadzane na spacer wyłącznie pod opieką właścicieli, regularnie odrobaczane oraz otrzymywały opiekę weterynaryjną w razie problemów zdrowotnych. To może wyjaśniać, dlaczego nie były zarażone.

Literatura przedmiotu pokazuje, że wśród kotów, podobnie jak wśród psów, odsetek zarażonych zwierząt waha się znacznie tj. od 0 do 67,3%, a w małych grupach (liczących 3 osobniki) sięgał 100%. ([Badparva i Kheirandish, 2020](#); [Belleza i in., 2016](#); [Duda i in., 1998](#); [Khademvatan i in., 2014](#); [Kwak D, 2020](#); [W. Li i in., 2019](#); [López D i in., 2006](#); [Mohammadpour i in., 2020](#); [Moura i in., 2018](#); [Paulos i in., 2018](#); [Roberts i in., 2013](#)). Na podstawie dostępnych danych wydaje się, że w przypadku kotów – podobnie jak u psów – zarażeniu sprzyja pobyt w schronisku, jednak dostępne dane są zbyt skąpe, aby można je było ocenić statystycznie. Mogłoby się również wydawać, że koty wychodzące na zewnątrz są bardziej narażone na zarażenie, jednak w obecnym badaniu ani koty które nie wychodziły z domu, ani te którym pozwolono wychodzić na zewnątrz nie były zarażone.

W dotychczasowych badaniach u psów ujawniono dziewięć podtypów *Blastocystis*, mianowicie ST1-ST8 i ST10 (Tab.3), natomiast u kotów sześć, tj. ST1-ST4, ST10 i ST14 ([Kwak D, 2020](#); [Mohammadpour i in., 2020](#); [Riaux i Stang, 2014](#)). Te same podtypy, z wyjątkiem ST14, występują u ludzi. Co więcej, u psów, podobnie jak u ludzi, ST1-ST4 notowane są częściej niż pozostałe podtypy, a w przypadku kotów nieznacznie częściej obserwowano ST1 i ST3. Może to sugerować, że psy i koty mogą służyć jako rezerwuary zarażenia *Blastocystis* dla ludzi, jednak równie prawdopodobny jest odwrotny kierunek transmisji. Warto zauważyć, że właściciele psów z naszego badania,

tak jak ich psy, nie byli zarażeni *Blastocystis*, natomiast wśród właścicieli kotów trzech było zarażonych (każdy innym podtypem: ST4, ST7 i jeden niemożliwy do określenia), jednak nie mogli oni zarazić się od swoich kotów, ponieważ wszystkie koty były ujemne pod względem *Blastocystis*.

Wśród badań nad występowaniem *Blastocystis* u psów i kotów tylko nieliczne obejmowały zarówno te zwierzęta, jak i związanych z nimi ludzi. W niewielkiej społeczności miejskiej Filipin te same podtypy ST1-ST5 odnotowano u psów i ludzi (część z nich była właścicielami psów), jednak udział poszczególnych podtypów u ludzi i psów był inny. ST3 był najbardziej rozpowszechniony zarówno u ludzi, jak i u psów, jednak u ludzi występował ponad dwukrotnie częściej niż u psów (41,4% vs 17,4%). ST1 był drugim pod względem częstości występowania u ludzi, a u psów występował najrzadziej (22,6% vs 4,3%). Odwrotnie ST5 i ST1, które u psów występowały około trzy razy częściej niż u ludzi (odpowiednio 13% vs 4,1% i 8,7% vs 3,1%). Najbardziej zbliżone wartości w obu grupach żywicieli reprezentował ST4 (14,8% - ludzie i 13% - psy) (Belleza i in., 2016). Zastanawiające jest, że podtypy ST1, ST2, ST3, ST4 i ST7 wykryte u osób z dolegliwościami jelitowymi występowały również u ich psów i kotów (Eroglu i Koltas, 2010; Kaczmarek i in., 2020; Nagel i in., 2012), a sekwencja *Blastocystis* wyizolowanego od człowieka z Tajlandii była w 100% zgodna z sekwencją izolatu pochodzącego od psa z tej samej społeczności (Parker i in., 2007). Powyższe dane, choć cenne, to nie upoważniają do wnioskowania jaki był kierunek transmisji drobnoustroju.

W obecnym badaniu *Blastocystis* nie został wykryty w żadnej próbce pochodzącej od królików i gryzoni. W przypadku królików nieliczni autorzy obserwowali niski odsetek zarażonych zwierząt (1% i 3%), u których stwierdzono ST4, a w pojedynczym przypadku ST14 (AbuOdeh i in., 2019; T. Li i in., 2020; Wang i in., 2018). W przypadku gryzoni odnotowano dziesięć podtypów *Blastocystis* (ST1-ST5, ST7, ST8, ST10, ST13, ST17) z wyraźną przewagą ST4, zwłaszcza u szczurów, a odsetek zarażeń przyjmuje szeroki zakres od 0% do 100% (Betts i in., 2017; Chai i in., 2020; Katsumata i in., 2018; J. Li i in., 2020; Mohammadpour i in., 2020; Noël i in., 2003; Premaalatha i in., 2017; Wang i in., 2018; Yoshikawa i Iwamasa, 2016). W obecnym badaniu było tylko 11 gryzoni, i właśnie ta niewielka liczba zbadanych zwierząt mogła być przyczyną niewykrycia *Blastocystis*. Ponieważ gryzonie są dość popularnymi

zwierzętami towarzyszącymi i – jak wynika z literatury – wydają się stanowić główny rezerwuwar zwierzęcy ST4 (Chai i in., 2020), podtypu, który był zgłaszany jako prawdopodobna przyczyna uciążliwej biegunki u ludzi (Domínguez-Márquez i in., 2009; Stensvold i in., 2011), pożądane jest kontynuowanie badań *Blastocystis* w tej grupie zwierząt.

7.4 PODSUMOWANIE I WSTĘPNE WNIOSKI

Podsumowując, badanie to jest najprawdopodobniej pierwszym, w którym *Blastocystis* wykryto u agam brodatych i gekona lamparciego. Zidentyfikowane u tych zwierząt genotypy *Blastocystis* są odmienne od stwierdzanych u ludzi, dlatego wydaje się, że nie powinno dochodzić do zarażenia nimi ludzi. Zważywszy jednak, że zarażone gady stanowiły 30% niewielkiej liczby gadów objętych badaniem oraz, że zwierzęta te coraz częściej hodowane są jako tzw. pet animals, a także ze względu na znikomą wiedzę na temat „gadzych” *Blastocystis*, badania drobnoustroju w tej grupie zwierząt powinny być kontynuowane.

Niewykrycie *Blastocystis* u żadnego z pozostałych zwierząt może wynikać z faktu, że wszystkie próbki pochodziły od zdrowych i zadbanych zwierząt. Ponadto, niewykrycie *Blastocystis* u żadnego z królików i gryzoni, mogło być spowodowane niewielką liczbą zwierząt, od których pobrano próbki.

Uzyskane wyniki wskazują, że dalsze badania *Blastocystis* izolowanych od zwierząt i ich opiekunów są niezbędne do pełnego poznania źródeł i kierunku transmisji drobnoustroju między zwierzętami i ludźmi.

8. STRESZCZENIE W J. POLSKIM

Blastocystis jest prawdopodobnie najbardziej rozpowszechnionym mikroeukariotycznym organizmem zasiedlającym jelito grube u wielu gatunków zwierząt i co najmniej miliarda ludzi świecie. Patogeniczność drobnoustroju jest dyskusyjna, wiele osób zarażonych nie ma żadnych objawów chorobowych, podczas gdy część skarży się na dolegliwości, głównie ze strony przewodu pokarmowego. *Blastocystis* izolowane od ludzi i zwierząt wykazują rozległą zmienność genetyczną – w oparciu o metody biologii molekularnej ustalono 25 podtypów drobnoustroju, z których dwanaście (ST1–ST10, ST12, ST14) jest wspólnych dla ludzi oraz innych ssaków i ptaków. To wskazuje na możliwość transmisji odzwierzęcej i/lub antroponotycznej, a podobieństwa między izolatami pochodzącymi od niektórych zwierząt i ludzi potęgują to przypuszczenie. Transmisja *Blastocystis* zachodzi najprawdopodobniej drogą fekalno-oralną przez kontakt z zarażonym lub wodą, żywnością czy przedmiotami zanieczyszczonymi kałem zawierającym cysty *Blastocystis*.

Niniejsza rozprawa miała na celu uzupełnienie wiedzy dotyczącej epidemiologii *Blastocystis* na podstawie badań ludzi i wybranych grup zwierząt z województwa pomorskiego.

Pierwszym etapem pracy było określenie częstości zarażeń *Blastocystis* wśród pacjentów PCHZTP IMMiT. Analiza wyników parazytologicznych badań koprologicznych 52818 pacjentów wykazała, że liczba osób zarażonych *Blastocystis* na przestrzeni 18 lat wzrosła 14-krotnie oraz że począwszy od roku 1995 *Blastocystis* był najczęściej wykrywanym organizmem spośród pierwotniaków i helmintów bytujących w przewodzie pokarmowym ludzi. To pokazało, że warto szukać źródeł zarażenia *Blastocystis* u ludzi.

W następnym etapie pracy badano wpływ podróży do strefy klimatu gorącego na zasiedlenie przewodu pokarmowego ludzi przez *Blastocystis*. Na podstawie badań molekularnych próbek kału osób podróżujących w celach zawodowych i turystycznych do krajów klimatu gorącego oraz osób nigdy nieopuszczających Polski stwierdzono, że ST2, a szczególnie ST1 mogły być nabywane podczas podróży. Jednak do pełnego wyjaśnienia możliwości przywlekania zarażeń

Blastocystis z podróży niezbędna jest kontynuacja badań z analizą danych dotyczących historii podróży z uwzględnieniem obecności i określeniem podtypu *Blastocystis* u osób podróżujących zarówno przed, jak i po zakończeniu podróży.

W kolejnych etapach pracy oceniano możliwość transmisji *Blastocystis* pomiędzy zwierzętami i ludźmi.

W badaniu trzody chlewnej częstość zarażenia *Blastocystis* kształtowała się na poziomie 44,4% - 50%, a podtypem dominującym w każdej grupie wiekowej zwierząt był ST5, co wraz z danymi literaturowymi wskazuje, że świnie są najprawdopodobniej naturalnym rezerwuarem ST5. Pozostałe dwa wykryte podtypy tj. ST3 i ST1 obecne były tylko u pojedynczych sztuk zwierząt, przeważnie w formie infekcji mieszanych z ST5, i tylko w starszych grupach wiekowych (tj. z wyjątkiem prosiąt), co budzi podejrzenie o możliwą antroponotyczną transmisję tych podtypów będącą efektem coraz dłuższego kontaktu świń z ludźmi. Kwestia ta wymaga dalszych badań próbek pochodzących zarówno od świń, jak i od osób sprawujących nad nimi opiekę.

W tej pracy dodatkowo porównano efektywność dwóch metod molekularnych najczęściej wykorzystywanych przez badaczy do wykrywania i identyfikacji podtypów *Blastocystis* w próbkach kału. Wyniki uzyskane każdą z metod różniły się i chociaż nie były to różnice statystycznie istotne, to badanie pokazało, że przy użyciu każdej z metod część zarażeń *Blastocystis* pozostaje niewykryta (STS-PCR – 9,39%, barcoding – 8,72%).

Kolejnym krokiem w poszukiwaniu możliwości transmisji *Blastocystis* pomiędzy zwierzętami i ludźmi było badanie zwierząt z Gdańskiego Ogrodu Zoologicznego i ich opiekunów. Obecność *Blastocystis* stwierdzono u 26,86% zwierząt i 17,14% ich opiekunów. Jedynie dwa podtypy tj. ST1 i ST3 obecne były i u zwierząt (małp), i u ludzi. Co więcej, dwie sekwencje ST1 pochodzące od mandryli i jedna od patasa były identyczne z sekwencją ST1 izolowanego od osoby sprawującej opiekę nad tymi małpami. To wskazuje na bardzo prawdopodobną transmisję ST1 pomiędzy małpami a ich opiekunem, chociaż ze 100% pewnością kierunku transmisji określić nie można. Fakt, że ST5 występował tylko u dzików i spokrewnionych z nimi pekari obrożnych, ST8 tylko u kangura rudego, a ST10 i ST14 tylko u kóz i owiec pokazuje, że te podtypy

Blastocystis charakteryzują się wyższą swoistością i prawdopodobieństwo przeniesienia ich ze zwierząt na ludzi jest znacznie mniejsze.

W załączniku do rozprawy przedstawiono wyniki pilotażowych badań dotyczących występowania *Blastocystis* u zwierząt towarzyszących oraz ich właścicieli. *Blastocystis* nie został wykryty u żadnego psa ani kota mimo tego, że próbek od tych zwierząt było najwięcej. *Blastocystis* nie został również wykryty u tzw. pet rodents, co może być skutkiem niewielkiej liczby zbadanych próbek. *Blastocystis* wykryto u jednej trzeciej zbadanych gadów (dwu agam brodatych i jednego gekona lamparciego), a sekwencje tych izolatów były odmienne od sekwencji referencyjnych z GenBank pochodzących od ludzi. *Blastocystis* obecny był także u trojga właścicieli zwierząt, jednak nie byli to właściciele gadów, lecz kotów, co oznacza, że te zwierzęta nie mogły być źródłem zarażenia *Blastocystis* dla swoich opiekunów. Mimo, że zarażenie ludzi przez *Blastocystis* bytujące u gadów wydaje się mało prawdopodobne, to ze względu na rosnącą popularność hodowli gadów oraz fakt, że gady pod kątem *Blastocystis* są bardzo słabo zbadane, badania drobnoustroju w tej grupie zwierząt powinny być kontynuowane.

Każdy z celów badawczych rozprawy poszerzył wiedzę na temat epidemiologii *Blastocystis*. Jest to największe molekularne badanie epidemiologiczne, przeprowadzone pod kątem *Blastocystis* u ludzi i zwierząt w Polsce.

W świetle uzyskanych wyników dalsze badania *Blastocystis* izolowanych od zwierząt i opiekujących się nimi osób są niezbędne do pełnego poznania źródeł i kierunku transmisji drobnoustroju pomiędzy zwierzętami i ludźmi.

9. STRESZCZENIE W J. ANGIELSKIM

Blastocystis is one of the most widespread microeukaryote in the intestines of numerous animal species and at least a billion people in the world. The pathogenicity of the microorganism is debatable since lots of infected people do not have any symptoms of the disease, while some complain about problems mainly from the gastrointestinal tract. *Blastocystis* isolated from humans and animals show extensive genetic variability. Based on molecular biology methods, 25 subtypes of *Blastocystis* have been established, twelve of which (ST1-ST10, ST12, ST14) are shared by humans and other mammals and birds. This indicates the possibility of zoonotic and/or anthroponotic transmission of *Blastocystis*, moreover, the high similarities between isolates from some animals and humans reinforce this assumption. Transmission of *Blastocystis* occurs via the fecal-oral route through contact with the infected individual or through water, food, or items contaminated with feces containing *Blastocystis* cysts.

The aim of this dissertation was to supplement the knowledge on the epidemiology of *Blastocystis* based on studies of humans and selected groups of animals from the Pomeranian Voivodeship in Poland.

The first stage of the work was to determine the frequency of *Blastocystis* infection among PCHZTP IMMiT patients. The analysis of the results of parasitological coprological examinations of 52,818 patients showed that the number of people infected with *Blastocystis* over 18 years (from 1992 to 2010) increased 14-fold, and that from 1995 *Blastocystis* was the most frequently detected microeukaryote among protozoa and helminths inhabiting the human gastrointestinal tract. This showed that it would be advisable to look for the causes of *Blastocystis* infection in humans.

In the next stage of the work, the influence of traveling to the hot climate zone on the colonization of the human gastrointestinal tract by *Blastocystis* was investigated. Based on molecular studies of stool samples of people traveling for business and tourist purposes to hot climate countries and people who have never left Poland, it was found that ST2, and especially ST1, could have been acquired during travels. However, to fully explain the possibility of importing *Blastocystis* infections from travel, it is necessary to continue research with an analysis of travel history data

including the presence and subtypes of *Blastocystis* in travelers both before and after the trip.

In the further stages of the work, the possibility of transmission of *Blastocystis* between animals and humans was assessed.

In the pig study, the prevalence of *Blastocystis* was 44.4% - 50%, and the dominant subtype in each age group of animals was ST5, which, together with literature data, indicates that pigs are most likely a natural reservoir of ST5. The other two detected subtypes, i.e., ST3 and ST1, were present only in individual animals, mostly in the form of mixed infections with ST5, and only in older age groups (i.e., except for piglets). This raises the suspicion of possible anthroponotic transmission of these subtypes because of the longer and longer contact between pigs and humans. This issue requires further testing of samples from both the pigs and their caregivers. This work additionally compared the effectiveness of two molecular methods most used by researchers to detect and identify *Blastocystis* subtypes in stool samples. The results obtained with each method differed, and although the difference was not statistically significant, the study showed that with each method, some of the *Blastocystis* infections remain undetected (STS-PCR - 9.39%, barcoding - 8.72%).

The next step in the search for the possibility of transmitting *Blastocystis* between animals and humans was the study of animals from the Gdańsk Zoo and their caregivers. The presence of *Blastocystis* was found in 26.86% of animals and 17.14% of their keepers. Only two subtypes, i.e., ST1 and ST3, were present in both animals (monkeys) and humans. Moreover, two ST1 sequences from the mandrills and one from the patas were identical to the ST1 sequence isolated from the caregiver of the monkeys. This indicates a highly likely transmission of ST1 between the monkeys and their caregiver, although the direction of transmission cannot be determined with 100% certainty. The fact that ST5 was found only in wild boar and related to them peccaries, ST8 in a red kangaroo only, and ST10 and ST14 only in goats and sheep shows that these subtypes of *Blastocystis* are more specific and that their transmission from animals to humans is much less likely.

The appendix to the dissertation presents the results of a pilot study on the occurrence of *Blastocystis* in companion animals and their keepers. *Blastocystis* has

not been detected in any dog or cat, despite the highest number of samples from these animals. *Blastocystis* also was not detected in pet rodents, which may be due to the small number of tested samples. Contrarily, *Blastocystis* was detected in one third of the reptiles tested (two bearded agamas and one leopard gecko) but the sequences of these isolates differed remarkably from the human reference sequences from GenBank. *Blastocystis* was also present in three animal owners, however, they were not reptile but cat owners, which means that cats from this study could not be the source of *Blastocystis* infection for their keepers. Infection of humans by reptile-derived *Blastocystis* seems unlikely, however, due to the growing popularity of reptile breeding and the fact that reptile-derived *Blastocystis* is very poorly studied, research on *Blastocystis* met in this group of animals should be continued.

Each of the research objectives of the presented dissertation broadened the knowledge about the epidemiology of *Blastocystis*. It is the largest molecular epidemiological study conducted on *Blastocystis* in humans and animals in Poland.

In the light of the results obtained, further studies of *Blastocystis* isolated from animals and their caregivers are needed to fully understand the sources and direction of the microbial transmission between animals and humans.

10. PIŚMIENICTWO

Abe, N., 2004. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Veterinary Parasitology* 120, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.003>

Abe, N., Nagoshi, M., Takami, K., Sawano, Y., Yoshikawa, H., 2002. a survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Veterinary Parasitology* 106, 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00050-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00050-X)

Abe, N., Wu, Z., Yoshikawa, H., 2003a. 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. *Parasitology Research* 90, 124–128. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0821-2>

Abe, N., Wu, Z., Yoshikawa, H., 2003b. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. *Veterinary Parasitology* 113, 321–325. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00081-5)

AbuOdeh, R., Ezzedine, S., Madkour, M., Stensvold, C.R., Samie, A., Nasrallah, G., AlAbsi, E., ElBakri, A., 2019. Molecular Subtyping of *Blastocystis* from Diverse Animals in the United Arab Emirates. *Protist* 170, 125679. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2019.125679>

Adam, R., 2021. *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 34, e0002419. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-19>

Adiyaman, K., Dogruman, A., Mumcuoglu, I., 2015. [Investigation of the presence of *Blastocystis* spp. in stool samples with microscopic, culture and molecular methods]. *Mikrobiyoloji bulteni* 49, 85–97.

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 Tropica* 126, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.011>

Alfellani, M.A., Taner-Mulla, D., Jacob, A.S., Imeede, C.A., Yoshikawa, H., Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2013b. Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. *Protist* 164, 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.003>

Alinaghizade, A., Mirjalali, H., Mohebal, M., Stensvold, C.R., Rezaeian, M., 2017. Inter- and intra-subtype variation of *Blastocystis* subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infection, Genetics and Evolution* 50, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.016>

Angelici, M.C., Nardis, C., Scarpelli, R., Ade, P., 2018. *Blastocystis* hominis transmission by non-potable water: a case report in Italy. *New Microbiologica* 41.

Arisue N, Hashimoto T, Y.H., 2003. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology* 126, 1–9. <https://doi.org/doi:10.1017/s0031182002002640>.

Asghari, A., Sadeghipour, Z., Hassanipour, S., Abbasali, Z., Ebrahimzadeh-Parikhani, H., Hashemzaei, M., Alimardani, V., Hatam, G., 2021a. Association between *Blastocystis* sp.

- infection and immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16187-1>
- Asghari, A., Sadraei, J., Pirestani, M., Mohammadpour, I., 2019. First molecular identification and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolated from hooded crows (*Corvus cornix*) and pigeons (*Columba livia*) in Tehran Province, Iran. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 62, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.013>. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30711042.
- Asghari, A., Sadrebazzaz, A., Shamsi, L., Shams, M., 2021b. Global prevalence, subtypes distribution, zoonotic potential, and associated risk factors of *Blastocystis* sp. in domestic pigs (*Sus domesticus*) and wild boars (*Sus scrofa*): a systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis* 160, 105183. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105183>
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., Loywick, A., Merlin, S., Viscogliosi, E., Chabe, M., 2016. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific reports* 6, 25255. <https://doi.org/10.1038/srep25255>
- Badparva, E., Kheirandish, F., 2020. Non-Infection to *Blastocystis* in Cats of Lorestan Province, Iran. *Entomol Appl Sci Lett* 7, 49–53.
- Bahrami, F., Babaei, E., Badirzadeh, A., Riabi, T.R., Abdoli, A., 2019. *Blastocystis*, urticaria, and skin disorders: review of the current evidences. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03793-8>
- Bajer, A., Bednarska, M., Rodo, A., 2011. Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. *Veterinary Parasitology* 175, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.029>
- Bálint, A., Dóczy, I., Bereczki, L., Gyulai, R., Szucs, 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. *Parasitology Research* 113, 1585–1590. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3805-0>
- Barbosa, C.V., Barreto, M.M., de Jesus Andrade, R., Sodr e, F., D’Avila-Levy, C.M., Peralta, J.M., Igreja, R.P., de Macedo, H.W., Santos, H.L.C., 2018. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. *PLoS ONE* 13, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193860>
- Barreto, M.M., Andrade, R.D.J., Avila-levy, C.M., Peralta, M., 2018. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes 3, 1–12.
- Beghini, F., Pasolli, E., Truong, T.D., Putignani, L., Cacci o, S.M., Segata, N., 2017. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *ISME Journal* 11, 2848–2863. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.139>
- Belleza, M.L.B., Reyes, J.C.B., 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. *Parasitology International* 65, 291–294. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.02.009>

- Betts, E.L., Gentekaki, E., Thomasz, A., Breakell, V., Carpenter, A.I., Tsaousis, A.D., 2017. Genetic diversity of *Blastocystis* in non-primate animals. *Parasitology* 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002347>
- Bogoch, I.I., Raso, G., N’Goran, E.K., Marti, H.P., Utzinger, J., 2006. Differences in microscopic diagnosis of helminths and intestinal protozoa among diagnostic centres. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*: official publication of the European Society of Clinical Microbiology 25, 344–347. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0135-x>
- 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. *Tropical Medicine and International Health* 2, 771–778. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1997.d01-383.x>
- Boorom, K.F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Li, L.H., Zhou, X.N., Ok, L.Z., Leelayoova, S., Jones, M.S., 2008. Oh my aching gut: Irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites and Vectors* 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-40>
- Burki, F., Roger, A.J., Brown, M.W., Simpson, A.G.B., 2020. The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* 35, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>
- Cavalier-Smith, T., 2004. Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271, 1251–1262. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2705>
- Cavalier-Smith, T., 1998. a revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73, 203–266. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1998.tb00030.x>
- Chai, Y., Deng, L., Liu, H., Yao, J., Zhong, Z., Fu, H., Shen, L., Zhou, Z., Deng, J., Hu, Y., Peng, G., 2020. First subtyping of *Blastocystis* sp. from pet rodents in southwestern China. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 11, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.01.012>
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delgado-Viscogliosi, P., Guyot, K., Li, L.L., Monchy, S., Noël, C., Poirier, P., Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Bosc, S., Chabé, M., Petit, T., Certad, G., Viscogliosi, E., 2017. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS ONE* 12, 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169659>
- Cinek, O., Polackova, K., Odeh, R., Alassaf, A., Kramná, L., Ibekwe, M.A.U., Majaliwa, E.S., Ahmadov, G., Elmahi, B.M.E., Mekki, H., Oikarinen, S., Lebl, J., Abdullah, M.A., 2021. *Blastocystis* in the faeces of children from six distant countries: prevalence, quantity, subtypes and the relation to the gut bacteriome. *Parasites and Vectors* 14, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04859-3>
- Clark, C.G., 1997. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 87, 79–83. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00046-7)
- Clark, C.G., van der Giezen, M., Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., 2013. Recent developments in *Blastocystis* research., *Advances in parasitology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00001-0>
- Coyle, C.M., Varughese, J., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., 2012. *Blastocystis*: To treat or not to treat.. *Clinical Infectious Diseases* 54, 105–110. <https://doi.org/10.1093/cid/cir810>

Dagci, H., Kurt, Ö., Demirel, M., Mandiracioglu, A., Aydemir, S., Saz, U., Bart, A., VAN Gool, T., 2014. Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. Iranian journal of parasitology 9, 519–51929.

Dagci, H., Ustun, S., Taner, M.S., Ersoz, G., Karacasu, F., Budak, S., 2002. Protozoon infections and intestinal permeability. Acta Tropica 81, 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00191-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00191-7)

David, É.B., Guimarães, S., De Oliveira, A.P., De Oliveira-Sequeira, T.C.G., Bittencourt, G.N., Nardi, A.R.M., Ribolla, P.E.M., Franco, R.M.B., Branco, N., Tosini, F., Bella, A., Pozio, E., Cacciò, S.M., 2015. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. Parasites and Vectors 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0714-8>

Deng, L., Wojciech, L., Gascoigne, N.R.J., Peng, G., Tan, K.S.W., 2021a. New insights into the interactions between *Blastocystis*, the gut microbiota, and host immunity. PLoS Pathogens 17, 1–15. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009253>

Deng, L., Yao, J., Chen, S., He, T., Chai, Y., Zhou, Z., Shi, X., Liu, H., Zhong, Z., Fu, H., Peng, G., 2021b. First identification and molecular subtyping of *Blastocystis* sp. in zoo animals in southwestern China. Parasites and Vectors 14, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04515-2>

Deng, L., Yao, J.X., Liu, H.F., Zhou, Z.Y., Chai, Y.J., Wang, W.Y., Zhong, Z.J., Deng, J.L., Ren, Z.H., Fu, H.L., Yan, X., Yue, C.J., Peng, G.N., 2019. First report of *Blastocystis* in giant pandas, red pandas, and various bird species in Sichuan province, southwestern China. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 9, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.06.007>

Diamond, L.S., Clark, C.G., 1993. a redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. The Journal of eukaryotic microbiology 40, 340–344.

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015484>

Domínguez-Márquez, M.V., Guna, R., Muñoz, C., Gómez-Muñoz, M.T., Borrás, R., 2009. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitology Research 105, 949–955. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1485-y>

Duda, A., Kosik-Bogacka, D., Lanocha-Arendarczyk, N., Kołodziejczyk, L., Lanocha, A., 2015. The prevalence of *Blastocystis hominis* and other protozoan parasites in soldiers returning from peacekeeping missions. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 92, 805–806. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0344>

Duda, A., Stenzel, D., Boreham, P.F., 1998. Detection of *Blastocystis* sp. in domestic dogs and cats. Veterinary Parasitology 76, 9–17. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00224-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00224-0).

Dunn, L.A., Boreham, P.F.L., Stenzel, D.J., 1989. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. International Journal for Parasitology 19, 43–56. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(89\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(89)90020-9)

- Eiset, A.H., Stensvold, C.R., Fursted, K., Nielsen, H.V., Wejse, C., 2020. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Giardia*, and *Blastocystis* in asymptomatic Syrian asylum seekers in Denmark during 2016 through 2018. *Journal of Migration and Health* 1–2, 100016. <https://doi.org/10.1016/j.jmh.2020.100016>
- 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 Pacific Journal of Tropical Disease* 5, 51–59. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60626-5](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60626-5)
- 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-164>
- Eroglu, F., Koltas, I.S., 2010. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitology Research* 107, 841–845. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1937-4>
- Esch, K.J., Petersen, C.A., 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 58–85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>
- Even, G., Lokmer, A., Rodrigues, J., Audebert, C., Viscogliosi, E., Ségurel, L., Chabé, M., 2021. Changes in the Human Gut Microbiota Associated With Colonization by *Blastocystis* sp. and *Entamoeba* spp. in Non-Industrialized Populations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.533528>
- Farah Haziqah, M.T., Nur Asyiqin, M.N., Mohd Khalid, M.K.N., Suresh, K., Rajamanikam, A., Chandrawathani, P., Mohd Zain, S.N., 2017. Current status of *Blastocystis* in cockroaches. *Tropical Biomedicine* 34, 741–745.
- Fayer, R., Elsasser, T., Gould, R., Solano, G., Urban, J., Santin, M., 2014. *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology Research* 113, 1465–1472. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3787-y>
- Fayer, R., Santin, M., MacArising, D., 2012. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitology Research* 111, 1349–1355. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2971-1>
- France, N., Monchy, S., Benamrouz-vanneste, S., Karpouzopoulos, J., Bourgain, J., Rault, C., Demaret, F., Baydoun, M., Chab, M., Fr, E., Aliouat-denis, C., Gay, M., Certad, G., Viscogliosi, E., 2020. First Report on the Prevalence and Subtype Distribution of *Blastocystis* sp. in Edible Marine Fish and Marine Mammals : a Large Scale-Study Conducted in Atlantic Northeast and on the Coasts of.
- Gazzonis, A.L., Marangi, M., Zanzani, S.A., Villa, L., Giangaspero, A., Manfredi, M.T., 2019. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in dogs housed in Italian rescue shelters. *Parasitology Research* 118, 3011–3017. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06424-5>
- Gentekaki, E., Curtis, B.A., Stairs, C.W., Klimeš, V., Eliáš, M., Salas-Leiva, D.E., Herman, E.K., Eme, L., Arias, M.C., Henrissat, B., Hilliou, F., Klute, M.J., Suga, H., Malik, S.-B., Pightling, A.W., Kolisko, M., Rachubinski, R.A., Schlacht, A., Soanes, D.M., Tsaousis, A.D., Archibald, J.M., Ball, S.G., Dacks, J.B., Clark, C.G., van der Giezen, M., Roger, A.J., 2017. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*, *PLOS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003769>

- Gillespie, S., Bradbury, R.S., 2017. a survey of intestinal parasites of domestic dogs in central Queensland. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 2. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed2040060>
- González, A.C., Giraldo, J.C., 2015. Prevalencia de Parásitos Intestinales Zoonóticos En Caninos (*Canis Lupus Familiaris*) del área urbana del municipio de Coyaima (Tolima). *Revista Med* 23, 24. <https://doi.org/10.18359/rmed.1743>
- Greige, S., El Safadi, D., Bécu, N., Gantois, N., Pereira, B., Chabé, M., Benamrouz-Vanneste, S., Certad, G., El Hage, R., Chemaly, M., Hamze, M., Viscogliosi, E., 2018. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasites and Vectors* 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2975-5>
- Greigert, V., Abou-Bacar, A., Brunet, J., Nourrisson, C., Pfaff, A.W., Benarbia, L., Pereira, B., Randrianarivelojosia, M., Razafindrakoto, J.L., Rakotomalala, R.S., Morel, E., Candolfi, E., Poirier, P., 2018. Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa. *PLoS ONE* 13, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204576>
- Gupta, R., Parsi, K., 2006. Chronic urticaria due to *Blastocystis* hominis. *Australasian Journal of Dermatology* 47, 117–119. <https://doi.org/10.1111/J.1440-0960.2006.00244.X>
- Hameed, D.M.A., Hassanin, O.M., Zuel-Fakkar, N.M., 2011. Association of *Blastocystis* hominis genetic subtypes with urticaria. *Parasitology research* 108, 553–560. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2097-2>
- Horiki, N., Maruyama, M., Fujita, Y., Yonekura, T., Minato, S., Kaneda, Y., 1997. Epidemiologic Survey of *Blastocystis* hominis Infection in Japan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56, 370–374.
- Hublin, J.S.Y., Maloney, J.G., Santin, M., 2021. *Blastocystis* in domesticated and wild mammals and birds. *Research in Veterinary Science* 135, 260–282. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.031>
- 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. *Parasitology research* 102, 853–860. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0833-z>
- Iebba, V., Santangelo, F., Totino, V., Pantanella, F., Monsia, A., Di Cristanziano, V., Di Cave, D., Schippa, S., Berrilli, F., D'Alfonso, R., 2016. Gut microbiota related to *Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp. and *Blastocystis* hominis infections in humans from Côte D'ivoire. *Journal of Infection in Developing Countries* 10, 1035–1041. <https://doi.org/10.3855/jidc.8179>
- 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. *Parasitology International* 56, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2006.12.004>
- 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. *Parasitology Research* 105, 135–140. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1373-5>
- Init, I., Mak, J.W., Lokman Hakim, S., Yong, H.S., 1999. Strain differences in *Blastocystis* isolates as detected by a single set of polymerase chain reaction primers. *Parasitology Research* 85, 131–134. <https://doi.org/10.1007/s004360050521>

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. *Journal of Infection* 35, 63–66. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(97\)91025-2](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(97)91025-2)

Jeremiah, S., Parija, S., 2013. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology* 3, 17. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113894>

Jimenez-Gonzalez, D.E., Martinez-Flores, W.A., Reyes-Gordillo, J., Ramirez-Miranda, M.E., Sara Arroyo-Escalante, Romero-Valdovinos, M., Stark, D., Souza-Saldivar, V., Martinez-Hernandez, F., Flisser, A., Olivo-Diaz, A., Maravilla, P., 2012. *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitology Research* 110, 1269–1275. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2626-7>

Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M.C.J., 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. *Wellcome Open Research* 3, 1–20. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>

Jones, M.S., Whipps, C.M., Ganac, R.D., Hudson, N.R., Boroom, K., 2009. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitology Research* 104, 341–345. <https://doi.org/10.1007/S00436-008-1198-7>

Jones, W.R., 1946. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Annals of tropical medicine and parasitology* 40, 130–140.

Kaczmarek, A., Gołąb, E., Żarnowska-Prymek, H., Rawska, A., Jańczak, D., Lewicki, A., Wesołowska, M., Rożej-Bielicka, W., Cielecka, D., Sałamatin, R., 2017. Genetic diversity of *Blastocystis* hominis sensu lato isolated from humans in Poland = Zróżnicowanie genetyczne *Blastocystis* hominis sensu lato wyizolowanych od ludzi w Polsce. *Przegląd Epidemiologiczny* 71, 539–546.

Kaczmarek, A., Lewicki, A., Dziejczak, K., Sulecki, K., Rożej-bielicka, W., Wesołowska, M., Gołąb, E., 2019. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens from Poland and Madagascar. *Annals of Parasitology* 65, s30.

Kaczmarek, A., Rocka, A., Wesołowska, M., Gołąb, E., Sałamatin, R., 2020. *Blastocystis* isolates from a dog and their owners presenting with chronic diarrhoea. Dogs as reservoirs of *Blastocystis*: research in Poland and worldwide. *Annals of parasitology* 66, 573–579. <https://doi.org/10.17420/ap6604.300>

Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X.J., Fujita, Y., Maruyama, M., Tachibana, H., 2001. Ribodemes of *Blastocystis* Hominis isolated in Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65, 393–396. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.393>

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 [13]. *Acta Dermato-Venereologica* 88, 80–81. <https://doi.org/10.2340/00015555-0338>

Katsumata, M., Yoshikawa, H., Tokoro, M., Mizuno, T., Nagamoto, T., Hendarto, J., Asih, P.B.S., Rozi, I.E., Kimata, I., Takami, K., Syafruddin, D., 2018. Molecular phylogeny of *Blastocystis* isolates from wild rodents captured in Indonesia and Japan. *Parasitology Research* 117, 2841–2846. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5973-9>

- Khademvatan, S., Abdizadeh, R., Rahim, F., Hashemitabar, M., 2014. Stray Cats Gastrointestinal Parasites and its Association With Public Health in Ahvaz City , South Western of Iran. *Jundishapur J Microbiol* 7, 1–6. <https://doi.org/10.5812/jjm.11079>
- Khan, A., Shaik, J.S., Grigg, M.E., 2018. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica* 184, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023>
- Kodio, A., Coulibaly, D., Koné, A.K., Konaté, S., Doumbo, S., Guindo, A., Bittar, F., Gouriet, F., Raoult, D., Thera, M.A., Ranque, S., 2019. *Blastocystis* colonization is associated with increased diversity and altered gut bacterial communities in healthy malian children. *Microorganisms* 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120649>
- Koloren, Z., Gulabi, B.B., Karanis, P., 2018. Molecular identification of *Blastocystis* sp. subtypes in water samples collected from Black sea, Turkey. *Acta Tropica* 180, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.029>
- Kotłowski, A., 2012. Blastocystosis - an attempt of evaluation of clinical symptoms and effectivity of metronidazole treatment in different parasitic invasion levels and isolated genotypes of *Blastocystis* sp. among Poles returning from the tropics and not leaving their countr. *Annales Academiae Medicae Gedanensis* 42, 1–85.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kurt, Ö., Doğruman Al, F., Tanyüksel, M., 2016. Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all? *Parasitology International* 65, 797–801. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.01.010>
- Kwak D, S.M., 2020. Genetic Analysis of Zoonotic Gastrointestinal Protozoa and Microsporidia in Shelter Cats in Korea. *Pathogens* 27. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110894>
- La Sala, L.F., Leiboff, A., Burgos, J.M., Costamagna, S.R., 2015. Spatial distribution of canine zoonotic enteroparasites in Bahía Blanca, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 47, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.006>
- Laforest-Lapointe, I., Arrieta, M.-C., 2018. Microbial Eukaryotes: a Missing Link in Gut Microbiome Studies. *mSystems* 3, 1–5. <https://doi.org/10.1128/msystems.00201-17>
- Lakhanpal, S., Cohen, S.B., Fleischmann, R.M., 1991. Reactive arthritis from *Blastocystis hominis*. *Arthritis & Rheumatism* 34, 251–253. <https://doi.org/10.1002/ART.1780340227>
- Lee, H., Seo, M.-G., Oem, J.-K., Kim, Y.-S., Lee, S.-Y., Kim, J., Jeong, H., Jheong, W.-H., Kim, Y., Lee, W.-J., Kwon, O.-D., Kwak, D., 2020. Molecular Detection and Subtyping of *Blastocystis* Detected in Wild Boars (*Sus scrofa*) in South Korea. *Journal of Wildlife Diseases* 56, 662–666.
- Lee, L.I., Chye, T.T., Karmacharya, B.M., Govind, S.K., 2012. *Blastocystis* sp.: Waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites and Vectors* 5, 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-130>
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Naaglor, T., Taamasri, P., Mungthin, M., 2009. Prevalence of intestinal parasitic infections in military personnel and military dogs, Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* 92 Suppl 1, S53-9.

- Lepczyńska, M., Białkowska, J., Dzika, E., Piskorz-Ogórek, K., Korycińska, J., 2017. *Blastocystis*: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 36, 1531–1540. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2965-0>
- Lepczyńska, M., Dzika, E., Stensvold, C.R., 2016. Genetic diversity of *Blastocystis* spp . in the human population of the Olsztyn area. *Annals of Parasitology* 62, 28.
- Lewicki, A., Rozej-Bielicka, W., Sałamatin, R., 2016. *Blastocystis* hominis s . l . ST6 – parasite of chickens – new zoonotic agent in Poland. *Annals of Parasitology* 62, 203.
- Li, J., Karim, M.R., Li, D., Rahaman Sumon, S.M.M., Siddiki, S.H.M.F., Rume, F.I., Sun, R., Jia, Y., Zhang, L., 2019. Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wildlife in Bangladesh National Zoo: Non-human primates with high prevalence and zoonotic significance. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 10, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.11.003>
- Li, J., Yuan, Y., Jiang, Y., Wang, W., Chao, L., Sun, R., Li, Jun, Karim, R., 2020. Molecular identification and subtyping of *Blastocystis* sp . in laboratory rats in China 35.
- Li, T., Zou, Y., Ma, Ye-ting, Ma, Yuan-yuan, Chen, H., Liang, X., Cong, W., 2020. Molecular characterization of *Eimeria* spp . and *Blastocystis* in rabbits in Shandong Province , China. *Parasitology Research* 119, 1547–1551. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06652-0>
- Li, W., Liu, X., Gu, Y., Liu, J., Luo, J., 2019. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis*, and trichomonads in domestic cats in East China. *The Journal of veterinary medical science* 81, 890–896. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0111>
- Li WC, Wang K, Qin M, Liu ZH, Yuan G, Liu DY, G.Y., 2016. *Blastocystis* Infection in Pet Dogs in Selected Areas of Anhui and Zhejiang Provinces. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 34, 273–6.
- Li, X.D., Zou, Y., Pan, J., Liang, Q.L., Zeng, Z., Meng, Y.M., Wang, X.L., Wang, H.N., Zhu, X.Q., 2020. Prevalence and subtypes of *Blastocystis* sp. infection in zoo animals in three cities in China. *Parasitology Research* 119, 465–471. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06571-9>
- Liao, S., Lin, X., Sun, Y., Qi, N., Lv, M., Wu, C., Li, J., Hu, J., Yu, L., Cai, H., Xiao, W., Sun, M., Li, G., 2020. Occurrence and genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Blastocystis* sp. in household, shelter, breeding, and pet market dogs in Guangzhou, southern China. *Scientific Reports* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74299-z>
- López D, J., Abarca V, K., Paredes M, P., Inzunza T, E., 2006. Parásitos intestinales en caninos y felinos con cuadros digestivos en Santiago, Chile: Consideraciones en Salud Pública. *Revista médica de Chile* 134, 193–200. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872006000200009>
- Ma L, Qiao H, Wang H, Li S, Zhai P, Huang J, G.Y., 2020. Molecular prevalence and subtypes of *Blastocystis* sp. in primates in Northern China. *Transbound Emerg Dis*. 67, 2789–2796. <https://doi.org/10.1111/tbed.13644>
- Ma, L., Zhang, Y., Qiao, H., Li, S., Wang, H., Zhang, N., Zhang, X., 2020. Cockroach as a vector of *Blastocystis* sp. Is risk for golden monkeys in zoo. *Korean Journal of Parasitology* 58, 583–587. <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.5.583>
- Maloney, J.G., da Cunha, M.J.R., Molokin, A., Cury, M.C., Santin, M., 2021. Next-generation sequencing reveals wide genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in chickens including

- potentially zoonotic subtypes. *Parasitology Research* 120, 2219–2231. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07170-3>
- Maloney, J.G., Lombard, J.E., Urie, N.J., Shivley, C.B., Santin, M., 2019a. Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitology Research* 118, 575–582. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6149-3>
- Maloney, J.G., Molokin, A., da Cunha, M.J.R., Cury, M.C., Santin, M., 2020. *Blastocystis* subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using next generation amplicon sequencing. *Parasite Epidemiology and Control* 9, e00138. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00138>
- Maloney, J.G., Molokin, A., Santin, M., 2019b. Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infection, Genetics and Evolution* 73, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.013>
- Maloney, J.G., Santin, M., 2021. Mind the gap: New full-length sequences of *Blastocystis* subtypes generated via oxford nanopore minion sequencing allow for comparisons between full-length and partial sequences of the small subunit of the ribosomal rna gene. *Microorganisms* 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050997>
- Markell, E.K., Udkow, M.P., 1986. *Blastocystis* hominis pathogen or fellow traveler? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35, 1023–1026. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1986.35.1023>
- Martínez-Barbabosa, I., Gutiérrez-Cárdenas, E.M., Hamdan-Partida, A., Bustos-Martínez, J., Shea, M., 2018. Presence of *Blastocystis* spp. in the mollusc *Crassostrea virginica*, in Mexico City. *Revista de Salud Animal* 40, 1–5.
- 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. *Molecular and Cellular Probes* 22, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.06.007>
- Menu, E., Mary, C., Toga, I., Raoult, D., Ranque, S., Bittar, F., 2019. a hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France. *Epidemiology and Infection* 147. <https://doi.org/10.1017/s0950268819000165>
- Mirjalali, H., Abbasi, M.R., Naderi, N., Hasani, Z., Mirsamadi, E.S., Stensvold, C.R., Balaii, H., Asadzadeh Aghdaei, H., Zali, M.R., 2017. Distribution and phylogenetic analysis of *Blastocystis* sp. subtypes isolated from IBD patients and healthy individuals in Iran. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3065-x>
- 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. *Parasitology Research* 82, 439–444. <https://doi.org/10.1007/s004360050142>
- Mohaghegh, M., Vafaei, M., Ghomashlooyan, M., Azami, M., Falahati, M., Azadi, Y., Yousefi, H., Jabalameli, Z., Hejazi, S., 2018. a wide diversity of zoonotic intestinal parasites in domestic and stray dogs in rural areas of Kermanshah province, Iran. *Tropical Biomedicine* 35, 82–90.
- Mohamed, A.M., Ahmed, M.A., Ahmed, S.A., Al-Semany, S.A., Alghamdi, S.S., Zagloul, D.A., 2017. Predominance and association risk of *Blastocystis* hominis subtype i in colorectal cancer:

a case control study. *Infectious Agents and Cancer* 12, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0131-z>

Mohammadpour, I., Bozorg-Ghalati, F., Gazzonis, A.L., Manfredi, M.T., Motazedian, M.H., Mohammadpour, N., 2020. First molecular subtyping and phylogeny of *Blastocystis* sp. isolated from domestic and synanthropic animals (dogs, cats and brown rats) in southern Iran. *Parasites and Vectors* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04225-9>

Mondot, S., Poirier, P., Abou-Bacar, A., Greigert, V., Brunet, J., Nourrisson, C., Randrianarivelojosia, M., Razafindrakoto, J.L., Morel, E., Rakotomalala, R.S., Leclerc, M., Le Roux, K., Monot, C., Lepage, P., Candolfi, E., 2021. Parasites and diet as main drivers of the Malagasy gut microbiome richness and function. *Scientific Reports* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96967-4>

Moura, R.G.F., de Oliveira-Silva, M.B., Pedrosa, A.L., Nascentes, G.A.N., Cabrine-Santos, M., 2018. Occurrence of *Blastocystis* spp. in domestic animals in triângulo mineiro area of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 51, 240–243. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0484-2016>

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. *Internal Medicine Journal* 42, 1187–1195. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2011.02626.x>

Nemati, S., Zali, M.R., Johnson, P., Mirjalali, H., Karanis, P., 2021. Molecular prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Asia and in Australia. *Journal of Water and Health* 19, 687–704. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.011>

Nieves-Ramirez, M.E., Partida-Rodriguez, O., Laforest-Lapointe, L.A., Reynolds, L.A., Brown, E.M., Morien, E., Parfrey, L.W., Jin, M., Walter, J., Torres, J., Arrieta, M.C., Finlay, B.B., 2018. Asymptomatic Intestinal Colonization with Protist *Blastocystis*. *Host-Microbe Biology* 3, 1–18.

Noël, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L.C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M.L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L., Viscogliosi, E., 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: Implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 348–355. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.348-355.2005>

Noël, C., Peyronnet, C., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Sogin, M.L., Capron, M., Viscogliosi, E., Zenner, L., 2003. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126, 119–123. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00246-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00246-3)

Noradilah, S.A., Lee, I.L., Anuar, T.S., Salleh, F.M., Manap, S.N.A.A., Mohtar, N.S.H.M., Azrul, S.M., Abdullah, W.O., Moktar, N., 2016. Occurrence of *Blastocystis* sp. in water catchments at Malay villages and Aboriginal settlement during wet and dry seasons in Peninsular Malaysia. *PeerJ* 2016, 1–20. <https://doi.org/10.7717/peerj.2541>

Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Livrelli, V., Viscogliosi, E., Delbac, F. et al., 2016. On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology* 143, 1713–22.

- Oliveira-Arbex, A.P., David, É.B., Guimarães, S., 2018a. *Blastocystis* genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 57, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.005>
- Oliveira-Arbex, A.P., David, É.B., Tenório, M. da S., Cicchi, P.J.P., Patti, M., Coradi, S.T., Lucheis, S.B., Jim, J., Guimarães, S., 2020. Diversity of *Blastocystis* subtypes in wild mammals from a zoo and two conservation units in southeastern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 78. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104053>
- Onder, Z., Yildirim, A., Pekmezci, D., Duzlu, O., Pekmezci, G.Z., Ciloglu, A., Simsek, E., Kokcu, N.D., Yetismis, G., Ercan, N., Inci, A., 2021. Molecular identification and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in farm and pet animals in Turkey. *Acta Tropica* 220, 105939. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105939>
- Opazo, A., Barrientos, C., Sanhueza, A., Urrutia, N., Fernández, I., 2019. Fauna parasitaria en caninos (*Canis lupus familiaris*) de un sector rural de la región central de Chile. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 30, 330-338 (in Spanish with summary in English). <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15683>
- 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. *Veterinary Parasitology* 214, 167–170. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.015>
- Özyurt, M., Kurt, Ö., Mølbak, K., Nielsen, H.V., Haznedaroglu, T., Stensvold, C.R., 2008. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitology International* 57, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.01.004>
- Pakandl, M., Koudela, B., Vitovec, J., 1993. An experimental infection of conventional and gnotobiotic piglets with human and porcine strains of *Blastocystis*. *Folia Parasitologica* 40, 319–320.
- 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. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001582>
- Parkar, U., Traub, R.J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., Geurden, T., Steele, J., Drake, B., Thompson, R.C.A., 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary parasitology* 169, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.032>
- Paulos, S., Köster, P.C., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., Cardona, G.A., Fernández-Crespo, J.C., Stensvold, C.R., Carmena, D., 2018. Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonoses and Public Health* 65, 993–1002. <https://doi.org/10.1111/zph.12522>
- Petrášová, J., Uzlíková, M., Kostka, M., Petrželková, K.J., Huffman, M.A., Modrý, D., 2011. Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. *International Journal for Parasitology* 41, 1113–1120. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.06.010>

- Pintong, A. rada, Sunyanusin, S., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T., Komalamisra, C., Sukthana, Y., Popruk, S., 2018. *Blastocystis* subtype 5: Predominant subtype on pig farms, Thailand. *Parasitology International* 67, 824–828. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.08.009>
- Piubelli, C., Soleymanpoor, H., Giorli, G., Formenti, F., Buonfrate, D., Bisoffi, Z., Perandin, F., 2019. *Blastocystis* prevalence and subtypes in autochthonous and immigrant patients in a referral centre for parasitic infections in Italy. *PLoS ONE* 14, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210171>
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 975–983. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-10>
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C.P., Delbac, F., El Alaoui, H., 2012. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathogens* 8, 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002545>
- Premaalatha, B., Chandrawathani, P., Priscilla, F.X., T, F.H.M., Jamnah, O., Zaini, C.M., Ramlan, M., 2017. a SURVEY OF ENDOPARASITE AND ECTOPARASITE INFECTIONS OF WILD RATS CAUGHT IN AREAS OF IPOH AND KUALA LUMPUR, MALAYSIA. *MALAYSIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH* 8, 29–34.
- Pritt, B.S., Clark, G.C., 2008. Amebiasis. *Mayo Clinic Proceedings* 83, 1154–1160. <https://doi.org/10.4065/83.10.1154>
- Puthia, M., Lu, J., Tan, K., 2008. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Eukaryot Cell* 7, 435–43. <https://doi.org/10.1128/EC.00371-07>
- Puthia, M., Vaithilingam, A., Lu, J., Tan, K., 2005. Degradation of human secretory immunoglobulin a by *Blastocystis*. *Parasitol Res* 97, 386–389. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1461-0>
- Rajamanikam, A., Hooi, H.S., Kudva, M., Samudi, C., Kumar, S., 2019. Resistance towards metronidazole in *Blastocystis* sp.: a pathogenic consequence. *PLoS ONE* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212542>
- Rajič, B., Arapović, J., Raguž, K., Bošković, M., Babić, S.M., Maslač, S., 2015. Eradication of *Blastocystis hominis* prevents the development of symptomatic hashimoto's thyroiditis: a case report. *Journal of Infection in Developing Countries* 9, 788–791. <https://doi.org/10.3855/jidc.4851>
- Ramírez, J.D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M.C., Giraldo, J.C., Reyes, P., López, M.C., García, L., Cooper, P.J., Vicuña, Y., Mongi, F., Casero, R.D., 2016. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection, Genetics and Evolution* 41, 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.017>
- Ramírez, J.D., Sánchez, L.V., Bautista, D.C., Corredor, A.F., Flórez, A.C., Stensvold, C.R., 2014. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection, Genetics and Evolution* 22, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.020>

- Rauff-Adedotun, A.A., Haziqah, F., Termizi, M., Shaari, N., Lee, I.L., 2021. Environmental Sources from 2010 – 2021 in Asia. *Biology* 10, 1–40. <https://doi.org/10.3390/biology10100990>
- Ren, M., Song, J.K., Yang, F., Zou, M., Wang, P.X., Wang, D., Zhang, H.J., Zhao, G.H., Lin, Q., 2019. First genotyping of *Blastocystis* in yaks from Qinghai Province, northwestern China. *Parasites and Vectors* 12, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3436-5>
- Rene, B., Stensvold, C., Badsberg, J., Nielsen, H., 2009. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 80, 588–592.
- Riggio, F., Mannella, R., Ariti, G., Perrucci, S., 2013. Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. *Veterinary Parasitology* 193, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.026>
- Rivera, W.L., Tan, M.A. V., 2005. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates in the Philippines by riboprinting. *Parasitology Research* 96, 253–257. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1344-4>
- Rivero-Juarez, A., Dashti, A., López-López, P., Muadica, A.S., Rivalde, M.D.L.A., Rivalde, M.D.L.A., Köster, P.C., Machuca, I., Bailo, B., De Mingo, M.H., Dacal, E., García-Bocanegra, I., Saugar, J.M., Calero-Bernal, R., González-Barrio, D., González-Barrio, D., González-Barrio, D., Rivero, A., Briz, V., Carmena, D., 2020. Protist enteroparasites in wild boar (*Sus scrofa ferus*) and black Iberian pig (*Sus scrofa domesticus*) in southern Spain: a protective effect on hepatitis e acquisition? *Parasites and Vectors* 13. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04152-9>
- 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84, 308–312. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0447>
- Roberts, T., Ellis, J., Harkness, J., Marriott, D., Stark, D., 2014a. Treatment failure in patients with chronic *Blastocystis* infection. *Journal of Medical Microbiology* 63, 252–257. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.065508-0>
- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J., 2014b. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-17>
- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J., 2013. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Veterinary parasitology* 196, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.011>
- Ruau, C.G., Stang, B. V., 2014. Prevalence of *Blastocystis* in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107496>
- Rudzińska, M., Kowalewska, B., Szostakowska, B., Grzybek, M., Sikorska, K., Świątalska, A., 2020. First report on the occurrence and subtypes of *Blastocystis* in pigs in Poland using sequence-tagged-site pcr and barcode region sequencing. *Pathogens* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070595>
- Rudzińska, M., Kowalewska, B., Waleron, M., Kalicki, M., Sikorska, K., Szostakowska, B., 2021. Molecular characterization of *Blastocystis* from animals and their caregivers at the gdańsk zoo

(Poland) and the assessment of zoonotic transmission. *Biology* 10. <https://doi.org/10.3390/biology10100984>

Russini, V., Di Filippo, M.M., Fanelli, R., Polidori, M., Berrilli, F., Di Cave, D., Novelletto, A., Calderini, P., 2020. Characterization of prevalence and genetic subtypes of *Blastocystis* sp. in wild and domestic Suidae of central Italy aided by amplicon NGS. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 22, 100472. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100472>

Sadaf, H.S., Khan, S.S., Urooj, K.S., Asma, B., Ajmal, S.M., Karachi, T., 2013. *Blastocystis* Hominis-Potential Diahorreal Agent: a Review. *International Research Journal of Pharmacy* 4, 1–5.

Salim, H.R., Kumar, G.S., Vellayan, S., Mak, J.W., Khairul Anuar, A., Init, I., Vennila, G.D., Saminathan, R., Ramakrishnan, K., 1999. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitology Research* 85, 1032–1033. <https://doi.org/10.1007/s004360050677>

Santín, M., Gómez-Muñoz, M.T., Solano-Aguilar, G., Fayer, R., 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology Research* 109, 205–212. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2244-9>

Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G.H.J., 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 Microbiology Ecology* 90, 326–330. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12396>

Sciicluna, S.M., Tawari, B., Clark, C.G., 2006. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 157, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.12.001>

Sebaa, S., Behnke, J.M., Baroudi, D., Hakem, A., Abu-Madi, M.A., 2021. Prevalence and risk factors of intestinal protozoan infection among symptomatic and asymptomatic populations in rural and urban areas of southern Algeria. *BMC Infectious Diseases* 21, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06615-5>

Seyer, A., Karasartova, D., Ruh, E., Gureser, A.S., Turgal, E., Imir, T., Taylan-Ozkan, A., 2017. Epidemiology and Prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 96, 1164–1170. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0706>

Shah, M., Tan, C.B., Rajan, D., Ahmed, S., Subramani, K., Rizvon, K., Mustacchia, P., 2012. *Blastocystis* hominis and *Endolimax nana* Co-infection resulting in chronic diarrhea in an immunocompetent male. *Case Reports in Gastroenterology* 6, 358–364. <https://doi.org/10.1159/000339205>

Shirvani, G., Fasihi-Harandi, M., Raiesi, O., Bazargan, N., Zahedi, M.J., Sharifi, I., Kalantari-Khandani, B., Nooshadokht, M., Shabandoust, H., Mohammadi, M.A., Ebrahimipour, M., Babaei, Z., 2019. Prevalence and Molecular Subtyping of *Blastocystis* from Patients with Irritable Bowel Syndrome, Inflammatory Bowel Disease and Chronic Urticaria in Iran. *Acta Parasitologica*. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00131-y>

Silberman, J.D., Sogin, M.L., Leipe, D.D., Clark, C.G., 1996. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/380398a0>

Snowden, K., Logan, K., Blozinski, C., Hoevers, J., Holman, P., 2000. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis* isolates from animal hosts. *Parasitology Research* 86, 62–66. <https://doi.org/10.1007/s004360050011>

- 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. *Journal of Wildlife Diseases* 40, 801–803. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.801>
- Soliman, R., Abaza, S., Mokhtar, A., Nemr, N., Rayan, H., 2014. Subtype analysis of *Blastocystis* spp. isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Suez Canal University Hospitals, Ismailia, Egypt. *Parasitologists United Journal* 7, 56. <https://doi.org/10.4103/1687-7942.139691>
- 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 Tropica* 173, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.014>
- 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. *Parasitology Research* 105, 413–421. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1398-9>
- Spanakos, G., Papadogiannakis, E., Kontos, V., Menounos, P., Velonakis, E., Koutis, C., Vakalis, N., 2011. Molecular screening for *Blastocystis* sp. in canine faecal samples in Greece. *JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY* 62, 216–220.
- Stensvold, C., Alfellani, M., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E., Maddox, C., Nielsen, H., Clark, C., 2009. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal for Parasitology* 39, 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.006>
- Stensvold, C.R., Alfellani, M., Clark, C.G., 2012. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.002>
- Stensvold, C.R., Arendrup, M.C., Jespersgaard, C., Molbak, K., Nielsen, H. V., 2007. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 59, 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003>
- 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 883–885. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0005>
- Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2020. Pre-empting Pandora's Box: *Blastocystis* Subtypes Revisited. *Trends in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.009>
- Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2016. Current status of *Blastocystis*: a personal view. *Parasitology International* 65, 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>
- Stensvold, C.R., Nielsen, H. V, Molbak, K., Smith, H. V, 2009. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis*--diagnostic limitations. *Trends in parasitology* 25, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.09.010>
- Stensvold, C.R., Tan, K.S.W., Clark, C.G., 2020. *Blastocystis*. *Trends in Parasitology* 36, 315–316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.008>

- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, C.C., 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes -a consensus. *Trends in Parasitology* 23, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.004>
- Stenzel, D.J., Boreham, P.F., 1996. *Blastocystis* hominis revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 9, 563–584.
- Subirats, M., Borrás, R., 2018. *Blastocystis* sp., an emerging parasite with controversial pathogenicity. Should all human cases be treated? *Revista Clínica Española (English Edition)* 218, 133–134. <https://doi.org/10.1016/j.rceng.2018.03.001>
- Suresh, K., Ng, G.C., Ramachandran, N.P., Ho, L.C., Yap, E.H., Singh, M., 1993. In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis* hominis. *Parasitology Research* 79, 456–460. <https://doi.org/10.1007/BF00931582>
- Suresh, K., Smith, H., 2004. Comparison of methods for detecting *Blastocystis* hominis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 23, 509–511. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1123-7>
- Suresh, K., Smith, H., Tan, T., 2005. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5619–5620. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5619-5620.2005>
- Tan, K.S.W., 2008. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 639–665. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08>
- Tan, T., Suresh, K.G., 2006. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis* hominis in isolates from symptomatic patients. *Parasitology Research* 98, 189–193. <https://doi.org/10.1007/S00436-005-0033-7>
- Tan, T.C., Ong, S.C., Suresh, K.G., 2009. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitology Research* 105, 1283–1286. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1551-5>
- Teow, W.L., Ng, G.C., Chan, P.P., Chan, Y.C., Yap, E.H., Zaman, V., Singh, M., 1992. a survey of *Blastocystis* in reptiles. *Parasitology research* 78, 453–455.
- Teow, W.L., Zaman, V., Ng, G.C., Chan, Y.C., Yap, E.H., Howe, J. Gopalakrishnakone, P. Singh, M., 1991. a *Blastocystis* species from the sea-snake, *Lapemis hardwickii* (Serpentes: Hydrophiidae). *International Journal for Parasitology* 21, 723–726. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90086-M](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90086-M)
- Thathaisong, U., Worapong, J., Tan-ariya, P., Viputtigul, K., Mungthin, M., Sudatis, A., Noonai, A., Leelayoova, S., 2003. *Blastocystis* Isolates from a Pig and a Horse Are Closely Related to *Blastocystis* hominis *Blastocystis* Isolates from a Pig and a Horse Are Closely Related to *Blastocystis* hominis 41, 967–975. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.967>
- Tito, R.Y., Chaffron, S., Caenepeel, C., Lima-Mendez, G., Wang, J., Vieira-Silva, S., Falony, G., Hildebrand, F., Darzi, Y., Rymenans, L., Verspecht, C., Bork, P., Vermeire, S., Joossens, M., Raes, J., 2019. Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut* 68, 1180–1189. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316106>

- Udonsom, R., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T., Komalamisra, C., Pintong, A. rada, Sukthana, Y., Popruk, S., 2018. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infection, Genetics and Evolution* 65, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.007>
- Valença-Barbosa, C., Do Bomfim, T.C.B., Teixeira, B.R., Gentile, R., Da Costa Neto, S.F., Magalhães, B.S.N., De Almeida Balthazar, D., Da Silva, F.A., Biot, R., D'Avila Levy, C.M., Santos, H.L.C., 2019. Molecular epidemiology of *Blastocystis* isolated from animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE* 14, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210740>
- Vdovenko, A.A., 2000. *Blastocystis* hominis: Origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitology Research* 86, 8–10. <https://doi.org/10.1007/PL00008506>
- Vega, L., Herrera, G., Munoz, M., Patarroyo, M.A., Maloney, J.G., Santin, M., Ramirez, J.D., 2021. Gut microbiota profiles in diarrheic patients with co-occurrence of *Clostridioides difficile* and *Blastocystis*. *PLoS ONE* 16, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248185>
- Villamizar, X., Higuera, A., Herrera, G., Vasquez-A, L.R., Buitron, L., Muñoz, L.M., Gonzalez-C, F.E., Lopez, M.C., Giraldo, J.C., Ramirez, J.D., 2019. Molecular and descriptive epidemiology of intestinal protozoan parasites of children and their pets in Cauca, Colombia: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases* 19, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3810-0>
- 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. *Parasitology International* 59, 469–471. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2010.03.009>
- Wang, J., Gong, B., Liu, X., Zhao, W., Bu, T., Zhang, W., Liu, A., Yang, F., 2018. Distribution and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in various mammal and bird species in northeastern China. *Parasites and Vectors* 11, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3106-z>
- Wang, W., 2014. Investigating the suitability of dogs and pigs as animal models for blastocystosis.
- Wang, W., Cuttell, L., Bielefeldt-Ohmann, H., Inpankaew, T., Owen, H., Traub, R.J., 2013. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasites and Vectors* 6, 215–219. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-215>
- Wang, W., Cuttell, L., Traub, R.J., Owen, H., Bielefeldt-Ohmann, H., 2014. Characterization of the *Blastocystis*-specific faecal IgA immune response in pigs. *Parasite Immunology* 36, 503–508. <https://doi.org/10.1111/pim.12123>
- Wang, Wenqi, Owen, H., Traub, R.J., Cuttell, L., Inpankaew, T., Bielefeldt-Ohmann, H., 2014. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Veterinary Parasitology* 203, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.006>
- Wesołowska, Maria, Paszta, W., Michrowska, A., Piekarska, J., Wesołowska, Marta, Gorczykowski, M., Kaczmarek, A., Sałamatin, R., 2019. Molecular characterization of *Blastocystis* subtypes isolated from various mammalian groups living in Wrocław ZOO, Poland. *Annals of Parasitology* 65, s47.
- Wesołowska, W., Kicia, M., Szetela, B., Kopacz, Z., Sałamatin, R., Rymer, W., Szymczak, A., Knysz, B., 2016. Prevalence of *Blastocystis* hominis among HIV-positive and HIV-negative

patients in Poland. [12th European Multicolloquium of Parasitology. EMOP XII. Turku, Finland, July 20–24th 2016] : Abstracts P6.11.

Wong, K.H.S., Ng, G.C., Lin, R.T.P., Yoshikawa, H., Taylor, M.B., Tan, K.S.W., 2008. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology Research* 102, 663–670. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0808-0>

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*. *Parasitology Research* 106, 1033–1038. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1761-x>

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*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70, 383–385. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.383>

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. *Parasitology Research* 101, 1527–1532. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0672-y>

Yason, J.A., Liang, Y.R., Png, C.W., Zhang, Y., Tan, K.S.W., 2019. Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: In vitro and in vivo studies. *Microbiome* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0644-3>

Yersal, O., Malatyali, E., Ertabaklar, H., Oktay, E., Barutca, S., Ertug, S., 2016. *Blastocystis* subtypes in cancer patients: Analysis of possible risk factors and clinical characteristics. *Parasitology International* 65. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.02.010>

Yildiz, S., Dogan, I., Doğruman-Al, F., Nalbantoğlu, U., Üstek, D., Sarzhanov, F., Yildirim, S., 2016. Association of enteric protist *Blastocystis* spp. And gut microbiota with hepatic encephalopathy. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 25, 489–497. <https://doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.254.yiz>

Yoshikawa, H., Abe, N., Iwasawa, M., Kitano, S., Nagano, I., Wu, Z., Takahashi, Y., 2000. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1324–1330. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.4.1324-1330.2000>

Yoshikawa, H., Abe, N., Wu, Z., 2004a. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology* 150, 1147–1151. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26899-0>

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. *Parasitology Research* 109, 1045–1050. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2342-3>

Yoshikawa, H., Iwamasa, A., 2016. Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU rRNA gene. *Parasitology international* 65, 785–791. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.03.002>

Yoshikawa, H., Koyama, Y., Tsuchiya, E., Takami, K., 2016. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitology International* 65, 750–759. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.04.004>

Yoshikawa, H., Nagano, I., Wu, Z., Yap, E.H., 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. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0161>

Yoshikawa, H., Nagono, 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. *Eukaryotic Microbiology* 43, 127–130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb04492.x>

Yoshikawa, H., Wu, Z., Howe, J., Hashimoto, T., Geok-Choo, N., Tan, K., 2007. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *J Eukaryot Microbiol* . 54, 33–37. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00141.x>

Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I.K.M.D., 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. *Parasitology Research* 92, 22–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0995-2>

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. *Veterinary Parasitology* 160, 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.029>

Yowang, A., Tsaousis, A.D., Chumphonsuk, T., Thongsin, N., Kullawong, N., Popluechai, S., Gentekaki, E., 2018. High diversity of *Blastocystis* subtypes isolated from asymptomatic adults living in Chiang Rai, Thailand. *Infection, Genetics and Evolution* 65, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.08.010>

Zhang, X., Zhang, S., Qiao, J., Wu, X., 2012. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis* hominis 1165–1172. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2607-x>

Zhao, G.H., Hu, X.F., Liu, T.L., Hu, R.S., Yu, Z.Q., Yang, W.B., Wu, Y.L., Yu, S.K., Song, J.K., 2017. Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qinling Mountains. *Parasitology Research* 116, 2327–2333. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5506-y>

Zierdt, C.H., 1991. *Blastocystis* hominis--past and future. *Clinical microbiology reviews* 4, 61–79. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.1.61.Updated>

Zierdt, C.H., Rude, W.S., Bull, B.S., 1967. Protozoan characteristics of *Blastocystis* hominis. *American journal of clinical pathology* 48, 495–501.

i