

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Максимова Мария Сергеевна

Верификация диагностики *Blastocystis species* при разных формах инфекции

03.02.11 - Паразитология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Морозов Евгений Николаевич

Научный консультант:

кандидат медицинских наук

Продеус Татьяна Валентиновна

Москва – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Морфологические и генетические особенности паразита.....	11
1.2. Основные схемы жизненного цикла и вопросы эпидемиологии	16
1.3. Патогенный потенциал паразита	22
1.4. Лабораторная идентификация <i>Blastocystis spp.</i>	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1. Общая характеристика исследования.....	36
2.2. Сбор, транспортировка и хранение материала	38
2.3. Общие и специальные методы идентификации бластоцист	40
2.3.1. Метод формалин – эфирного осаждения (ФЭО)	40
2.3.2. Метод концентрации «Mini Parasep® 108900» (Aparcor, England).....	40
2.3.3. Методы окрашивания	41
2.3.3.1. Метод окрашивания Трихром	41
2.3.3.2. Окрашивание препаратов по методу Романовского - Гимза	42
2.3.3.3. Адаптация метода быстрого окрашивания (набор «Лейкодиф 200») для мазков кала.....	42
2.3.4. Культуральный метод исследования.....	43
2.3.5. Иммунологический метод CoproElisa Blastocystis	43
2.4. Статистическая обработка результатов.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ <i>BLASTOCYSTIS SPP.</i>	47
3.1. Ретроспективный анализ результатов обнаружения <i>Blastocystis</i> на основе модифицированного метода ФЭО в КДЛ Института Марциновского за 2014-2018 гг.....	47
3.2. Сравнительная оценка концентратора «Mini Parasep® 108900» и модифицированного метода ФЭО.....	51

3.3. Применение ФЭО в количественной оценке интенсивности инфекции в группах с различными клиническими проявлениями	56
3.4 Идентификация бластоцист на основе постоянно окрашенных препаратов	61
3.5. Обнаружение <i>Blastocystis spp.</i> при атипичной локализации в слизистой влагалища	73
ГЛАВА 4. АПРОБАЦИЯ И ОЦЕНКА СПЕЦИАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ <i>BLASTOCYSTIS SPP</i>	79
4.1. Культивирование как метод идентификации <i>Blastocystis spp.</i> ...	79
4.2 Оценка иммунологического метода лабораторной диагностики CoproELISA <i>Blastocystis</i>	89
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА СОЧЕТАННО - ИНТЕГРИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ <i>BLASTOCYSTIS SPP</i>	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ВЫВОДЫ	105
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	109
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	126

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время паразитарные болезни все еще занимают большую долю в структуре инфекционной патологии. В 2018 г. в Российской Федерации зарегистрировано более 34 млн случаев инфекционных и паразитарных заболеваний, что ниже показателя 2017 года на 2,6 %. По данным государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году», острые кишечные инфекции (ОКИ) являются одной из ведущих групп инфекционных патологий. В 2018 году зарегистрировано более 816 тыс. случаев ОКИ в Российской Федерации (555,71 на 100 тыс. населения). Следует отметить, что ОКИ неустановленной этиологии занимают четвертое место по экономической значимости, уступая лишь острым респираторным инфекциям, туберкулезу и ветряной оспе, а экономический ущерб оценивается в 16 060 508,9 тыс. рублей [21].

Данная ситуация указывает на сохраняющуюся высокую активность путей передачи: контактно-бытового, водного и пищевого. Эти пути передачи являются общими для возбудителей вирусной, бактериальной и паразитарной природы. Помимо хорошо известных классических патогенных простейших кишечника, таких как *Lambliа intestinalis* и *Entamoeba histolytica*, к этой группе присоединились *Blastocystis spp*, *Cryptosporidium spp.*, *Cyclospora spp.* углублённое изучение которых начато относительно недавно.

На сегодняшний день инфекция, вызываемая *Blastocystis*, на территории Российской Федерации не подлежит регистрации, и не входит в формы государственной статистической отчетности. О проявлениях эпидемического процесса инфекции можно судить, опираясь лишь на данные клиническо – диагностических лабораторий. Но и эти данные занижены так как зависят от многих факторов: метода исследования, профессионального уровня врача КДЛ и др. В среднем примерно каждый четвертый житель земли, т.е около 1 млрд. человек инфицировано бластоцистами.

Однако несмотря на столь широкое распространение, ключевые вопросы биологии паразита, эпидемиологии, клиники, патогенеза и лечения до сих пор не решены. Авторы, посвятившие многие годы изучению бластоцист [92], называют его таинственным, непостижимым (*mysterious*). Применение современных методов исследования дает противоречивые, а иногда обескураживающие результаты. Так, недавно был изучен геном и определен систематический статус бластоцист. Оказалось, что он единственный из паразитических простейших человека, принадлежит к царству *Stramenopiles* и является ближайшим родственником свободноживущих золотистых, бурых и диатомовых водорослей, многие из которых фотосинтезируют.

До настоящего времени не прекращается дискуссия о клиническом значении *Blastocystis spp.* и его патогенном потенциале. Инфекция *Blastocystis sp.* обнаруживается как у иммунокомпетентных людей без клинических проявлений, так и у страдающих кишечными расстройствами, у пациентов с аллергическими кожными проявлениями, у носителей вируса иммунодефицита человека, а также у пациентов со злокачественными новообразованиями.

Для лабораторной идентификации *Blastocystis* применяются как рутинные микроскопические методы обнаружения паразита, так и современные иммунологические и молекулярно-генетические методы. Однако дифференциальная диагностика усложняется в связи с его феноменальной способностью к полиморфизму. Большинство авторов признает наличие 4-х морфотипов: вакуолярная форма, гранулярная, амeboидная и цистная. При этом многие исследователи указывают на возможность и других морфотипов: авакуолярной, мультивакуолярной, так называемых «гигантских» клеток, шизонтов и переходных форм. Каждый из описанных морфотипов также широко варьирует в размерах, форме и внутриклеточной морфологии.

Бластоцисты характеризуются не только фенотипическим, но и генетическим многообразием. В современном представлении, *Blastocystis spp.* - это комплекс генетически различимых субтипов, обозначаемых как (СТ 1-17), из которых 9 инфицируют человека. Наличие патогенных и непатогенных генотипов *Blastocystis*

spp. с полиморфными свойствами при отсутствии стандартизованных методов идентификации, приводит к сложности диагностики и ошибочной интерпретации как лабораторных, так и клинических данных.

В настоящее время интенсивно проводятся исследования различных аспектов инфекции, вызванной *Blastocystis spp.* Высокая инфицированность населения даже развитых стран, многочисленные существенные пробелы наших знаний об этой инфекции привлекают внимание исследователей. Одной из важнейших задач практической медицины является своевременная и достоверная лабораторная диагностика, включающая применение доступных большинству КДЛ современных и эффективных методов.

Цель диссертационной работы:

Совершенствование методов идентификации бластоцист в биологическом материале и разработка сочетано-интегрированной системы анализа на основе рационального и корректного применения методов верификации *Blastocystis spp.*

Задачи исследования:

1. Провести сравнительное изучение эффективности основных методов диагностики, применяемых в КДЛ для выявления *Blastocystis spp.*
2. Верифицировать общепринятую концепцию клинического значения бластоцист на основе порогового числа клеток паразита в исследуемых образцах.
3. Оценить эффективность иммуноферментного анализа в диагностике инфекции, вызванной бластоцистами.
4. Выбрать оптимальный метод окрашивания постоянных препаратов для дифференциальной диагностики бластоцист.
5. На основе результатов исследования разработать сочетано-интегрированную систему идентификации паразита.

Научная новизна результатов исследований:

1. Ретроспективный анализ за пятилетний период результатов диагностики *Blastocystis spp.* методом ФЭО в КДЛ ИМПТ и ТЗ, а также

перекрестное сравнение его с ИФА, показало высокую диагностическую ценность модифицированного метода ФЭО для первичного скрининга.

2. Проведенный мониторинг выделения бластоцист доказал, что количественная оценка не является достоверным критерием течения инфекции.

3. Впервые «MiniParasep 1089003» адаптирован и рекомендован для скрининговой диагностики *Blastocystis spp.* в фиксированных образцах в консерванте Турдыева.

4. В России впервые проведено сравнительное изучение коммерческого набора «CoproELISA Blastocystis» для выявления антигена паразита.

5. Впервые экспресс – метод «Лейкодиф 200» адаптирован для окрашивания кала с целью идентификации *Blastocystis spp.*

6. Метод окрашивания постоянных препаратов позволил установить феномен атипичной локализации *Blastocystis spp.*, что расширяет клиническое понимание инфекции.

7. Разработана и апробирована сочетанно–интегрированная система анализа при идентификации *Blastocystis*.

Практическая значимость работы:

Разработанная сочетано – интегрированная система диагностики инфекции, вызванной *Blastocystis*, позволяет оптимизировать скрининг и дифференциальную диагностику паразита специалистам клинико-диагностических лабораторий разного уровня.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Сравнение паразитологических, культуральных и иммунологических методов диагностики бластоцистной инфекции показало преимущество метода формалин - эфирного осаждения в качестве скринингового и методики окраски «Лейкодиф 200» для дифференциальной диагностики бластоцист.

2. Разработанная сочетанно - интегрированная система диагностики инфекции, вызванной бластоцистами, позволяет оптимизировать процедуру идентификации этого паразита за счет последовательного исследования

фиксированного и свежего материала с корректным применением эффективных методов окрашивания в совокупности с иммунологическим и/или культуральным и паразитологическим методами диагностики.

Внедрение материалов исследований в практику:

1. Материалы исследований используются в виде лекций, семинарских и практических занятий Кафедрой тропической медицины и паразитарных болезней МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по специальности 03.02.11 - «паразитология»;

2. Разработанные методы применяются в работе клиничко – диагностической лаборатории Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний имени Е.И Марциновского Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

3. Результаты работы могут быть использованы при разработке методических рекомендаций для врачей клинической лабораторной диагностики.

4. Материалы исследований используются в виде лекций, семинарских и практических занятий Кафедрой тропических, паразитарных болезней и дезинфекционного дела Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России по специальностям 03.02.11 - «паразитология».

Апробация результатов исследования.

Основные положения диссертационной работы были доложены на:

– VIII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием, г. Москва (Россия), (28 - 30 марта 2016 г.);

– IX Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием, г. Москва (Россия), (27 - 29 марта 2017г.);

– II Российском конгрессе лабораторной медицины, г. Москва (Россия), (12 - 14 октября 2016 г.);

– III Российском конгрессе лабораторной медицины, г. Москва (Россия), (10- 13 октября 2017 г.);

– IV Российском конгрессе лабораторной медицины, г. Москва (Россия), (03 - 05 октября 2018 г.);

– V Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием "Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания", г. Сочи (Россия), (30 октября - 02 ноября 2018 г.).

Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности.

Задачи и научные положения диссертации, выносимые на защиту, соответствуют формуле специальности 03.02.11 - «паразитология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования паспорта специальности 03.02.11 - «паразитология», конкретно пунктам 8, 9.

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 3 работах в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК Российской Федерации.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 126 страницах машинописного текста, содержит 17 таблиц, 33 рисунков. В работе использованы 41 отечественных и 123 иностранных источников литературы.

Благодарности

Выражаю искреннюю признательность своему научному руководителю, доктору медицинских наук, профессору Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им.Е.И.Марциновского Сеченовского Университета Морозову Е.Н. и научному консультанту, старшему научному сотруднику, кандидату медицинских наук НИО ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского Сеченовского Университета Продеус Т.В. за всестороннюю помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Выражаю благодарность сотрудникам ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского Первого МГМУ им. И.М.Сеченова за экспертную помощь к.б.н. Федяниной Л.В., к.м.н. Морозовой Л.Ф, д.м.н. профессору Бронштейну А.М., академику РАН, профессору Сергееву В.П., к.м.н. Кондрашину А.В., с.н.с. Турбабиной Н.А., врачам КДЛ Степановой Е.В. и Фоминой Н.С., зав. КДЛ ИКБ №2 Садыковой В.Д.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфологические и генетические особенности паразита

Впервые бластоцисты описали Loech и Brittan в 1849 г., назвав их «аннулярные тельца». До конца прошлого века систематическое положение бластоцистов не было определено [49, 51]. Сначала их причисляли к жгутиковым простейшим - трихомонадам [60, 88]. Позднее под влиянием работ А. Alexeieff [42], большинство исследователей отнесли бластоцисты к грибам. Из-за отсутствия четкой классификации многие годы протозологи не изучали *Blastocystis*, относящийся к грибам, а микологи не считали его грибом. Таким образом, исследования практически не проводились до 70-х годов прошлого века.

Впервые о протозойной природе бластоцист высказались С. Н. Zierdt et. al [163], применив принцип «доказательства от противного». Были определены характеристики, отличающие их от дрожжеподобных грибов: отсутствие клеточной стенки, характерной для грибов; рост со смешанной бактериальной флорой на бактериальных средах при нейтральной или слабощелочной pH; отсутствие мицелия; наличие псевдоподиального движения и фагоцитоза; оптимальная температура жизнедеятельности - 37°C. В 1988 году те же авторы определили систематическое положение *Blastocystis*. Возбудитель был помещен в класс *Lobosea*, подкласс *Gymnamoebia*, отряд *Amoebia*, подотряд *Blastocystina*.

В России протозойная природа *Blastocystis* была подтверждена исследованиями Л.М. Беловой [4]. С небольшими поправками автор приняла классификацию С. Н. Zierdt. Таким образом, до 1988 года бластоцисты относились к амебам. Позднее систематическая иерархия простейших многократно подвергалась пересмотру и изменениям.

Понятие *Protista* было введено Геккелем в 1866 году для большой группы организмов. Он поместил в протисты прокариоты, протозоа, водоросли, низшие грибы и некоторых низших многоклеточных. С тех пор представление о протистах неоднократно менялось. В современном представлении протисты (*Protista*) - парафилетическая гетерогенная группа эукариот, не имеющая статуса таксона.

Применение современных методов исследования показало, что многие традиционные таксоны полифилетичны и часто пересекаются, поэтому систематическое положение многих групп по-прежнему неоднозначно. Так, в 1996 году на основании анализа полной последовательности гена кодирующего малую субъединицу рибосомальной РНК, была установлена принадлежность бластоцист к *Stramenopiles* [122], а систематическое положение бластоциста на сегодняшний день выглядит так:

Домен – *Eucariota*, царство – *Chromista*, инфрацарство – *Stramenopiles* или *Heteroconta*, подцарство - *Chromobiota*, класс – *Blastocystea*, отряд – *Blastocystida*, семейство *Blastocystidae*, подрод – *Opalinata*, род – *Blastocystis*.

В этой системе ближайшими родственниками бластоцист оказались свободноживущие морские бурые, золотистые и диатомовые водоросли, а также фитопланктон. Таким образом, бластоцист – уникальный организм, относящийся к ранней ветви эволюции протист, отделившийся от главного ствола и освоивший новую среду обитания в анаэробных условиях. Возможно в этом причина трудностей в изучении и понимании его ультраструктуры, биохимии, метаболизма, обилия генотипов и фенотипов. Положение о том, что бластоцист – протиста, но не протозоа всегда следует иметь в виду при его изучении и, особенно при интерпретации полученных результатов. Род *Blastocystis* – единственно известный на сегодняшний день представитель царства *Stramenopiles*, паразитирующий в организме человека.

Данные молекулярно-генетических исследований изолятов *Blastocystis* человека и животных показали не только генетическое разнообразие изолятов паразита от одних и тех же хозяев, но также и генетическое их сходство от разных хозяев [97, 111, 129, 130, 154].

На сегодняшний день известно 17 генотипов, (субтипов) бластоцист. Установлено, что в организме человека встречаются субтипы с первого по девятый (ST1-ST9), при этом третий субтип считается преимущественно антропонозным, а остальные зоонозными [153]. Ранее существовавшее мнение о видоспецифическом паразитизме *Blastocystis* оказалось неверным. Учитывая эти факты, ученые в 2007

г. приняли решение отказаться от вида *hominis*, именовать организм *Blastocystis species* и использовать только такое обозначение во всех публикациях [126].

Возможно, необычное происхождение бластоцист объясняет его уникальную способность к полиморфизму, поскольку до настоящего времени нет единого мнения о числе его морфотипов. Наиболее изучены и признаны большинством исследователей вакуолярная, гранулярная, амебоидная и цистная формы [39].

Вакуолярная форма (ВАФ) – наиболее типичная, часто встречающаяся в образцах стула и культуре. Диагностика чаще всего осуществляется на основании находок именно этой формы. Она очень вариабельна по размерам, очертаниям, окраске. ВАФ как правило круглая или овальная, размеры ее варьируют от 2 до 200 мкм, средний диаметр клеток обычно 10 - 15 мкм. Центральная вакуоль (центральное тело) может занимать до 90% объема клетки и содержит блестящий гранулярный или хлопьевидный материал различной электронной плотности, распределяющийся неравномерно по всей вакуоли. Этот материал, по-видимому, выполняет функцию накопления запасов. В полоске периферической цитоплазмы находятся ядра (2-4) и органеллы: митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи [27, 98, 131, 133].

Гранулярная форма (ГРАФ) предположительно происходит от ВАФ под воздействием различных факторов, например, увеличение концентрации сыворотки в питательной среде в процессе аксенизации [131]. Зернистые формы, часто немного больше, чем средняя вакуолярная клетка диаметром от 10 до 60 мкм. Морфология ВАФ и ГРАФ похожа за исключением наличия гранул в центральной вакуоли (ЦВ). Состав гранул различен: миелоподобные включения, жировые капли, пузырьки, кристаллы.

Амебоидная форма (АМФ) встречается редко. Описания ее морфологии противоречивы и не всегда достоверны [134, 158]. В недавней работе Tan & Suresh [135] описали в культуре *in vitro* наличие двух морфотипов данной формы. Клетки имеют размер от 2,6 до 7,8 мкм в диаметре и псевдоподию лобоидного типа (широкую). Одни имели большую ЦВ, целиком заполненную мелкими электронноплотными гранулами. В других обнаруживались множественные

небольшие вакуоли. Цитоплазма содержала скрученные нити с гранулами. Эта структура морфологически была очень сходна с ЭР, который отвечает за синтез белка в клетке. Поверхностный слой АМФ имел необычную и неравномерную толщину. Предполагается, что АМФ - промежуточная стадия между вакуолярной и цистой и что энергетические запасы обеспечивают процесс инцистирования [123]. При окраске АМФ акридиновым оранжевым обнаружена высокая концентрация в цитоплазме РНК, отвечающей за синтез белков. С. Н. Tan & K. Suresh [135] обнаружили интересный факт: АМФ появлялись только в культурах, изолированных от пациентов с диареей, и могли достигать 28% от общего количества клеток.

Цистная форма (ЦИФ) бластоцист впервые была обнаружена в свежих фекалиях больного СПИДом [89]. Такое позднее обнаружение цист объясняется не только очень мелкими размерами 3 - 5 мкм, но и внешним видом цист, сходным с фекальным детритом. Кроме того, эта форма редко встречается в культуре. ЦИФ – округлой или овальной формы, защищены многослойной оболочкой. В цитоплазме имеются 1-4 ядра, множественные вакуоли, запасы гликогена. Цисты окружены рыхлым фибриллярным слоем, который, по-видимому, сбрасывается при созревании [156]. Была показана высокая резистентность цист к физическим факторам: осмотическому шоку, понижению температуры до комнатной [93]. Устойчивость ЦИФ к факторам внешней среды позволило предположить, что эта стадия участвует в трансмиссии возбудителя во внешней среде. Эта гипотеза была экспериментально подтверждена. К. Suresh et al. в 1994г. , а позднее К. Мое и Chen et al. в 1997 г. удалось перорально заразить лабораторных крыс. При кратковременном культивировании *B. hominis* и *B. ratti* соответственно, обнаружили превращение ЦИФ в ВАФ в пределах 24 часов. Через час после инициации культуры ЦИФ еще сохраняли типичную морфологию. Через 3 часа развивались множественные вакуоли с включениями. В этот процесс вовлекалась вся цитоплазма. ЦИФ постепенно теряли оболочки, которые через 6 часов замещались толстым поверхностным слоем. Эта дезинтеграция увеличивала размер клеток до 7 - 9 мкм к 9 часам культивирования. Постепенно происходила

агрегация вакуолей в центральное тело, а через 12 часов ЦИФ превращались в типичные ВАФ или ГРАФ, которые подвергались бинарному делению. Иногда цистная оболочка сохранялась, и в пределах одной особи наблюдалось до 4-х дочерних.

Авакуолярная форма (АВФ). Этот морфотип был впервые обнаружен в биопсийном материале при колоноскопии. АВФ существенно отличались от ВАФ и ГРАФ, но были сходны с таковыми, полученными из жидкого стула больного [162]. Они были названы авакуолярными формами (АВФ) из-за отсутствия центральной вакуоли. Организмы были очень мелкими (~ 5мкм) и не имели поверхностного слоя так же, как и амебоидные клетки. АВФ не пригодна для культивирования.

Мультивакуолярная форма. Некоторые авторы подтверждают также существование мультивакуолярных форм (МВФ), полученных из свежего фекального материала [27, 131]. Мультивакуолярные клетки меньше вакуолярных или зернистых форм (5-8 мкм), их цитоплазма содержит множество небольших вакуолей, варьирующих в размерах и содержимом. Клетки имеют толстый поверхностный слой.

Другие морфоформы. Некоторые авторы считают, что существуют и другие морфотипы бластоцист: «гигантские» клетки [123], кластеры – скопление мелких клеток или мешки, размером до 70 мкм, содержащие потомство и сохраняющие оболочку. С. Н. Zierdt [158] описал подобные клетки как «шизонты», происходящие от ГРАФ. Было отмечено, что физические (осмотическое давление, лекарства и др.) и метаболические факторы могут влиять на морфологию *Blastocystis* как *in vivo*, так и *in vitro* [161].

Взаимоотношение и связь между морфотипами до сих пор не ясна. Следует также отметить, что большинство авторов признают существование морфотипов, подтвержденное исследованиями ультраструктуры.

1.2. Основные схемы жизненного цикла и вопросы эпидемиологии

До сегодняшнего дня остается открытым вопрос о жизненном цикле (ЖЦ) паразита. Предложены различные схемы развития *Blastocystis* и эти расхождения обусловлены во многом тем, что нет единого мнения о способах размножения и трансмиссии бластоциста. Все предложенные модели носят гипотетический характер.

Впервые модель жизненного цикла бластоцистов описал С. Н. Zierdt et al. в 1973 г.[160] (рисунок 1.2.1). Предложенная схема демонстрирует, что вакуолярная форма (ВАФ) дифференцируется или в зернистую форму, впоследствии снова производя вакуолярные формы, или в амeboидную форму (АМФ), которая может давать начало вакуолярным формам путем почкования.

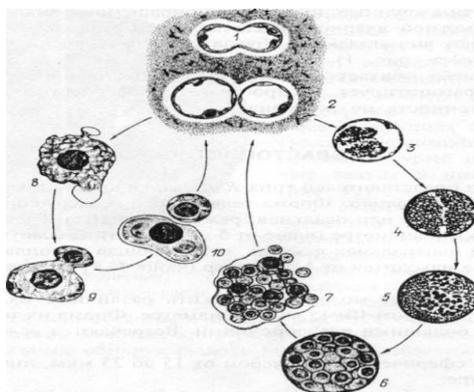


Рисунок 1.2.1. Схема жизненного цикла *B. hominis* (Zierdt С.Н., 1973)

1- вакуолярная стадия в процессе деления; 2- вакуолярная стадия после деления; 3-7 – предположительное развитие гранулярных стадий из вакуолярных; 8-10 – формирование дочерних клеток, предположительно вакуолярных форм из амeбных.

Другой вариант ЖЦ возбудителя предложен в 1992г. нашей соотечественницей Л. М Беловой (рисунок 1.2.2), которая много лет посвятила изучению бластоцист животных и человека [4]. Автор считает стадией расселения одноядерных амeбок (1), которые образуются в результате деления многоядерного плазмодия (2). Амeбки, попав в кишечник хозяина, дают начало плазмодию и этот

процесс многократно повторяется. Процесс бесполого (агамного) размножения автор называет стадией накопления.

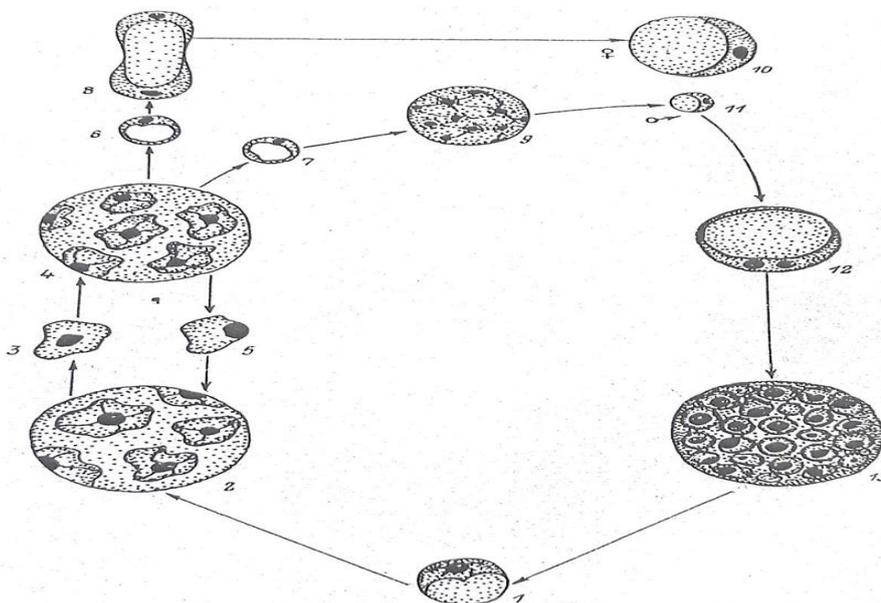


Рисунок 1.2.2. Схема жизненного цикла *Blastocystis* (Л.М Белова, 1992)

1 – расселительная стадия; 2, 4 – многоядерные плазмодии; 3,5 – трофозоиты; 6, 8 – макрогаметоциты; 7, 9 – микрогаметоциты; 10 – макрогамета; 11 – микрогамета; 12 – зигота; 13 – созревшие расселительные стадии.

Еще один вариант ЖЦ паразита предложили М. Singh & К. Suresh в 1995 г. (рисунок 1.2.3) [123]. На основании данных литературы и собственных исследований морфологии и биохимии морфотипов бластоцист, ученые постулировали следующие положения. Вакуолярная форма (4) дает начало двум различным схемам инфекции и играет ключевую роль в рождении потомства: амeboидных (5b) и мультивакуолярных форм (5a) (МВФ). Предцистная форма (6a) подвергается шизогонии и преобразуется в тонкостенные цисты (7a), которые рожают множество мелких ВАФ. Это путь аутосуперинфекции в организме хозяина. Для внешней трансмиссии ВАФ конвертируются в АМФ (5b), которая путем деления превращается в прецистную форму (6b), а последняя путем шизогонии производит толстостенные цисты (7b), ответственные за выживание во

внешней среде и последующее распространение инфекции фекально - оральным путем.

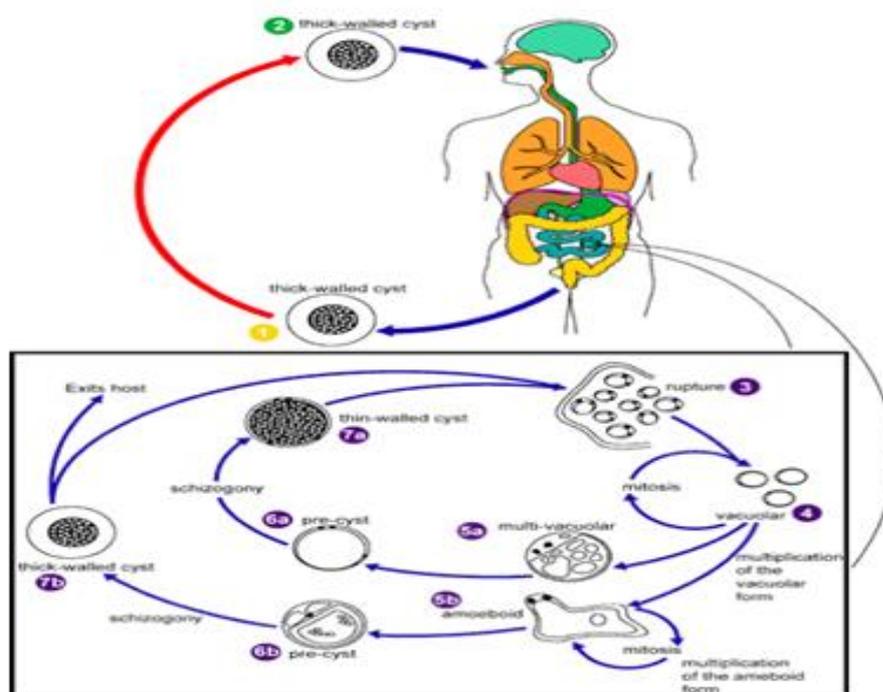


Рисунок 1.2.3. Схема жизненного цикла *Blastocystis* (Singh & Suresh , 1995)

Stenzel D.J. & Boreham P.F. [131] в 1996 г. отнесли критически к модели Singh & Suresh, поскольку та не соответствовала данным по морфологии, полученным многими исследователями ранее. Авторы также не приняли положение о шизогонии, эндодиогении, спорогонии, считая доказательным размножение бластоцистов только бинарным делением. Так, признаваемая большинством исследователей гранулярная форма в модели Singh M. et. al. отсутствует (рисунок 1.2.4). Stenzel D.J. & Boreham P.F. на основании своих, и данных других авторов, предложили еще один вариант жизненного цикла. По их мнению, в кишечнике человека присутствует мелкая АВФ с поверхностным слоем. По мере прохождения по кишечнику она преобразуется в МВФ, окруженную толстым поверхностным слоем. Далее МВФ теряет свой поверхностный слой и превращается в ЦИФ. С меньшей уверенностью авторы рассматривают превращение АВФ в АМФ, на основании сходства морфологических особенностей. По мнению авторов, в культурах МВФ дает начало ВАФ путем увеличения и

смещения мелких вакуолей в одну большую. Однако этот вариант не включает АМФ и игнорирует существование ГРАФ.

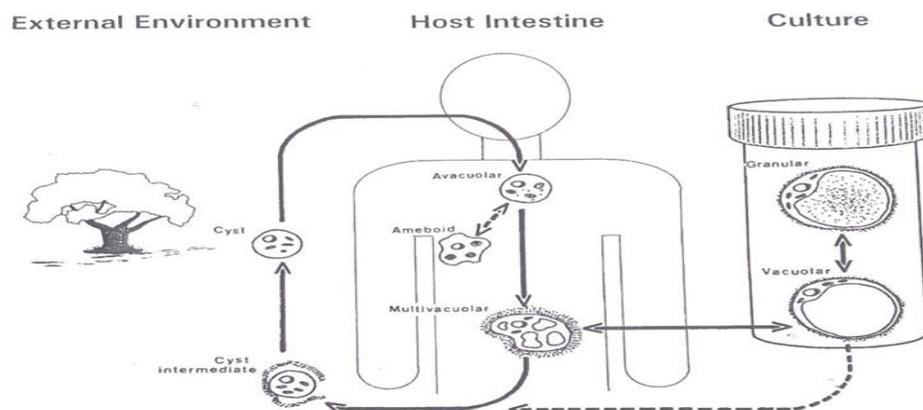


Рисунок 1.2.4. Схема жизненного цикла *Blastocystis* (Stenzel D.J. & Boreham P.F. в 1996)

В настоящее время, однако, большинство авторов склоняются к признанию цистной формы как инфективной стадии переживания и расселения во внешней среде [151]. По аналогии с эпидпроцессом при других протозоозах кишечника, в настоящее время в качестве основных звеньев эпидпроцесса рассматриваются фекально-оральный механизм передачи и водный путь заражения [1, 55]. Некоторые авторы [55, 102] предполагают также возможность контактного пути передачи: от человека к человеку и от животного к человеку [53]. Первое положение подтверждается недавними исследованиями, проведенными в г. Санкт-Петербург [2]. На основании данных изучения семейных очагов инфекции, обнаружение бластоцист на предметах обихода и равномерной инфицированности в очагах Санкт-Петербурга и Чукотского АО автор считает основным контактно-бытовой путь передачи. Передача от животных к человеку подтверждается данными высокой инфицированности бластоцистами лиц, работающих в зоопарках и на фермах [103, 116].

Получение реальных данных зараженности *Blastocystis* и географического распространения возбудителя затрудняет отсутствие четких стандартизованных методов лабораторной идентификации паразита при их многообразии. Общеизвестно, что большинство врачей - микроскопистов определяют главным

образом крупные ВАФ и ГРАФ. Но даже учитывая реально заниженные данные зараженности, паразит встречается примерно у 1 миллиарда жителей земли [55] варьируя в численном выражении от 0, 5% до 70%. С. R. Stensvold et al. считают, что каждый четвертый житель Земли инфицирован бластоцистами [128]. Они обнаруживаются почти у каждого вида – представителей животного царства [134].

На территории РФ в настоящее время инфекция, вызванная *Blastocystis*, не подлежит регистрации и не входит в формы государственной статистической отчетности. Однако медики начинают об этом задумываться. Так, в разделе практических предложений своей диссертации Азаров Д.В. [2] предлагает включить инфекцию, вызванную бластоцистами в список нозоформ, подлежащих регистрации.

Немногочисленные исследования, проведенные в различных регионах России, относятся к концу прошлого и началу нынешнего столетия. Так, в г. Омск находки *Blastocystis* в 1999–2001 гг. составили 0,9 – 2,3% [34], в Перми – 13,1% [14]. Обследование детских коллективов в Москве, выполненное специалистами-паразитологами методом ФЭО, позволило обнаружить очень высокий уровень инфицированности у детей-беспризорников (43,9%), несколько ниже - у детей из дома ребенка (18,7%) и у детей, посещающих детский сад - 3,3% [12]. По данным КДЛ ИМПТиТЗ им. Е.И.Марциновского Сеченовского Университета, также применяющей ФЭО, инфицированность пациентов 2014-2016 гг. (в основном жителей Москвы и Подмосковья) варьировала в пределах 16-23% [26]. В Санкт-Петербурге обследовались на бластоцисты несколько групп населения с жалобами со стороны ЖКТ, крапивницей, а также иммунокомпрометированные пациенты. Данные инфицированности варьировали от 7,8% до 30,4 %, причем максимальные показатели были в группе пациентов с крапивницей [2].

Зараженность человека бластоцистами различна в разных странах и имеет районированный характер внутри страны [78, 87]. Как упоминалось выше, в развитых странах отмечается низкий уровень инфицированности: Сингапур (3,3%), Япония (от 0,5 до 1,5%) и высокий уровень в развивающихся странах: Бразилия (41%) [86], Индонезия (60%), Египет (33,3%) [112]. Высокая распространенность

бласти в развивающихся странах объясняется низким уровнем гигиены и санитарии, потреблением загрязненной воды и/или пищи. Уровень зараженности коррелирует с употреблением не соответствующей стандартам питьевой воды, в которой цисты могут сохранять жизнеспособность от 19 дней до одного месяца [157].

Значительно больше интерес исследователей привлекают вопросы географического распространения субтипов бластоцист. Отсутствие единого мнения о патогенном статусе паразита, а также современная доступность молекулярно-генетических методов исследования в том числе на рутинном уровне, объясняет поток исследований в разных странах по определению субтипов. Распространённость субтипов варьирует в разных странах и в пределах страны. В России генетический профиль паразита определен в работе Сигидаева А.С. у жителей г. Санкт-Петербург [32]. У взрослых в подавляющем большинстве (75,3%) определены СТ 1, 5 и 6, СТ 3 встречался в 25% случаев. СТ 2, 4 и 7 не определены ни в одном случае. При обследовании детей наиболее часто определялся СТ 3 – 62%, а СТ – 5 и 6 не были выявлены. В летние месяцы (июль, август) наблюдался пик выявляемости бластоцист у людей без сопутствующей патологии, что, по мнению автора, связано с миграционными процессами, большим потреблением воды, фруктов и овощей, а также контактами с почвой. В 2018 г [2] данные по г. Санкт-Петербург были скорректированы после применения более специфичных и чувствительных методов ПЦР-субтипирования и секвенирования. Было показано, что на территории Санкт-Петербурга и Чукотского АО циркулируют 5 субтипов: СТ 1- СТ 4 и СТ7. Показатели зараженности не зависели от сезона. Преобладали антропонозные 1 – 3 субтипы.

Исследования зарубежных авторов [134, 153], проведенные методом генотипирования изолятов на большом материале из Пакистана, Японии, Бангладеш, Таиланда и Германии показали преобладание ST 3 – 41,7 - 92,3%. ST 1 обнаруживался в 7.7 – 25.0% случаев и ST 4 – в 10.0 – 22.9%. ST 2, 5 и 7 редко выявляли среди изолятов из Японии и Германии, ST 6 не обнаруживался вообще.

Таким образом, ST 1 и 3 являются преобладающими в глобальной структуре данного возбудителя [43].

В 2008 году *Blastocystis spp.* были включены в программу Всемирной Организации Здравоохранения в области санитарии и здравоохранения [72, 145] как организмы, передающиеся с водой.

1.3. Патогенный потенциал паразита

Большинство авторов констатируют, что у подавляющей части пациентов (80-90%) бластоцистная инфекция протекает бессимптомно [50, 118, 128]. Увеличение доли манифестных случаев при столь широком его распространении стало бы серьезной проблемой здравоохранения. Однако имеются клинические и экспериментальные данные, доказывающие наличие патогенного потенциала *Blastocystis* [90, 94, 107]. Изучение возможностей и условий его реализации имеет огромное научное и практическое значение.

При инфекции, вызванной бластоцистами, нет специфических симптомов. Основные проявления регистрируются со стороны ЖКТ: диарея разной степени тяжести, тошнота, рвота, метеоризм, слабость, потеря аппетита и веса. Отмечаются также дерматологические симптомы, характерные для аллергии: крапивница, сыпь, зуд, отеки, умеренная эозинофилия [15]. К настоящему времени накоплен большой материал по клинике бластоцистной инфекции, расшифрованы некоторые механизмы патологического процесса. Однако четких критериев и определений категории «носительство – заболевание» по-прежнему не предложено [140].

Диагностические лаборатории и практикующие врачи должны опираться на определенные алгоритмы для решения вопроса о носительстве или болезни и выборе дальнейшей тактики.

Наиболее логичным и доступным является количественный критерий интенсивности инфекции [144]. Многочисленные сообщения 1908 - 1930-х годов рассматривали бластоцист в качестве возможной причины расстройств функций ЖКТ [66]. Впервые в 1917 году Wenyon и O'Connor обнаружили бластоцисты в

фекалиях 25% больных с острой диареей и связали этот факт с наличием большого количества клеток паразита в пробах обследованных.

В последующие годы аналогичную мысль развил Zierdt С. Н. [159], наблюдая прямую зависимость между клиническими проявлениями инфекции и числом бластоцист в кале. Наличие более 5 клеток в поле зрения при увеличении в 100 раз (>5 кл. в п. зр. x100) приводит к «некоторой степени дискомфорта и диарреи». В дальнейшем, основываясь на его мнении, авторы полагали, что бластоцисты могут быть причиной диарреи [142].

Ретроспективный обзор Kain с соавт. был выполнен на основе клинико – диагностического наблюдения за 2 группами обследованных (100 и 50 чел), в т. ч. недавно вернувшихся из тропиков (57%). Авторы также пришли к выводу, что наличие бластоцист (>5 кл. в п. зр. x100) в исследуемых пробах коррелирует с острыми проявлениями инфекции [80].

Sheehan и др., [121] для оценки клинического значения бластоцист исследовали 389 образцов фекалий пациентов на наличие простейших. У 43 из 62 инфицированных лиц были обнаружены бластоцисты (>5 кл. в п. зр. x40). Следует отметить, что в этой группе 19 пациентов имели симптомы расстройств ЖКТ длительностью от месяца до года. Среди оставшихся 19 инфицированных бластоцистами лиц с низким числом клеток (< 5 кл. в п. зр. x40) симптомы расстройств ЖКТ не наблюдались.

Однако Doyle с соавт. [65] высказывали иное мнение. Сомнение связано не столько с позицией о пороговом числе бластоцист при проявлении расстройств ЖКТ, сколько с достоверными наблюдениями феномена интенсивности инфекции у практически здоровых лиц - бессимптомных носителей инфекции.

Другие авторы [81, 102, 131, 135] связывают наличие патогенного потенциала бластоцист с определенным морфотипом, а именно – с находками в стуле амебоидных форм. Авторы показали, что в краткосрочных культурах изоляты, полученные от больных с диареей через 48-96 часов в 48 % были представлены амебоидными формами, чего не наблюдалось в культурах от бессимптомных носителей. Установление связи амебоидной формы бластоцист с вирулентностью

паразита позволяет этот морфотип рассматривать в качестве критерия клинически выраженной инфекции.

С развитием молекулярно-генетических методов исследований появились работы, демонстрирующие корреляцию между принадлежностью *Blastocystis* к определённому субтипу и наличием клинических проявлений у хозяина. Результаты, приводимые авторами, из различных исследовательских лабораторий не совпадают. Так, субтипы 2 и 3 исследователи относили к носителям патогенного потенциала [81], другие авторы обнаружили патогенные свойства 1, 4 и 7 субтипов [64, 125]. Однако четкой корреляции между субтипом и патогенностью паразита на сегодняшний день не выявлено. Разнообразие симптомов и тяжести клинических проявлений многие исследователи связывают с возможной генетической дивергенцией субтипов [74, 96]. Результаты исследований на молекулярном уровне неоднозначны, противоречивы, вероятно, из-за смешивания субтипов, а также генетической и патобиологической дивергенции внутри субтипов [59, 92]. Имеет также значение выбор конкретной методики молекулярно-генетических исследований [2].

Увлечение исследованиями генома ST с целью поиска маркера патогенности оставляли на втором плане изучение фенотипических особенностей бластоцист. Исследования этого плана немногочисленны и относятся к последним годам [55, 106]. Авторы изучали фенотипические особенности изолятов ST 3 с манифестной инфекцией и без симптомов. Было отмечено, что в условиях поликсенической культуры изоляты имели разные профили роста, различное время генерации, диаметры клеток одного морфотипа, наличие/отсутствие поверхностного слоя, восприятие краски и др. Данные о влиянии среды (рН, осмос, микробиота) на фенотип *Blastocystis* отметили также Vargas-Sanchez et al. [143]. Авторы полагают, что этот феномен необходим для адаптации и выживания организма.

Возможность бластоцист вызывать патогенные проявления были показаны в эксперименте на мышах и морских свинках-гнотобионтах [107]. У морских свинок, зараженных бластоцистами перорально и интрацекально, развивалась водянистая

диарея, продолжавшаяся до недели. Микроскопически выявлена умеренная гиперемия слизистой кишечника без видимых повреждений.

Аналогичные данные были получены К.Т. Мое et.al. в 1997 году. Микроскопически обнаружена инфильтрация слизистой, подслизистой и *lamina propria* вакуолярными формами бластоцист [94].

Вместе с тем результаты исследований, полученные *in vitro*, и клинические данные неоднозначны. Так, на культурах тканей показаны цитопатические и провоспалительные эффекты культур бластоцист, хотя инфекция, вызванная *Blastocystis* чаще всего проявляется симптомами со стороны ЖКТ [82], однозначной причинно-следственной связи не выявлено. Имеются работы [71, 149], подтверждающие возможную роль бластоцист в этиологии синдрома раздраженного кишечника (СРК). Для СРК характерно наличие многообразной симптоматики при отсутствии или бедности морфологических изменений. R. Hussin et al. [76] обнаружили, что в сыворотке крови от СРК-пациентов отмечен более высокий уровень IgG-антител к бластоцистам, при сравнении с таковыми у здоровых лиц. Однако при этом не была доказана связь СРК с бластоцистами. К настоящему времени получены также данные о биохимических механизмах индуцирования СРК бластоцистами. Показано, что повреждение эпителиального барьера при СРК происходит при активации протеиназа-активированных рецепторов - PAR [52]. Другие авторы [54] обнаружили, что цистеин-протеазы бластоцист увеличивают проницаемость кишечного эпителия, путем модулирования комплекса клеточного барьера (tight junction complex). У *Blastocystis*, изолированных от пациентов с СРК, была обнаружена более высокая активность протеаз [92, 98], а изучение генома бластоцист обнаружило способность возбудителя секретировать не менее 22 протеаз [61]. Все эти данные поддерживают гипотезу о важной роли протеаз бластоцист в нарушении эпителиального барьера и индуцировании СРК.

Как уже упоминалось, многие авторы считают, что инвазивные повреждения не характерны для бластоцист, а их проявления носят опосредованный характер. При реализации сложных взаимоотношений макро- и микроорганизмов огромную

роль играют защитные реакции хозяина и состав его микробиоты (микробиома)[19, 23].

Микробиота человека в современном представлении – главный первичный защитный барьер иммунитета, а кишечник рассматривается как орган иммунной системы. Так, суммарная масса бактерий ЖКТ содержит 80% всех иммуноглобулинов и 10^6 лимфоцитов в 1г лимфоидной ткани. Иммунный статус человека во многом определяется стабильностью и «здоровьем» микробиоты [5, 6, 33]. Изучение клиники и патогенеза при инфекциях – это фактически рассмотрение взаимоотношений макро- и микроорганизма. При этом огромную роль играют защитные реакции хозяина, однако лишь немногие исследования бластоцистной инфекции обращают внимание на эту взаимосвязь. Так, ряд авторов отмечают, что у инфицированных бластоцистами людей снижается количественное содержание облигатно-анаэробных бактерий (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Esherichia coli* др.) и изменяется состав условно-патогенных микроорганизмов (*Clostridium spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, грибы рода *Candida* и др. [18, 33].

Течение острых кишечных инфекций (в данном случае острая дизентерия Флекснера и неverified диарейные инфекции) в сочетании с *Blastocystis* характеризуются более продолжительным синдромом общей интоксикации и лихорадкой, более выражены симптомы острого колита. Косвенным признаком участия *Blastocystis* в инфекционном процессе при острых кишечных диарейных инфекциях может служить наличие эозинофилии [15].

Клиническая картина хронического гепатита С (ХГС) в сочетании с *Blastocystis* (33%), характеризуется более выраженным синдромом ЖКТ-расстройств, преимущественно с поражением толстой кишки с проявлениями гемоколита. Отмечено, что важным признаком участия бластоцист в инфекционном процессе при ХГС является эозинофилия, уровень которой коррелирует с интенсивностью бластоцистной инфекции. У больных ХГС при коинфекции с *Blastocystis* наблюдаются выраженные дисбиотические нарушения в толстом кишечнике. Это проявляется снижением количества облигатной

микробиоты на фоне увеличения частоты встречаемости условно-патогенных микроорганизмов [31].

На сегодняшний день имеется много работ, показывающих причинно-следственную связь между инфекцией, вызванной бластоцистами, и кожными проявлениями при крапивнице, псориазе, экземе и др [38, 48, 68, 73, 104, 141, 164]. Частота встречаемости *Blastocystis* при псориазе составляет 76,9%, тогда как у людей без кожных высыпаний этот показатель не превышал 7% [9]. При экземе частота обнаружения бластоцист в кишечнике пациентов составила 73,3%, в то время как у людей без кожных поражений этот показатель не превышал 5% [7]. Объясняя эту связь, авторы предлагают различные механизмы. Так, Tan et al [132] объясняют дерматологические симптомы нарушением иммунитета: *Blastocystis* активируют анафилотоксины C3a и C5a, а это в свою очередь ведет к высвобождению гистамина и в последующем - к кожным проявлениям. Отмечается также зависимость кожных проявлений от особенностей фенотипа бластоцист, а именно связь клиники с амебодной формой паразита. Другая группа исследователей считает, что дерматологические симптомы характерны для носителей субтипа 3 [81].

Многие авторы отмечают, что *Blastocystis* ведет себя как оппортунистический организм, инфицируя чаще иммунокомпрометированные группы пациентов [91]. Так, к группе риска относятся ВИЧ-СПИД-инфицированные контингенты. У них отмечена более высокая частота симптомов со стороны ЖКТ, а также более высокий риск диссеминации инфекции [16]. У ВИЧ-инфицированных пациентов с коинфекцией *Blastocystis* наиболее часто обнаруживаются бластоцисты субтипа 3 [136]. Показан также высокий уровень выявления *Blastocystis* у лиц с ослабленным иммунитетом: у больных туберкулезом и у онкологических больных [10, 16, 35, 41, 138]. Исследованиями Н.А Ильиной в 2005 г. установлено, что при экспериментальной инфекции, вызванной бластоцистами, у кроликов снижены показатели Т-клеточного иммунитета, а именно преимущественно угнетение Т-хелперного звена, в сфере гуморального

ответа отмечено угнетение генеза IgG, что можно расценивать как форму иммунодефицита [11].

В настоящее время накоплены немногочисленные данные о достоверно диагностированных случаях инвазивной инфекции *Blastocystis spp.*, т.е. тканевом кишечном или внекишечном бластоцистозе [3, 18, 24].

Обращает внимание разнообразие локализации возбудителя (кишечник, селезенка, печень) и характера проявления инфекции (острая, вялотекущая, хроническая). При бластоцистной инфекции могут отмечаться диарея со слизью и кровью [33, 118] и боли в животе [117, 152]. Не менее важным аспектом инвазивного бластоцистоза является наличие у больных сопутствующих организмов: условно - патогенных бактерий (*Citrobacter amalonaticus* [33], *Clostridium difficile* [139]), гельминтов (*Schistosoma mansoni*) [155], простейших (*Entamoeba histolytica*) [134].

Следует подчеркнуть, что в одном из случаев находка *Blastocystis* в содержимом кист селезенки произошла спустя 3 года от начала развития процесса. При этом обнаруженные паразиты представляли разные морфоформы, что указывает на непрерывное развитие паразита. Хронически протекающий кишечный бластоцистоз под диагнозом «упорный СРК» возник как вторичная инфекция на фоне иммунной дисфункции в результате заболевания почек и шистосомоза [155].

Столь вариабельная частота выявлений *Blastocystis spp.*, при различных состояниях макроорганизма не дает четких указаний для формирования определенной концепции о роли бластоцист по отношению к организму хозяина. По-видимому, не существует микроорганизма, в отношении патогенной роли которого высказывались бы столь диаметрально противоположные мнения. Так, есть данные о колонизации бластоцистами брюшины (перитонеума) у пациента с инвазивной аденокарциномой [105, 146]. Этот случай подтверждают исследования другой группы авторов [84]. На основании экспериментальных данных по индуцированию канцерогенеза они рассматривают бластоцисты как патоген, отягощающий развитие процесса. Авторы считают бластоцисты маркером

дисбиоза, сопутствующим СРК и другим патологическим состояниям ЖКТ. В противоположность этим утверждениям, другие авторы полагают, что бластоцисты – комменсалы и маркеры здоровой микробиоты кишечника [46, 79, 113].

1.4. Лабораторная идентификация *Blastocystis spp.*

К настоящему времени предложен достаточно большой набор методов лабораторной диагностики *Blastocystis spp.* Сюда относятся рутинные методы идентификации простейших кишечника, прописанные в МУК [20], имеющиеся в арсенале каждой КДЛ, и разработанные в последние десятилетия специально для бластоцист иммунологические и молекулярно-генетические методы. Основой рутинной диагностики простейших кишечника является микроскопия, позволяющая выявлять систематические признаки простейших: размеры и форму клеток; строение оболочек и цитоплазмы; число, размеры и структуру ядер; наличие хроматидных телец и гликогена в цитоплазме. Несмотря на бурное развитие современных методов [29, 30, 47], первым необходимым (а иногда и достаточным) этапом исследования, остается микроскопия. Трудности диагностики простейших усугубляются, когда речь идет о бластоцистах. В предыдущих разделах упоминалось о феноменальных возможностях вариаций морфотипов *Blastocystis*, а также размеров, формы и деталей строения клетки в пределах одного морфотипа. Все это позволяет паразиту мимикрировать и быть иногда трудно отличимым от амёб: *E. histolytica/dispar*, *E. coli*, *E. nana*, *E. hartmanni*.

Дифференциальная диагностика «псевдоамёб» сложна, при этом необходимы опыт микроскописта, затраты времени и материальных ресурсов, которыми располагает не каждая КДЛ. Как правило не вызывает затруднений обнаружение крупных и средних размеров ВАФ и ГРАФ (до 200 мкм), мелкие ВАФ и ГРАФ (от 3 мкм), цисты, амёбоидные и другие мелкие морфоформы могут оставаться незамеченными.

Примером может служить опыт нескольких европейских референс-лабораторий в Швейцарии, Швеции, Италии, Великобритании и Германии по

перекрестному тестированию контрольных образцов кала, содержащих простейших кишечника. Пробы, фиксированные САФ (формалин, уксусная кислота, ацетат натрия) были обработаны методом формалин-эфирного осаждения (ФЭО). Многие европейские лаборатории имели в своем составе опытных специалистов-тропикологов. Результаты, в значительной степени, варьировали: из 48 проб, содержащих *Blastocystis*, специалисты европейских лабораторий обнаружили их в 29-38 случаях. Специалисты из Западной Африки (Кот Д'Ивуар), также участвовавшие в этом тестировании, обнаружили только 8 положительных проб [44]. К удивлению экспертов, ошибок при идентификации бластоцист было больше, чем для дизентерийной амебы.

Для первичной микроскопической диагностики возбудителей паразитозов в кале применяются методы обогащения (концентрации) путем осаждения или флотации. Метод формалин-эфирного обогащения – ФЭО общепризнан «золотым стандартом» [147]. Обработка проб кала, фиксированных консервантами Турдыева, САФ, МИФ, ПВА и др. методом ФЭО позволяет получить чистый прозрачный осадок, хорошую сохранность и визуализацию *Blastocystis* [40]. По ряду объективных причин, европейские лаборатории вынуждены отказываться от ФЭО. Это связано с мерами ограничения применения эфира (токсичное, взрывоопасное, наркотическое вещество). Однако рекомендуемые заменители эфира в качестве диссоциирующего вещества (этилацетат и очищенный бензин) дают мутноватые осадки, в которых простейшие визуализируются хуже.

Для дифференциальной диагностики необходим нефиксированный свежий кал. Начальным этапом является прямая микроскопия простого мазка с физраствором и 2% раствором Люголя при ув. x400 [40]. Как правило, этого бывает недостаточно, и каждая КДЛ выбирает несколько дополнительных диагностических методов, определяемых конкретными возможностями, материально-техническим обеспечением и профессиональной подготовкой персонала. Классическим методом дифференциальной диагностики считается приготовление окрашенных постоянных препаратов для последующей микроскопии. Наиболее стабильный систематический признак простейших –

строение ядра. Эти структуры позволяют выявить специальные фиксирующие смеси на основе ртути. Общеизвестно, что отличные результаты дает фиксация классической смесью Шаудинна (хлорид ртути, этанол, уксусная кислота, формалин). Фиксированные смесью Шаудинна препараты, окрашенные трихромом или железным гематоксилином по Гейденгайну считаются «золотым стандартом» цитологической диагностики [69, 70, 75]. При увеличении микроскопа $\times 400$ или $\times 1000$ хорошо выявляются внутренние структуры клетки (вакуоли, гликоген, ядра и др. включения), а также морфология ядер (глубки хроматина, размер и положение кариосомы). Однако токсичность ртути, требования к утилизации ртутьсодержащих соединений заставили многие лаборатории отказаться от использования сулемы. Были предложены фиксирующие смеси на основе сульфата меди или цинка [70]. Результаты окраски оказались приемлемы, хотя и уступали по ряду признаков классическому методу фиксации по Шаудинну.

В последние годы появились публикации [115], в которых авторы подвергают сомнению высокую диагностическую значимость ФЭО, выдвигая на первый план запуск короткоживущих культур *in vitro*. Многие исследователи бластоцист высоко оценивают и рекомендуют диагностическим лабораториям применять метод «быстрых культур». Для культуральной диагностики *Blastocystis* используются среды Jones's [35], Voeck and Drbohlav's [56, 57], в России применялась двухфазная питательная среда с коагулированным яичным белком и сывороткой, разработанная Беловой Л.М. [4, 8, 25,]. В ИМПТ и ТЗ им. Е.И. Марциновского бластоцисты (как и другие простейшие) культивируются на среде Павловой [8, 25, 26, 40]. Как упоминалось выше, в культурах от пациентов с диареей можно выявить амебоидные формы, являющиеся возможным маркером патогенного потенциала данного изолята. Помимо диагностической ценности, культура дает материал для изучения генетических характеристик изолятов *Blastocystis* и является базой для развития современных молекулярно-генетических (ПЦР), иммунологических методов исследования и диагностики. Однако метод культивирования трудоемок и требует специальной подготовки специалиста. Многие авторы выдвигают метод культивирования на первый план как наиболее

чувствительный и считают его едва ли не золотым стандартом [85]. Однако для культур *in vitro* необходимы специальные помещения или ламинары, среды, добавки, специально обученный персонал. Минимальное время, необходимое для успешной диагностики – 2 - 3 дня. При отрицательных результатах повторные исследования материала проводят на 4, 5 и 7-й дни [62]. Кроме того, в процессе адаптации изолята к культуре, может произойти элиминация некоторых морфотипов или даже видов простейших.

В современной диагностике инфекций широко применяются молекулярно-генетические методы, многие из которых стали рутинными в практике КДЛ. Впервые ПЦР для идентификации *Blastocystis* была применена в 2006 г. [36, 67, 124]. В приложении к бластоцистной инфекции экстракция ДНК для постановки ПЦР возможна из фекалий и из культур *in vitro*, выделенных из тех же образцов стула. Некоторые авторы считают использование фекалий как субстрата предпочтительнее, так как его можно применять и для изучения молекулярной эпидемиологии возбудителя [100]. Использование субтип-специфических праймеров позволяет дифференцировать более 7 основных субтипов *Blastocystis*. Авторами отмечена высокая чувствительность и специфичность методов, основанных на применении ПЦР- 100%, *in vitro*-89/100, окраска трихромом – 82/100, ФЭО – 50/100 [119]. Более сдержанно высказывается о ценности ПРЦ-диагностики бластоцист пионер применения этого метода к возбудителю S. R Stensvold [126]. Автор считает, что ПЦР незначительно более чувствительна, чем короткоживущие культуры *in vitro*.

Молекулярный подход к диагностике в области паразитологии в последнее время бурно развивается. Зарубежными авторами [83] была разработана мультиплексная ПЦР-система для определения групп паразитов и бактерий желудочно - кишечного тракта: NanoCHIP (Savyon Diagnostics, Ashdod, IL). Данная система применяется как скрининговый метод в рутинной работе диагностических лабораторий с большим потоком пациентов. Тест используется вместе с системой очистки ДНК MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics Ltd., Швейцария). Набор Nano-CHIP GIP обеспечивает определение 9 видов главных кишечных паразитов и

бактерий: *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Giardia sp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis spp.*

Было проведено сравнение Nano-CHIP GIP с традиционными методами обнаружения возбудителя: бактериальными посевами, ФЭО со специфическими красителями для *Cryptosporidium spp.*, *ELISA E. HISTOLYTICA 11 kit (Teshlab, Blacksburg, VA, USA)* для дифференциальной диагностики *Entamoeba histolytica / dispar*. В результате NanoCHIP® обнаружил 161 положительный образец всех патогенов, в то время как обычными методами было идентифицировано 124 образца. При комбинации традиционных методов и qPCR / секвенирование, выявление для большинства возбудителей составило 100% за исключением 98% для *Dientamoeba fragilis* и 95% для *Blastocystis*.

Из большого арсенала иммунологических методов для диагностики *Blastocystis* адаптированы только два диагностических набора. Первый поставляется израильской фирмой Savuon и работает на основе иммуноферментного анализа (Copro ELISA Blastocystis). Эти тесты поставляются в Россию и для их постановки можно использовать материал как фиксированный, так и нативный. В инструкции фирма приводит данные о высокой чувствительности и специфичности метода: 96,1/96,1. Тестирование Copro ELISA Blastocystis (в Российской номенклатуре ИФА) проведено сотрудниками фирмы-производителя и турецкими исследователями [62]. Предлагаемый набор оказался высоко чувствительным (82 – 92 %) и специфичным (86 – 87%) при сравнении в качестве референс-тестов с культивированием, РИФ и микроскопией простого мазка.

Тест-система на основе иммунофлуоресцентного метода (РИФ) разработана в США фирмой Antibodies Inc., Davis, California. Основной реактив – Blasto-Fluor – приготовлен на основе цельноклеточного АГ бластоциста ST 3. В РФ набор не поставляется. Турецкими учеными [63] в 2010 году была апробирована данная система в сравнении с несколькими методами: мазок осадка с раствором Люголя, культивирование и окрашивание методом трихром. Используя культуру как референс-метод, чувствительность мазка с раствором Люголя составила 36,7%,

окраски трихром -50%, РИФ - 86,7%. Позднее [62] авторы сравнили РИФ с мазком, окрашенным Люголем, культивированием и ПЦР. Культура была принята за референс - значение. При этом условии чувствительность и специфичность РИФ была 100%. Авторы отмечают трудоемкость культивирования и ПЦР-диагностики, а также отсутствие стандартизации последнего метода и рекомендуют РИФ как наиболее предпочтительный для диагностики бластоциста в рутинной практике КДЛ.

Резюмируя основные данные обзора, следует вспомнить прогноз авторов многих оригинальных работ по проблеме *Blastocystis*. Stensel & Boreham [131] считали, что в ближайшие десятилетия вряд ли будут решены ключевые вопросы бластоцистной инфекции. Ученые оказались правы: несмотря на применение современных технологий, бластоцисты по-прежнему остаются загадкой. Поиск решений ведется в основном на молекулярно-генетическом уровне. Однако этот поток исследований если не заводит в тупик, то и не проясняет ситуацию. Так, секвенирование изолятов ST 1, 4 и 7, выявило большую дивергенцию в отношении размера генома, содержания гуанин-цитозина (GC), числа интронов и генного контента [55]. Обнаружена также возможность реверса патогенных свойств изолятов субтипов [127]. В меньшей степени исследователи обращали внимание на фенотипические особенности возбудителя.

Группа ученых в 2012 г. [110] наметила основную стратегию исследований проблемы бластоцистной инфекции на ближайшие годы:

- дальнейшая разработка и оптимизация методов *in vitro*, протоколов аксенизации изолятов субтипов бластоцист, обнаружение и изучение новых молекулярных маркеров;

- разработка моделирования инфекции бластоциста *in vivo* с целью изучения его роли в патологии ЖКТ;

- дальнейшее изучение патогенности субтипов путем секвенирования цельного генома и других сравнительных геномных анализов, результаты которых можно использовать для прогнозирования вирулентности и патогенности;

-изучение возможных генетических реверсов и функциональной характеристики генов;

-изучение данных пациентов с синдромом раздраженного кишечника и инфицированием различными субтипами бластоцист;

-проведение полицентрических исследований по изучению чувствительности *Blastocystis* к химиотерапии с целью эрадикации инфекции;

-изучение роли бластоцист в дисбиозе и их взаимодействия с микробиомом кишечника.

Проведение данного исследования обусловлено необходимостью разработки и выбора доступных, эффективных методов диагностики, необходимых для идентификации *Blastocystis* в различных биоматериалах.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика исследования

Настоящее исследование – динамическое (по временным параметрам) и наблюдательное (наблюдательное), проводилось с января 2015 по декабрь 2018 года. Объект исследования, это эукариотный, одноклеточный паразитический организм – *Blastocystis spp.* Предмет исследования – нативный и/или фиксированный биоматериал (фекалии); цитологические препараты; мазки и постоянные окрашенные препараты из поликсенической культуры *in vitro*.

Дизайн исследования был одобрен на заседании Межвузовского Комитета по Этике № 04-18 от 11.04.2018 г.

В диссертационной работе представлены результаты исследования биологического материала на базе Клинико – диагностической лаборатории Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний имени Е.И Марциновского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Анкетирование пациентов проводилось по специально разработанной анкете, включающей вопросы, направленные на выявление клинических симптомов, возможно обусловленных наличием *Blastocystis* (диспептические расстройства, боль или дискомфорт в области живота, изменение частоты и/или консистенции стула, кожные высыпания и др.). Содержание анкеты приведено в приложении 1.

Материал для исследования собирали у пациентов, обратившихся в лабораторию по направлению врача и/или самостоятельно в течение 3-х лет с 2015 по 2018 гг. Объем исследований биоматериалов, использованных, в работе, подробно представлено в таблице 2.1.1.

Для ретроспективного анализа диагностики *Blastocystis* были проанализированы результаты (34838 исследований) КДЛ ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского за 5 лет с 2014 по 2018 гг.

Таблица 2.1.1. Объем исследований биоматериалов, выполненных различными методами

Метод исследования	Число обследованных пациентов	Количество исследований (препаратов)
Обогащение		
ФЭО	852	1001
«Parasep 108900»	100	300
Иммуноферментный анализ		
CoproELISA Blastocystis	122	122
Культивирование на среде Павловой	134	134
Окрашивание препаратов		
Трихром	83	750
Романовский - Гимза	83	750
Лейкодиф	83	750
Всего	1457	3807

С целью решения вопроса о клиническом значении количества клеток, в исследуемых пробах была сделана выборка за 2015 г. Из числа обратившихся пациентов были сформированы 2 группы добровольцев с целью наблюдения за динамикой выделения бластоцист. I группа - пациенты с расстройством ЖКТ и II группа - с симптомами аллергического характера. I группа состояла из 4 взрослых и 5 – ти детей. Во II группу входило 9 детей и 3 взрослых пациента. Всего за период наблюдения было изучено 105 препаратов: 45 от лиц I группы и 60 лиц от II группы.

На 134 диагностических посевах нативного материала на среду Павловой было проведено наблюдение за изолятами от инфицированных бластоцистами лиц с симптомами расстройств ЖКТ и/или бессимптомных носителей. По характеру клинических проявлений пациенты разделены на 5 групп:

1. Острые расстройства ЖКТ;
2. Хронические проявления расстройств ЖКТ;

3. Без жалоб на нарушения функции ЖКТ;
4. Аллергические проявления;
5. Без жалоб, обследование.

Для оценки диагностической эффективности тест- системы CoproELISA *Blastocystis* было исследовано 122 образца, содержащие возбудителей паразитозов и отрицательные пробы (рисунок 2.1.1.). В качестве референс – метода использовали модифицированный ФЭО.

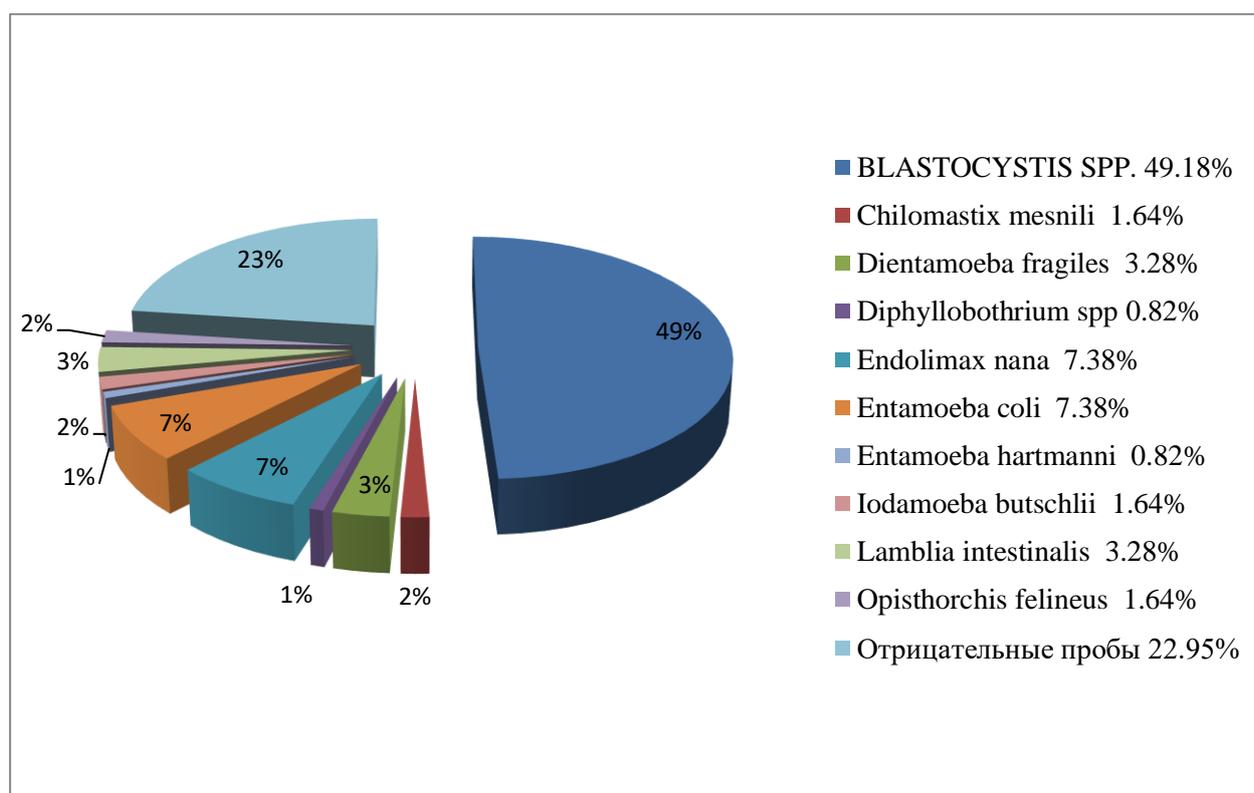


Рисунок 2.1.1. Характеристика проб, использованных при сравнительной оценке Copro ELISA и модифицированного ФЭО

При идентификации *Blastocystis* методами окрашивания препаратов было использовано 250 образцов нефиксированных фекалий. После микроскопии из биоматериала от одного пациента готовили и окрашивали по 3 мазка каждым методом: Романовского-Гимза, Трихром и Лейкодиф. Всего было исследовано 2250 окрашенных препаратов.

2.2. Сбор, транспортировка и хранение материала

В КДЛ ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского была разработана модификация

метода ФЭО, которая применяется с 2000 г. Материал для исследования пациенты собирали 3-хкратно (в течение трех дней при ежедневном стуле, при склонности к запорам интервал увеличивался) в контейнер с ложечкой объемом - 30 мл. Контейнер содержал 8 мл фиксирующей смеси Турдыева. Консервант был разработан в Институте для длительного хранения проб кала, содержащего простейшие (таблица 2.2.1.). В консерванте простейшие сохраняют морфологические особенности: размеры и форму клеток, структуру ядер и цитоплазмы, жгутики, реснички и др. выявляются не менее четко, чем в нативном препарате, что дает возможность устанавливать их видовую принадлежность. Для правильной фиксации и сохранности общий объем собранного материала не должен превышать 0.5 объема контейнера. Жидкий стул рекомендовали собирать однократно в количестве не менее 5 мл. Твердый кал необходимо было размять. Контейнер с собранным материалом или без него может храниться при комнатной температуре в темном месте до 3-х недель. Во время сбора кала пациентам не рекомендовали есть печень, грибы, сократить употребление фруктов, овощей, содержащих грубую клетчатку (бобовые, свекла, капуста и др.), также не принимать активированный уголь и другие сорбенты, и не использовать ректальные свечи на масляной основе. В случае лечения антибактериальными препаратами кал для исследования следовало начинать сбор спустя 7-10 дней после окончания приема препаратов.

Таблица 2.2.1. Состав консерванта Турдыева

Реагент	Количество реагента
NaNO ₂ (натрий азотистокислый)	1,6 г
Раствор Люголя - 2% (см.ниже)	80 мл
Глицерин	20 мл
Формалин концентрированный (37-40 %)	50 мл
Вода дистиллированная	до 1000 мл

При необходимости исследования нативного материала для окраски или посева на питательную среду *in vitro*, по нашей просьбе пациент доставлял в лабораторию образец кала не позднее двух часов после акта дефекации.

Для фотофиксации результатов была использована камера Левенгук серия СН 6 и система фото/видеофиксации на основе микроскопа Nikon 80i с контроллером DS-Fi1-U2.

2.3. Общие и специальные методы идентификации бластоцист

2.3.1. Метод формалин – эфирного осаждения (ФЭО)

При работе с эфиром используется только полипропиленовая пластиковая посуда. Содержимое контейнера с консервантом тщательно встряхивали; на полипропиленовые воронки помещали 2 слоя марли; фильтровали не менее 8 мл суспензии из контейнера (если объем фильтрата был меньше, добавляли 0.9% NaCl до 8 мл); затем доливали 2 мл эфира и закрывали герметичной пробкой, встряхивали пробирку не менее 30 секунд и центрифугировали в режиме 2 000 оборотов в течение 1 минуты.

После центрифугирования образуются 4 слоя (сверху – вниз): 1) эфир с растворенными жирами; 2) «пробка»: коагулированный белок + фекальный детрит; 3) консервант и 4) осадок. Пробирку декантировали, осадок тщательно суспендировали и 100мкл помещали на предметное стекло с каплей 2%-го раствора Люголя (таблица 2.3.1.1). Микроскопировали сначала при ув. x100, затем переходили на большое ув. x400.

Таблица 2.3.1.1. Состав 2 % -го раствора Люголя

Реагент	Количество реагента
Йод кристаллический	20,0 гр
Калий йодид	40,0 гр
Вода дистиллированная	до 1000 мл

2.3.2. Метод концентрации «Mini Parasep® 108900» (Aparcor, England)

Концентраторы Parasep широко используются в России и в мире. Модель 108900 выгодно отличается от предыдущих. Метод не требует применения этилацетата, очистка биоматериала осуществляется только за счет модернизированного фильтра. Концентраторы Parasep по инструкции

производителя рассчитаны на использование нативного кала. Мы впервые адаптировали этот метод для кала, фиксированного в консерванте Турдыева. В пробирку, содержащую фиксирующий раствор (10% забуференный формалин), вносили 1мл суспензии кала, тщательно перемешивали. Затем объединяли с конической насадкой, содержащей фильтр, не переворачивая, встряхивали и центрифугировали в режиме 400g x 2 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок микроскопировали с каплей 2% раствора Люголя сначала на малом, затем на большом увеличении.

2.3.3. Методы окрашивания

Для последующего окрашивания готовили:

1. тонкие мазки нефиксированного кала;
2. мазки из материала поликсенической культуры *in vitro*;
3. мазки осадка фиксированного кала в консерванте Турдыева после обработки ФЭО.

2.3.3.1. Метод окрашивания Трихром

Использовали классический метод из руководства ВОЗ [22]. Фиксация материала проводилась раствором Шаудинна (насыщенный водный раствор хлористой ртути ($HgCl_2$) + этиловый спирт). Метод заключается в многоэтапной системе окрашивания (таблица 2.3.3.1.1).

Таблица 2.3.3.1.1. Состав растворов красок трихром

Реагент	Количество реагента
Хромотроп 2К	6,0 г
Светлый зеленый SP	1,5 г
Светостойкий зеленый FCF	1,5 г
Кристаллы фосфовольфрамовой кислоты	7,0 г
Ледяная уксусная кислота	10 мл
Вода дистиллированная	до 1000 мл

2.3.3.2. Окрашивание препаратов по методу Романовского - Гимза

В качестве фиксирующего вещества использовали 96% этанол – 10-15 мин. На мазки в горизонтальном положении наносили спирт и оставляли до полного высыхания. Готовый жидкий краситель перед окрашиванием мазков разводили по инструкции фирмы- производителя. Экспозицию подбирали опытным путем. После окрашивания мазки промывали в проточной воде, сушили на воздухе и исследовали под масляной иммерсией (ув. x 1000). Основные реагенты окраски по Романовскому - Гимза: азур II и эозин.

2.3.3.3. Адаптация метода быстрого окрашивания (набор «Лейкодиф 200») для мазков кала

Набор содержит красители (таблица 2.3.3.3.1), рекомендованные для быстрого окрашивания мазков крови. Метод был апробирован и адаптирован для идентификации бластоцист.

Таблица 2.3.3.3.1. Состав набора «Лейкодиф 200»

Наименование растворов	Реагенты
Фиксирующий раствор (200мл)	Метанол 24 моль/л
	Нафталиновый зеленый 1 мг/л
Окрашивающий раствор № 1 (200мл)	Эозин (желтоватый) 1,73 ммоль/л
	Фосфатный буфер, рН 6,8, 60 ммоль/л
Окрашивающий раствор № 2 (200 мл)	Азур II 12 г/л
	Фосфатный буфер, рН 6,8, 60 ммоль/л

На обезжиренные сухие предметные стекла наносили пластмассовым шпателем нативный кал, без высушивания мазок погружали в фиксирующий раствор на 5 минут, давали возможность стечь раствору и погружали в раствор №1 на 5 минут, вынимали и после стекания погружали в раствор №2 на 3 минуты. Стекла промывали в дистиллированной воде и сушили на воздухе. Микроскопировали при ув. x1000.

2.3.4. Культуральный метод исследования

Посев фекалий выполняли на среду Павловой (NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, дистиллированная вода, сыворотка крупного рогатого скота из расчета 1:20). В пробирки (10-12 мл) со средой перед посевом добавляли 1-2 петли стерильного рисового крахмала. Вносили объем фекалий не более горошины перца, если жидкие - 100 - 150 мкл. Рост клеток контролировали через 24, 48 и 72 ч инкубации при 37⁰ С. Наличие бластоцист в культуре оценивали путем микроскопии материала из ростовой зоны клеток в придонной части при увеличении × 120 (окуляр х15, объектив х8). При наличии роста клеток из пробы делали постоянные препараты, окрашенные тремя методами (Трихром, Романовский – Гимза, «Лейкодиф 200»).

2.3.5. Иммунологический метод CoproElisa Blastocystis

Для сравнительного микроскопического и иммунологического исследования была использована коммерческая тест – система CoproELISA Blastocystis, Savyon Diagnostics для определения антигена (АГ) бластоцист в образцах стула. Было использовано 2 набора, в каждый набор входил 96 – тестовый микропланшет, включающий 12 стрипов. Каждый стрип состоит из 8 лунок, покрытых антителами (АТ) *Blastocystis*. Стрипированный вариант микропланшета позволяет анализировать материал в несколько этапов, по мере формирования исследуемых групп.

Сбор образцов фекалий

Для исследования использовали фиксированные образцы кала в консерванте Турдыева.

Приготовление реагентов

1. Все компоненты и образцы фекалий перед постановкой выдерживали при комнатной температуре примерно 30 минут. Отбирали необходимое количество стрипов (соответственно числу тестируемых образцов). В дополнение к тестируемым образцам, включали в каждый тест две лунки «отрицательного

контроля» (использовали для этой цели жидкость для разведения фекалий) и «положительного контроля».

2. Разбавляли концентрированный буфер для промывания 1:20 дистиллированной водой.

Приготовление тестируемых образцов

1. Расставляли в штатив необходимое количество пронумерованных пробирок. Добавляли 400 мкл раствора для разведения фекалий (синий) в каждую пробирку.

2. С помощью аппликатора (для каждого образца использовали одноразовый аппликатор) переносили 1 мл. фекалий в пробирку и тщательно перемешивали на вортексе.

3. Пробирки отстаивались не более 30 мин для получения осадка и декантации жидкой фазы.

Инкубация тестируемых проб и контролей

Необходимое количество стрипов помещали в специальный штатив. В две лунки добавляли по 100 мкл. положительного и отрицательного контроля. В остальные (индивидуальные) лунки вносили по 100 мкл разведенных исследуемых образцов. Закрывали плашку пленкой и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Затем содержимое лунок удаляли. Каждую лунку 5 раз промывали буферным раствором, после чего остатки влаги из лунок планшета удаляли салфеткой.

Далее добавляли по 100 мкл готового к употреблению конъюгата в каждую лунку. Накрывали стрипы пленкой и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа в термостате. Промывали так же, как описано выше.

Добавив в каждую лунку по 100 мкл ТМВ-субстрата, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем для остановки реакции, добавляли в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора (раствор серной кислоты).

Считывание результатов

Результаты считывали с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм. Положительный контроль: степень адсорбции должна быть больше/равна 1.0 при 450/620 нм. Отрицательный контроль: степень адсорбции должна быть

меньше/ равна 0.20 при 450/620 нм. Положительный результат: в тестируемой лунке визуализируется желтая окраска.

Отрицательный результат: тестируемая лунка не окрашивается. Это показывает, что образец не содержит АГ бластоцист или содержит его в незначительных количествах.

Результаты высчитывали по формуле:

$$\underline{ОП_{д} = ОП_{ср}(К-) + 10}$$

ОП_д – диагностическое значение оптической плотности

ОП_{ср}(К-) - среднее арифметическое значение оптической плотности.

Если ОП образца меньше ОП_д, то это отрицательный результат. ОП образца больше или равно ОП_д, это положительный результат.

2.4. Статистическая обработка результатов

На основании информации, полученной из опросников, в программе Microsoft Office Excel 2007 была сформирована база данных. Биостатические показатели, рассчитывались при помощи пакета программ EpiInfo 7.

Сравнения двух групп по количественным шкалам проводились на основе непараметрического критерия Манна-Уитни. Для описания количественных показателей использовались среднее значение и стандартное отклонение в формате «M ± S». Анализ динамики показателей в случае сравнения двух периодов производился на основе непараметрического критерия Вилкоксона, в случае сравнения трех и более периодов – на основе непараметрического критерия Фридмана. Статистическая значимость различных значений для бинарных и номинальных показателей определялась с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона. Корреляционный анализ проводился на основе непараметрической ранговой корреляции по Спирмену.

Уровень статистической значимости был зафиксирован на уровне вероятности ошибки 0.05. Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11.

Формулы:

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ = $\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО})$,

СПЕЦИФИЧНОСТЬ = $\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})$,

ТОЧНОСТЬ = $(\text{ИП} + \text{ИО}) / (\text{ИП} + \text{ИО} + \text{ЛО} + \text{ЛП}) * 100\%$

Характеристика методов диагностики

- 1) ИП – истинно - положительный диагноз;
- 2) ЛП – ложно - положительный диагноз (предположено наличие там, где его нет);
- 3) ИО – истинно - отрицательный диагноз;
- 4) ЛО – ложно-отрицательный диагноз (не выявлено диагностируемое состояние, хотя оно было).

Силу корреляционной связи оценивали по таблице Чеддока (таблица 2.4.1).

Таблица 2.4.1. Таблица Чеддока

Абсолютное значение R	Теснота (сила) корреляционной связи
менее 0.3	Слабая (отрицательная)
от 0.3 до 0.5	умеренная
от 0.5 до 0.7	заметная
от 0.7 до 0.9	высокая
более 0.9	весьма высокая

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *BLASTOCYSTIS SPP.*

3.1. Ретроспективный анализ результатов обнаружения *Blastocystis* на основе модифицированного метода ФЭО в КДЛ Института Марциновского за 2014-2018 гг.

Метод формалин-эфирного осаждения (ФЭО) известен с середины прошлого века [114]. В свое время он произвел революцию в диагностике паразитозов кишечника. Постепенное снижение интенсивности инфекции потребовало применения методов, способных сконцентрировать возбудителей в минимальном объеме биоматериала. Для этого применяются методы обогащения: обработка кала определенными химическими веществами, фильтрация и затем осаждение центрифугированием. Обработка эфиром растворяет жир, коагулирует белки, фильтрование освобождает материал от детрита, в результате получается чистый прозрачный осадок. При микроскопии такого осадка - максимальная вероятность обнаружения даже самых мелких простейших. Метод был общепризнан «золотым стандартом» для диагностики возбудителей паразитозов кишечника [147].

Однако в последние годы ФЭО подвергается критике и переоценке. Это вызвано многими причинами. По мнению некоторых авторов, обработка эфиром нефиксированных проб кала приводит к деструкции наиболее хрупких морфотипов простейших: трофозоитов амёб и жгутиковых, а также некоторых форм бластоцист. Кроме того, этиловый эфир - наркотическое, взрывоопасное вещество и работа с ним связана с определенными административными трудностями и запретами. Однако в результате применения заменителей эфира (этилацетат, очищенный бензин) не получается осадок хорошего качества. Централизация лабораторий и образование крупных диагностических центров с большим потоком пациентов выдвигают на первый план полуавтоматические станции, панели и другие методы, не требующие специальной подготовки и опыта врачей КДЛ.

В КДЛ Института им. Е.И. Марциновского с 2000 года применяется разработанная сотрудниками Института модификация ФЭО, которая была принята «a priori» без сравнительной оценки диагностической эффективности с другими

методами концентрации (см. главу материалы и методы). Принятый алгоритм позволяет нивелировать наиболее критикуемые недостатки ФЭО. В консерванте сохраняются трофозоиты амеб и жгутиков, а также все морфотипы бластоцист. Исследование проб из трех образцов стула, собранных в разные дни, повышает вероятность обнаружения простейших, для которых характерно ритмичное нарастание и убывание численности популяции.

Нами были проанализированы данные КДЛ за 5 лет: с января 2014 по декабрь 2018 гг. За это время на простейшие кишечника было исследовано 34838 образцов стула, из них в 6503 пробах (в среднем - 19%) были обнаружены *Blastocystis*. Результаты представлены в таблице 3.1.1. Средний возраст обследуемых пациентов на примере 2017 г составил $30,7 \pm 1,2$ года. При анализе данных по полу значимых различий в частоте носительства бластоцист по годам не выявлено. Соотношение мужчин и женщин 1 : 1,2. Частота инфицирования мужчин за 5 лет в среднем составила 45,6 % на 100 исследований, женщин - 54,4% на 100 исследований. Полученные результаты сопоставимы с данными работ зарубежных авторов [109, 120]. Небольшое преобладание лиц женского пола можно объяснить особенностями сферы деятельности женщин, высокой частотой контакта с источниками инфекции, большей занятостью женщин в бытовой сфере поскольку некоторые авторы [2] контактно - бытовой путь выдвигают на первый план.

Таблица 3.1.1. Выявление инфицированности бластоцистами пациентов КДЛ Института Марциновского модифицированным методом ФЭО за 5 лет

№ п\п	Год	Количество исследований	Выявлено <i>Blastocystis</i>	Частота выявления на 100 исследований
1.	2014	5702	1327	23,3
2.	2015	5625	1302	23,1
3.	2016	7268	1294	18
4	2017	8366	1265	15,1
5	2018	7877	1315	17
	Всего:	34838	6503	19

Данные соответствуют результатам, полученным другими авторами при обследовании соответствующих контингентов методом ФЭО в России и за рубежом [12, 26, 28, 40].

Была сделана выборка исследований за 2017 год, и на этом материале определен спектр диагностируемых простейших кишечника. Как и следовало ожидать, бластоцисты преобладали среди них и составляли 15,1% (рисунок 3.1.1).

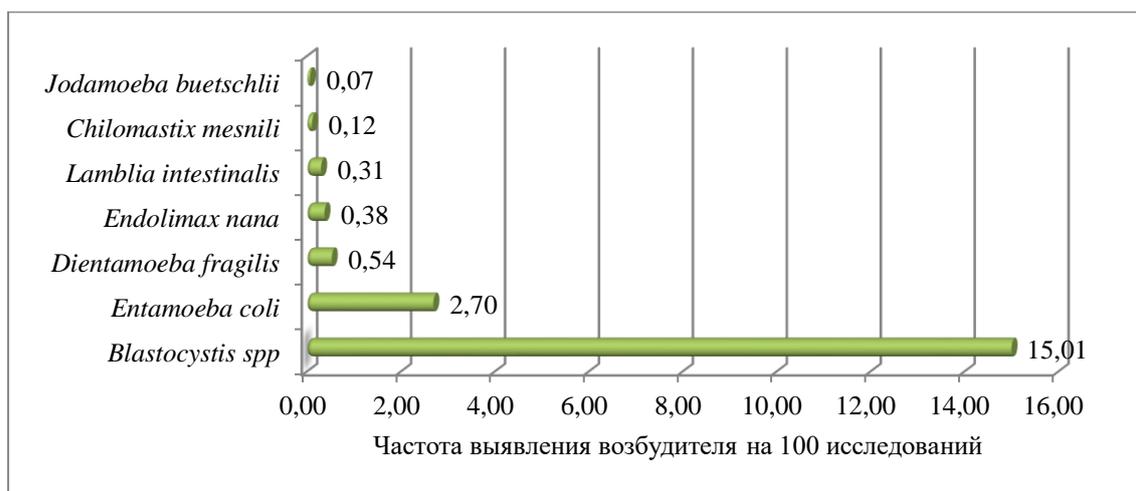


Рисунок 3.1.1. Частота выявления бластоцист среди простейших кишечника, по данным КДЛ за 2017 г.

Был также проведен анализ инфицирования пациентов в разных возрастных группах, результаты которого представлены на рисунке 3.1.2.

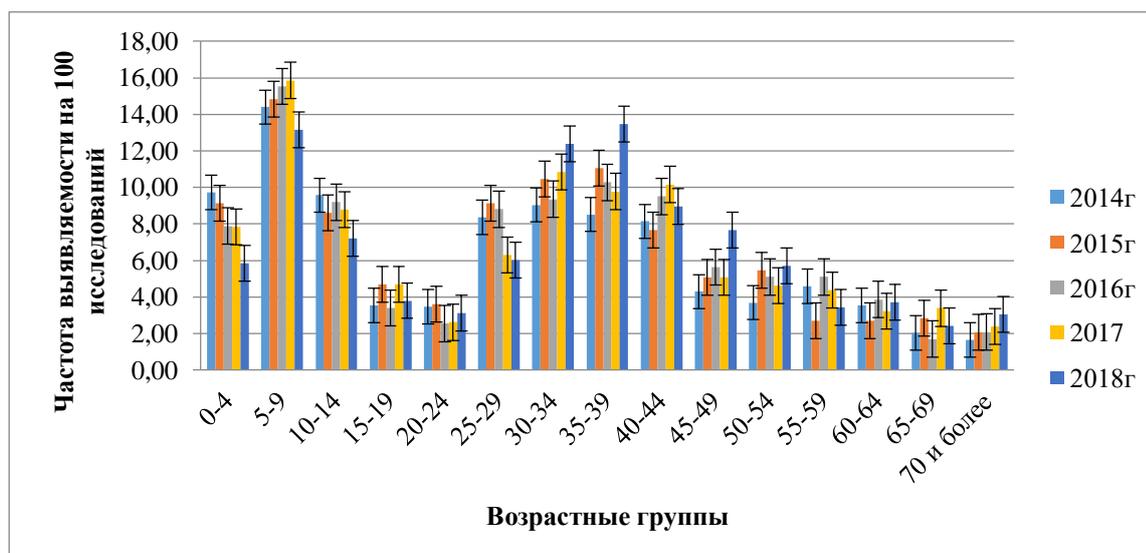


Рисунок 3.1.2. Частота выявления бластоцист в различных возрастных группах в 2015-2018 гг.

Принцип распределения по возрастам был взят с сайта федеральной службы государственной статистики. Обращает внимание, что инфицирование бластоцистами наблюдается на протяжении всей жизни и имеет волнообразный характер, при этом прослеживается тенденция к снижению частоты инфицирования с возрастом обследуемых.

Следует отметить, что первый пик наблюдается в возрасте от 5 до 9 лет и составляет от 14 до 15%. Пик инфицирования в этом периоде жизни можно объяснить тем, что дети этого возраста соответствуют четвертому критическому периоду жизни [15]. В этом периоде система местного иммунитета у большинства детей еще полностью не сформирована, поэтому активность факторов местной защиты остается низкой. Полученные результаты сопоставимы с результатами аналогичных исследований [2, 108], хотя некоторые авторы [99] приводят более высокие цифры, а именно от 6 до 7 лет – 50%; 8-9 лет – 27,5%; от 10 до 12 лет – 9,5 %. Пик заражения может быть обусловлен тем, что дети в возрасте 5-9 лет обследуются чаще (по инициативе родителей) и представляют максимальную группу – 18,3% (рисунок 3.1.3).

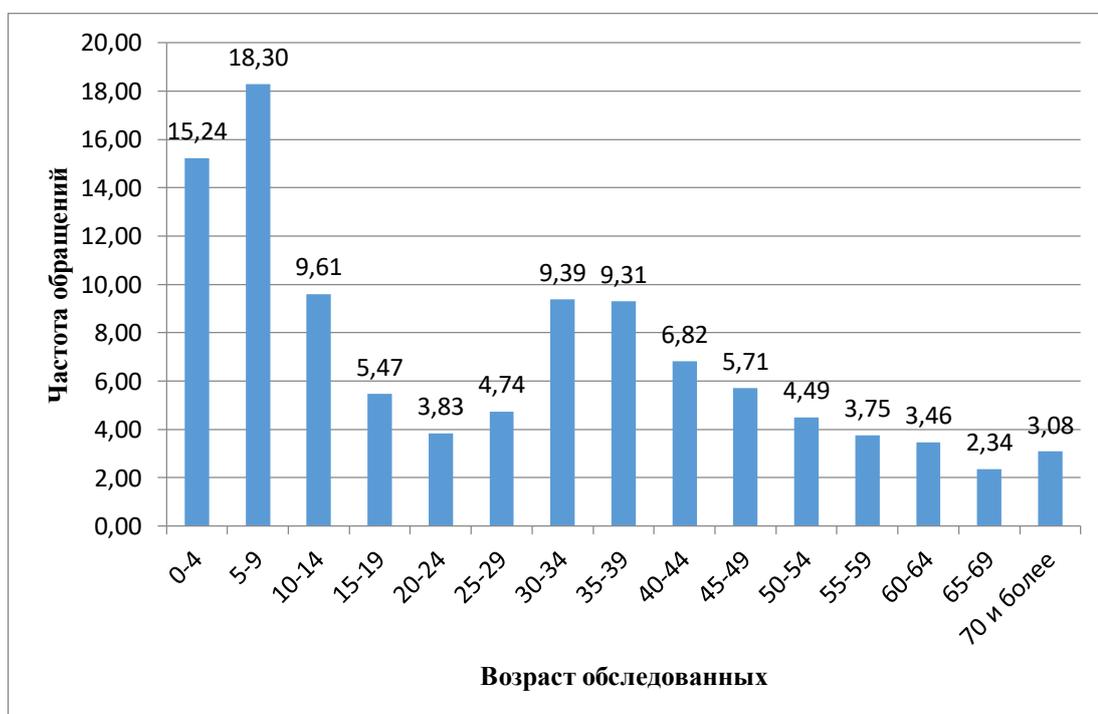


Рисунок 3.1.3. Частота обращаемости пациентов в КДЛ в 2018г.

Следующая волна инфицирования начинается в возрасте от 25 лет и продолжается до 44 лет, что составляет 8 - 11%. Вероятнее всего подъем инфицирования в этот период можно объяснить высокой активностью во всех сферах профессиональной деятельности, что приводит к лабильности эмоционального состояния и снижению иммунитета.

Заключение. Специализированная КДЛ по паразитарным болезням была организована на базе Института Марциновского в 2000 году как диагностическая лаборатория экспертного уровня. Модификацию метода ФЭО разработали в КДЛ для первичного скрининга возбудителей паразитозов кишечника. Однако накопленные данные не анализировали и не изучали при перекрестном сравнении с другими методами скрининга. Алгоритм сбора материала пациентами был сознательно усложнен и растянут во времени с целью лучшей выявляемости всех стадий простейших. В рутинном процессе микроскопии мы отмечали хорошую сохранность трофозоитов амеб и жгутиковых, а также хрупких вакуолярных морфотипов бластоцист.

Микроскопия препаратов, приготовленных методом ФЭО, дает возможность оценить популяцию бластоцист конкретного пациента: наличие амебоидных и других редко встречающихся форм, микст – инфекций, способы размножения. Это позволяет при выпуске результатов дать пациенту соответствующие рекомендации.

Ретроспективный анализ результатов диагностики за последние 5 лет (в основном жителей Москвы и Подмосковья) выявил инфицированность бластоцистами в пределах 15 – 23%, что соответствует данным других источников.

3.2. Сравнительная оценка концентратора «Mini Parasep® 108900» и модифицированного метода ФЭО

Регулярно проводимые в Институте Марциновского курсы сертификации по программе ПК «Лабораторная диагностика (паразитология)» и «Лабораторное дело (паразитология)» выявляют, что с ФЭО работают единичные лаборатории. В России широко используются мини-концентраторы Parasep. В связи с этим мы

провели сравнительное изучение концентратора «Mini Parasep®108900» (Aparcor, England) и ФЭО. Концентраторы Parasep завоевали популярность, поскольку удобны в применении. Замкнутая герметичная система позволяет обходиться без вытяжного шкафа. Недостатки большинства моделей Parasep: метод рассчитан на исследование минимального объема нефиксированного кала (1 ложечка – примерно 200 мкл), добавление токсичного ингредиента – этилацетата и получение после центрифугирования 0.2-0.3 мл хлопьевидного мутного осадка. Простейшие в таком осадке видны только после двукратного разведения, что при низкой интенсивности инфекции приводит к гиподиагностике. Метод не адаптирован к работе с фиксированным биоматериалом. Без разведения этилацетат образует преломляющие свет пузырьки, затрудняющие микроскопию (рисунок 3.2.1).

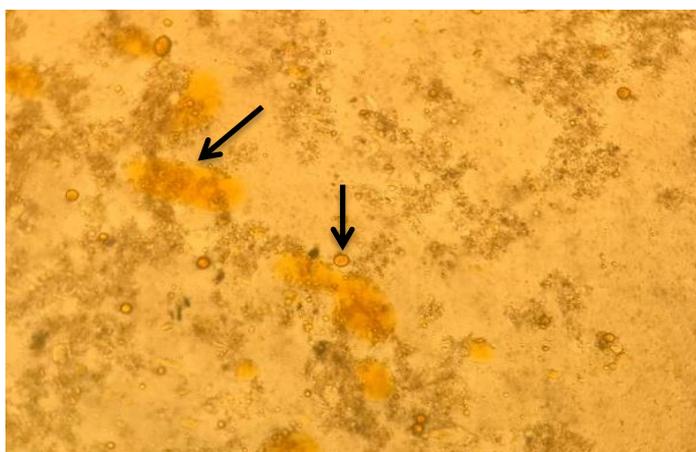


Рисунок 3.2.1 Преломляющие свет капли (указаны стрелками) в осадке кала после использования «PARASEP 146400», увел.: x100

«Mini Parasep 108900» частично преодолевает эти недостатки. Отличие от аналогов: не используется этилацетат и для очищения биоматериала применяется трехуровневая фильтрующая матрица.

Для сравнения методов были исследованы одни и те же образцы кала, фиксированного в консерванте Турдыева. Для сравнения мини - и макси методов было невозможно обеспечить равные условия. По протоколу в модифицированном ФЭО исследовали 5 – 6 мл суспензии, в Mini Parasep помещался только 1 мл. В результате из 100 исследованных образцов методом ФЭО в 70 были обнаружены паразиты. При обработке тех же образцов фиксированного кала в Mini Parasep

положительными были только 56 проб (таблица 3.2.1). Разница статистически значима ($\chi^2 = 54.545$, $P = 0.000000$).

Таблица 3.2.1 Сравнительная оценка обнаружения возбудителей паразитозов двумя методами ФЭО и «Mini Parasep®108900»

Возбудитель инфекции	Метод исследования	
	ФЭО	«Mini Parasep®108900»
<i>Entamoeba coli</i>	8	7
<i>Ancylostomidae</i>	1	1
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	1
<i>Blastocystis spp</i>	35	28
<i>Dientamoeba fragilis</i>	3	2
<i>Diphyllobothrium spp.</i>	2	2
<i>Endolimax nana</i>	3	3
<i>Fasciola hepatica</i>	1	0
<i>Jodamoeba buetschlii</i>	1	1
<i>Lamblia intestinalis</i>	6	5
<i>Opisthorchis felineus</i>	7	5
<i>Strongyloides spp</i>	1	1
<i>Taeniidae</i>	1	0
Всего положительных	70	56
Всего отрицательных	30	30
Итого	100	86

Таким образом, методом Mini Parasep® паразиты не были выявлены в 14 образцах: 1 - *E. coli*, 1 - *D. fragilis*, 1 - *F. hepatica*, 1 - *L. intestinalis*, 1 - *Taeniidae*, 2 - *O. felineus* и 7 - *Blastocystis spp*. По – видимому эффективность метода снижена за счет минимизации объема пробы, низкой интенсивности инфекции и большого объема мутного осадка. На рисунке 3.2.2 видна существенная разница объемов осадка после обработки образца (ФЭО -5 мл, Parasep- 1мл).



Рисунок 3.2.2. Осадок кала после обработки методом ФЭО (слева) и Mini Parasep®108900 (справа)

Для диагностической оценки эффективности работы Mini Parasep® произведен расчет по показателям представленным в таблице 3.2.2: чувствительность - 80%, специфичность - 100% и точность метода - 100%.

Таблица 3.2.2 Оценка чувствительности и специфичности Mini Parasep® по отношению к модифицированному ФЭО при выявлении паразитозов кишечника

«Mini Parasep®108900»	Модифицированный метод ФЭО		
	Положительный результат	Отрицательный результат	Всего
1	2	3	4
Положительный результат	56 истинно - положительные	0 ложно - положительные	56

1	2	3	4
Отрицательный результат	14 ложно - отрицательные	30 истинно - отрицательные	44
Всего	70	30	100

$$\chi^2 = 54.545, P = < 0,001$$

Для оценки связи между двумя методами был рассчитан коэффициент корреляции (r), который равен $0.757 > 0$, т.е. корреляция между двумя методами высокая. Связь между методами - прямая, по шкале Чеддока - высокая. Число степеней свободы (f) составляет 98, t -критерий Стьюдента равен 11.461. Критическое значение t -критерия Стьюдента при данном числе степеней свободы составляет 1.987. $t_{\text{набл}} > t_{\text{крит}}$, зависимость признаков статистически значима ($p=0.000000$).

Для наглядности мы построили диаграмму рассеяния и линию регрессии (рисунок 3.2.3.). Уравнение парной линейной регрессии: $y = 0.13173 + 0.37760 * x$. Коэффициент детерминации r^2 равен 0.573 (факторный признак x определяет 57.3% дисперсии зависимого признака y).

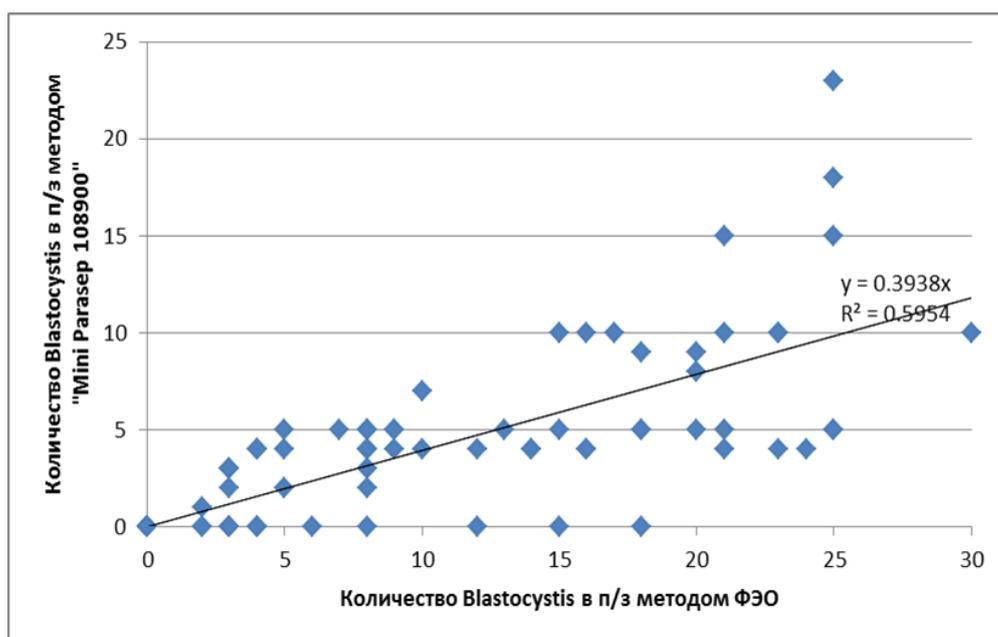


Рисунок 3.2.3. Корреляционная связь между показателями интенсивности инфекции методами ФЭО и «Mini Parasep®108900»

Заключение. Сравнение новой модели «MiniParasep 108900» с модифицированным ФЭО позволили ее рекомендовать для применения в КДЛ общего профиля. Также мы адаптировали «MiniParasep 108900» для обработки кала, фиксированного в консерванте Турдыева. Однако мутноватый хлопьевидный осадок не позволяет оценить свойства популяции бластоцист, что очень важно при выпуске результата и рекомендации пациентам.

3.3. Применение ФЭО в количественной оценке интенсивности инфекции в группах с различными клиническими проявлениями

Концепция об ассоциации бластоцист в пороговой концентрации (>5 кл. в п. зр. $\times 400$) с расстройствами ЖКТ получила широкую известность и вошла во многие руководства в качестве критерия оценки тяжести инфекции [90]. В результатах, выдаваемых нашей лабораторией, мы также обозначали интенсивность инфекции в крестах.

Однако этот критерий нуждался в дальнейшей проверке и осмыслении, так как показатели интенсивности инфекции (более 5 клеток в поле зрения при ув. $\times 400$) встречаются у многих бессимптомных носителей [140]. Известен также феномен ритмичного нарастания и убывания численности простейших кишечника в пробах стула [17]. Кроме того, количественный критерий интенсивности инфекции оставляет без внимания другие особенности популяции бластоцист в исследуемой пробе. По данным многих авторов, морфотип бластоцист (АМФ) и способы размножения (шизогония) ассоциируется с реализацией патогенного потенциала возбудителя [37].

С целью проверки достоверности количественного критерия был проведен мониторинг ежедневного выделения бластоцист пациентами КДЛ в течение 7 дней. Были сформированы две группы - 51 пациент. Из них 31 пациент (1 группа - 60,80 %) с симптомами со стороны ЖКТ: боли в животе, метеоризм, диарея, запор, колит и 20 пациентов (2 группа - 39,20 %) с симптомами аллергического характера: бронхиальная астма, атопический дерматит, кожные высыпания. Две группы оказались эквиваленты по полу ($P = 0,4716$) и возрасту ($P = 0,6559$), что говорит о

хорошо подобранной выборке. Влияние пола и возраста (группа «до 30 лет» (N=30; 58,80%) и группа «30 лет и старше» (N=20; 41,20%)) на обнаружение бластоцист не подтвердилось, следовательно, в дальнейших исследованиях можно не принимать пол пациентов во внимание точно так же, как и возраст.

За период наблюдения было исследовано 357 проб фекалий методом ФЭО. В обеих группах зафиксированы хаотичные колебания численности выделяемых бластоцист в процессе динамического наблюдения (рисунок 3.3.1). Критическое значение, связанное с проявлением инфекции (5 и более клеток в п. зр. x400), было обнаружено у 36 человек (23 пациента с симптомами ЖКТ и 13 с аллергической симптоматикой). Число пациентов с низким (допороговым < 5 кл. в п. зр. x400) уровнем бластоцист не превышало 15 человек в обеих группах (8 из 1 – ой группы и 7 из 2 – ой).

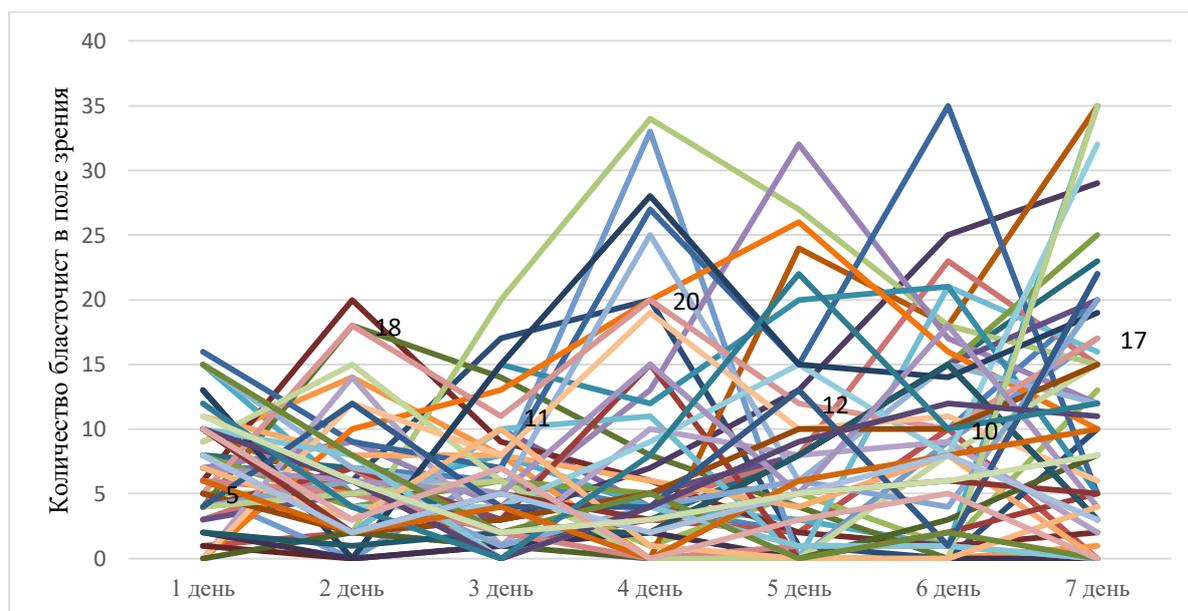


Рисунок 3.3.1. Динамика выявления *Blastocystis* у обследованных пациентов

Анализ данных, полученных из всей исследуемой выборки, позволяет утверждать, что среди 8 значений нет показателей с неполными данными. Объем выборки достаточен для проведения статистического анализа данных и формирования достоверных выводов. Коэффициент вариации изменяется в диапазоне от 60 до 110%, что говорит о высоком уровне разнородности некоторых исследуемых показателей. Самыми однородными показателями оказались

выделение бластоцист на 5, 6 и 7 день. Критерий согласия Пирсона показывает, что в 90% случаях гипотеза о нормальном распределении отвергается.

Анализ показал, что статистически значимые различия в выделении бластоцист обнаружены в четырех периодах из семи: на второй, третий, четвертый и шестой день, причем во всех этих случаях количество бластоцист было существенно больше в 1 группе. В остальные дни количество бластоцист также было больше в группе 1, но различия не достигли уровня статистической значимости. При рассмотрении бинарных переменных статистически значимых различий между группами не обнаружено. 1 и 2 группа эквивалентны по количеству отрицательных результатов. В обеих группах бластоцисты обнаруживаются только в 40-50 % случаев при всех вариантах продолжительности сбора биоматериала. При однократном сборе ошибка отрицательного ответа составляет 20-40 %, то есть довольно часто. При двухдневном сборе 10-25% случаев, при трехдневном – в 3-10%, а при четырехдневном – менее чем 1% (таблица 3.3.1)..

В КДЛ ИМПТ и ТЗ им.Е.И Марциновского Сеченовского Университета алгоритм исследования фиксированной пробы из трех образцов стула был принят «a priori». Таким образом наши исследования доказали правильность и необходимость трехдневного сбора биоматериала на паразитозы.

Таблица 3.3.1. Данные статистической обработки выделения бластоцист двух групп

Число дней	Группа		Уровень P, (df=1)
	1, (N=31)	2, (N=20)	
0	15 (48,4%)	8 (40,0%)	0,2095
1	12 (38,7%)	4 (20,0%)	
2	3 (9,7%)	5 (25,0%)	
3	1 (3,2%)	2 (10,0%)	
4	0 (0,0%)	1 (5,0%)	

Для проверки взаимосвязей между уровнями выделения бластоцист в разные дни был проведен корреляционный анализ (по методу Спирмена), результаты которого представлены в таблице .

Таблица 3.3.2. Коэффициенты корреляции Спирмена между показателями выделения бластоцист в разные дни

Дни наблю дения	Коэффициент корреляции						
	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день
1 день	1	-0,03	0,22	0,15	0,08	0,09	-0,02
2 день	-0,03	1	0,08	0,17	-0,03	-0,15	-0,08
3 день	0,22	0,08	1	0,36**	0,06	-0,04	0,06
4 день	0,15	0,17	0,36**	1	0,39**	0,42**	0,10
5 день	0,08	-0,03	0,06	0,39**	1	0,62**	0,37**
6 день	0,09	-0,15	-0,04	0,42**	0,62**	1	0,28*
7 день	-0,02	-0,08	0,06	0,10	0,37**	0,28*	1

Корреляционный анализ показывает, что в определенные дни, результаты лабораторных анализов биоматериала никак не связаны с результатами в другие дни: например, день 1 и день 2. Уровень бластоцист в день 3 коррелирует только с уровнем бластоцист в день 4. Максимальное количество корреляций, которое удалось получить, равно двум, то есть, из семи различных проведенных анализов, в лучшем случае результаты совпадают в двух случаях, а в худшем – ни в одном.

Проведенный мониторинг выделения бластоцист в течение 7 дней двумя группами пациентов (31+21=51), и после статистической обработки результатов позволил получить объективный и достоверный материал. Наши данные свидетельствуют о существенной вариабельности в выделении *Blastocystis* и констатировать, что количественная оценка на момент обследования не является постоянно значимой величиной, т.е. однократно проведенное обследование не является объективным критерием текущей инфекции. Кроме того, однократное

исследование может совпасть во времени с периодами персистенции бластоцист ниже порогового уровня чувствительности метода диагностики – ФЭО.

Результаты наших исследований подтверждаются и дополняются клиническими данными других авторов [144]. В малазийском стационаре был проведен 30 – ти дневный ежедневный мониторинг исследования кала на бластоцисты пациента с диареей. Интенсивность выявления ВАФ варьировала от 17 до 0 клеток в поле зрения. В течение месяца наблюдалось 6 пиков выделения и 6 падений до 0 значений, причем период отрицательных результатов варьировал от 1 до 3 дней. Наши данные, полученные при наблюдении 51 пациента в течение 7 дней и 30 –ти дневное наблюдение за одним пациентом указывают на несостоятельность количественного критерия оценки инфекции, а также на недостоверность результатов одноразовой пробы. Нерегулярное выделения бластоцист продемонстрировано экспериментально также по заражению *Blastocystis* крыс линии Wistar [80].

Однако следует отметить, что в рассматриваемом критерии численности клеток, ассоциируемых с клиническим проявлением инфекции, оставлена без внимания морфологическая картина популяции бластоцист [81, 90, 102, 131, 158, 135]. Данная позиция, а также имеющиеся разночтениями в системе идентификации объекта (при ув., x400 или ув., x1000) не способствует адекватной оценке течения инфекции. В целом при инфекции, обусловленной бластоцистами, наиболее актуальным вопросом остается изучение морфофункциональных особенностей паразита, за счет которых можно выстроить причинно – следственную связь между фактом обнаружения паразита и его функциональной ролью. Интерпретация факта наличия *Blastocystis* у обследуемого сопряжена с варьирующими возможностями паразита и условиями взаимоотношения в системе хозяин – паразит.

Заключение. Широко распространенная концепция об ассоциации заранее установленного - числа бластоцист в исследуемых образцах биоматериала от лиц с клиническим проявлением инфекции оказалась несостоятельной. Численность микроорганизмов при инфекции, обусловленной *Blastocystis spp.*, не является

адекватным маркером патогенности. Проведенные исследования позволили констатировать, что количественная оценка на момент обследования не является постоянно-значимой величиной и однократно проведенное исследование не может служить объективным критерием текущей инфекции.

3.4 Идентификация бластоцист на основе постоянно окрашенных препаратов

По нашим данным, в подавляющем большинстве случаев для идентификации простейших кишечника бывает достаточно обработки фиксированной пробы из трех образцов стула методом ФЭО и микроскопии осадка с подкраской 2 % р-ром Люголя. ФЭО, включенный в алгоритм исследования, принятый в КДЛ ИМПТ и ТЗ им. Е.И.Марциновского, позволяет идентифицировать на первом скрининговом этапе исследования примерно 90 – 95% случаев инфекции, вызванной бластоцистами. Однако при наличии трудно дифференцируемых морфотипов *Blastocystis* и особенно при микст-инфекциях с другими простейшими кишечника, необходимо дополнительно применять другие техники исследования, например, методы окрашивания.

Чаще всего идентификация паразита осуществляется на основании обнаружения крупных морфоформ – вакуолярной и гранулярной. Мелкие вакуолярные формы (3-5мкм), а также цистную, амебоидную, мультивакуолярную, авакуолярную и другие формы врачи КДЛ часто не замечают, принимая их за фекальный детрит. *Blastocystis* помимо трудно идентифицируемых морфотипов может также «мимикрировать» под другие виды простейших. Мы не нашли в публикациях упоминания об этом феномене, но часто сталкиваемся в своей практике с атипичными популяциями или отдельными клетками, похожими на *E. coli*, *E. histolytica / dispar*, *E.nana*, *E. hartmanni*, которые в процессе дальнейшей идентификации определяются как бластоцисты. Дифференцировать простейшие помогает окрашивание биоматериала: нативного мазка фекалий, осадка ФЭО, клеток из культуры *in vitro* после посева. Методы окрашивания выявляют тонкую структуру клеток, т.е. систематические признаки. Окрашенные препараты

сохраняются длительное время, что позволяет, при необходимости, получить консультацию других специалистов.

Для исследования было собрано 250 образцов нефиксированных фекалий у 129 женщин и 121 мужчин в возрасте от 3-х до 60 лет. Критерием выборки было наличие моноинфекции бластоцист в биоматериале от пациента при скрининговом исследовании (ФЭО).

При микроскопии неокрашенных препаратов (влажных мазков нативного кала и осадка материала из культур) обращает внимание полиморфизм бластоцист (рисунок 3.4.1). Вакуолярные формы были преобладающими как в нативном материале 64,4% (рис. А, Б), так и в культуре - 44,4% (рис. В). Гранулярная форма занимала второе место, но чаще обнаруживалась в культуре - 37,2% (рис. Д), в кале - 18% (рис. Г). Цистные формы - 8,4% *Blastocystis* отмечены в 72-часовых культурах (рис. З) и реже встречались в нативном материале - 4% (рис. И.). Амебоидные формы наблюдались в 8,4% в кале (Е) и 4,8% в культуре (рис. Ж). Были также отмечены трудно дифференцируемые морфотипы (5,2%) (рис. И). Почти в каждом втором препарате были отмечены делящиеся клетки (рис. А, В), а в отдельных случаях наблюдали морфоформы, прошедшие множественный процесс деления: скопления клеток-потомства без оболочек (кластеры) или сохранившие общую оболочку «гроздь винограда» или «мешки с мелкими клетками» (рис. К, Л, М).

После микроскопии биоматериала от одного пациента окрашивали по три стекла каждым методом, в результате было исследовано **2250** окрашенных препаратов.

При изучении окрашенных постоянных препаратов чаще преобладали мелкие и среднего размера (5 – 15 мкм) вакуолярные и гранулярные (5-10 мкм) формы бластоцист. Клетки менее 5 мкм были вторыми по частоте выявления. При окрашивании редко наблюдали амебоидные формы, поскольку обнаруженные в очень небольшом количестве в нативном мазке мелкие клетки, при цитологическом исследовании окрашенных препаратов под иммерсией (ув., ×1000) встречались еще реже.

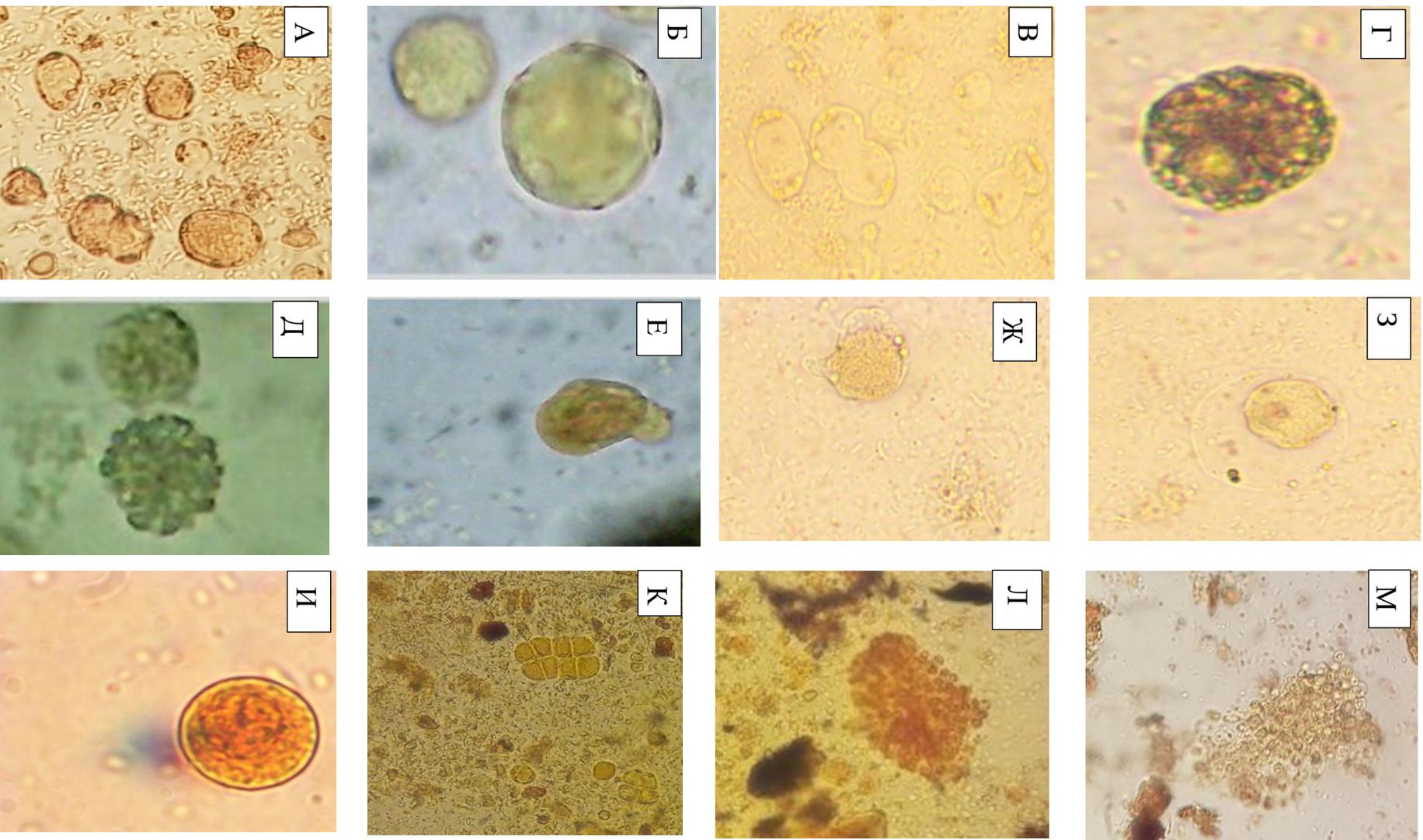


Рисунок 3.4.1. Основные морфологические формы *Blastocystis*, окрашенные раствором Люголя. Вакулярная форма (А) в нативном

кале - ув. х400 и (Б) - ув. х1000, (В) в поликсенической культуре - ув.х1000; гранулярная форма ув. х400 (Г) в кале, (Д) в культуре ; амебоидная форма ув. х1000 в нативном кале (Е) и (Ж) в культуре; цистная - ув. х1000 в культуре (З) и кале (И); формы, демонстрирующие множественное деление – кластеры (шизонты) (К, Л, М) ув.х400.

Метод окраски по Романовскому – Гимза самый универсальный, широко применяющийся в лабораторной практике для окрашивания различных биологических субстратов: кровь, моча, мокрота, ликвор и др. Значительно реже метод Романовского применяется для окраски простейших кишечника в кале. Однако метод дает неплохие и даже отличные результаты в зависимости от качества краски, экспозиции и свойств биоматериала: нефиксированный кал, осадок ФЭО, культура и др.

При окраске нативного материала (рисунок 3.4.2) выявляются типичные морфологические признаки: центральное тело (вакуоль) занимает более 80 % объема клетки и окрашивается в светло - синий цвет. Четко визуализируются красновато-фиолетовые ядра в цитоплазме, оттесненные к противоположным полюсам клетки.

При окраске клеток из культуры (рисунок 3.4.3) и осадка после ФЭО (рисунок 3.4.4) морфологические признаки визуализируются хуже: центральная вакуоль имеет более светлый фиолетовый цвет, выглядит гомогенной, ядра плохо визуализируются.

Преимущества метода: универсальный, рутинный, общедоступный, краска производится многими фирмами в России, однако лучшие результаты независимо от окрашиваемого субстрата получены при использовании растворов Гимза от фирмы-производителя SIGMA.

Недостатки метода: Результаты значительно варьируют в зависимости от качества краски и регламента фирмы-производителя, номера партии. Необходим подбор экспозиции и разведения отдельно для каждого биоматериала. Разведенная краска имеет тенденцию выпадать в осадок в процессе окраски. Многие производители поставляют краски, которые разводятся фосфатным буфером. На

фиксацию и окраску одного препарата кала требуется 50 мин, культуры и осадка ФЭО – 40 минут

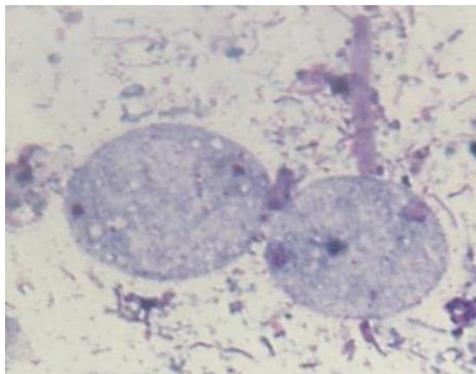


Рисунок 3.4.2. Вакуолярная форма *Blastocystis spp.* Влажный мазок нефиксированного кала. Окраска по Романовскому – Гимза ув. x1000.

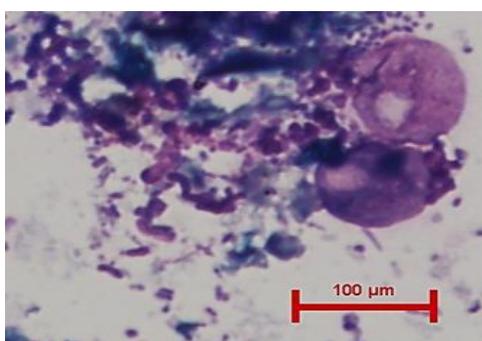


Рисунок 3.4.3. Вакуолярная форма *Blastocystis spp.* в поликсенической культуре. Окраска по Романовскому – Гимза ув. x1000.

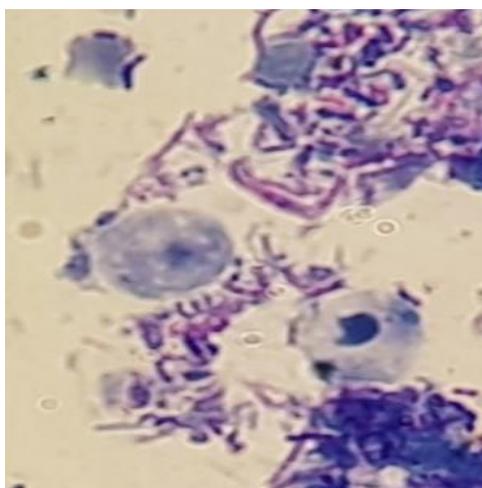


Рисунок 3.4.4. Вакуолярная форма *Blastocystis spp.* в фиксированном осадке ФЭО. Окраска по Романовскому – Гимза ув. x1000.

Экспресс - метод «Лейкодиф 200» (LDF 200, ERBA LACHEMA) рекомендован для быстрого окрашивания биологических материалов: кровь, эякулят, выпотные жидкости и др. Мы решили применить его для окрашивания *Blastocystis* в кале по аналогии с методами Романовского и Фильда – изначально гематологическими красителями.

Регламент фирмы – производителя не подошел для окрашивания бластоцист в образцах кала и культуры. Были изучены варианты окрашивания и подобран

оптимальный для окрашивания вариант экспозиции: раствор №1 – 1 минута (фиксация), р-р № 2 -4 минуты, р-р №3 – 3 минуты).

Мы отметили, что *Blastocystis* в нативном (рисунок 3.4.5) или фиксированном материалах (рисунок 3.4.6) имеют одинаковую окраску. Ядра окрашиваются в красновато-фиолетовый цвет, цитоплазма представляет все оттенки синего от темного до голубого. Цитоплазма, располагающая тонкой полоской вдоль клеточной стенки выглядит немного утолщенной в местах расположения ядер. Ядра в большинстве случаев имеют однополярное положение в нативном материале и биполярное при окраске фиксированного материала. При окрашивании культуры клеток (рисунок 3.4.7) видны не только сформированные клетки с четким очертанием, но и молодое потомство паразита, окрашенное в голубоватый цвет.

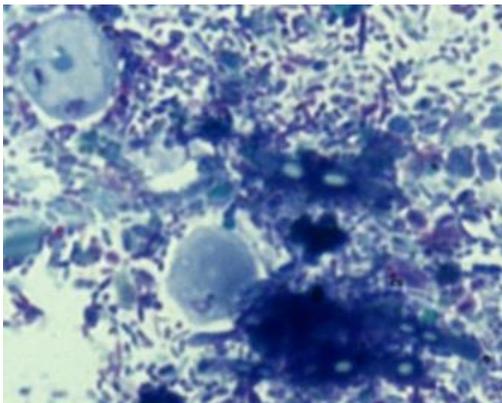


Рисунок 3.4.5. Вакуолярная форма *Blastocystis* spp. Влажный мазок нефиксированного кала.

Окраска Лейкодиф ув. x1000.

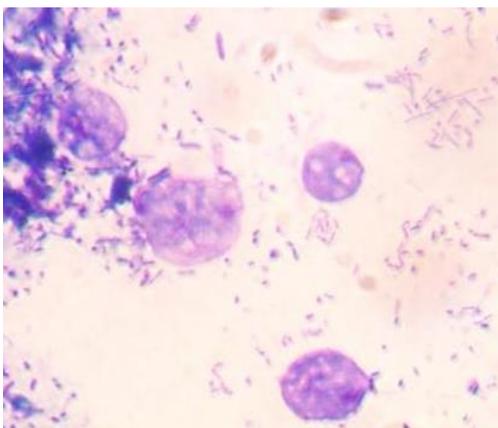


Рисунок 3.4.6. Вакуолярная форма *Blastocystis* spp. Осадок фиксированного кала после ФЭО.

Окраска Лейкодиф ,ув.×1000.

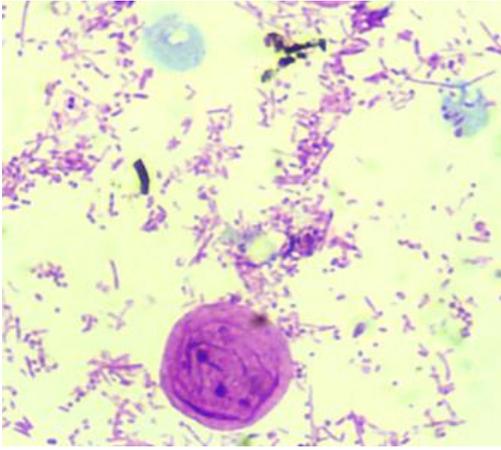


Рисунок 3.4.7. Вакуолярная форма *Blastocystis* spp. в поликсенической культуре. Окраска Лейкодиф ув. ×1000

Преимущества метода: Результаты сравнимы и даже лучше, чем при окраске по Романовскому. Общее время окраски препарата нативного кала – 8 мин, а культуры и фиксированного материала – 5. Поставляется готовый набор растворов для фиксации и окраски. Не требуются дополнительные ингредиенты и приготовление растворов.

Недостатки метода: набор не производится в России.

Метод Трихром применяется в рутинной лабораторной практике, в особенности для дифференциальной диагностики простейших кишечника при микст-инфекциях. Трихром позволяет выявить тонкую структуру цитоплазмы и ядер: количество, размеры, форму, внутреннее строение ядра (морфологию и дислокацию кариосомы, периферического хроматина и хроматоидных телец). Трихром в сочетании с фиксирующей смесью Шаудинна является, по общему мнению, «золотым стандартом» окрашивания простейших. Многие лаборатории, однако, в настоящее время вынуждены отказаться от содержащих ртуть фиксирующих смесей. Замена сулемы на соли меди или цинка дает приемлемые, но худшие результаты. Цвет фона может существенно отличаться в окрашенных трихромом препаратах. Оттенки могут варьировать в зависимости от качества мазка, соблюдения экспозиции, свежести растворов красок. Мы работали с ингредиентами фирмы SIGMA и фиксировали препараты классической смесью Шаудинна.

При окрашивании мазков нативного кала (рисунок 3.4.8) цитоплазма паразита приобретала зеленовато-голубой или зеленый цвет. Ядра и их структуры

окрашивались в красный или фиолетовый цвет. При окрашивании осадка ФЭО, т. е. фиксированных фекалий (рисунок 3.4.9), центральная вакуоль и ядра приобретали темно-красный цвет, а цитоплазма – голубой. При цитологическом исследовании культуры клеток (рисунок 3.4.10) ядра не визуализируются, а центральная вакуоль окрашивается в светло - голубоватый оттенок.

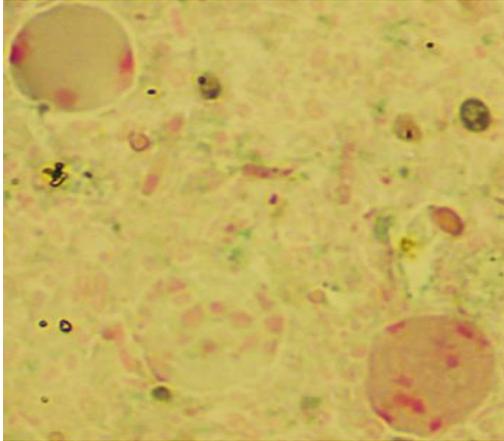


Рисунок 3.4.8. Вакуолярная форма *Blastocystis* spp. Влажный мазок нефиксированного кала. Окраска Трихром ув. x1000.

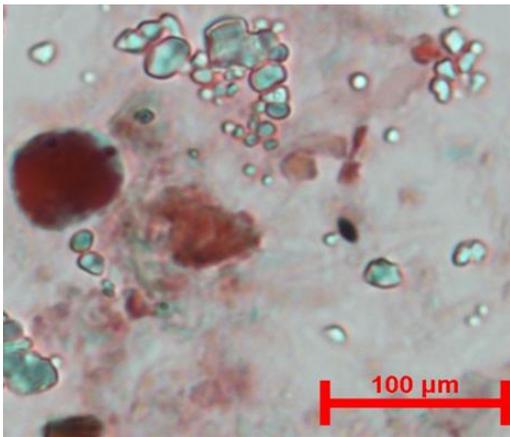


Рисунок 3.4.9. Вакуолярная форма *Blastocystis* spp. Мазок осадка ФЭО. Окраска Трихром ув. x1000.

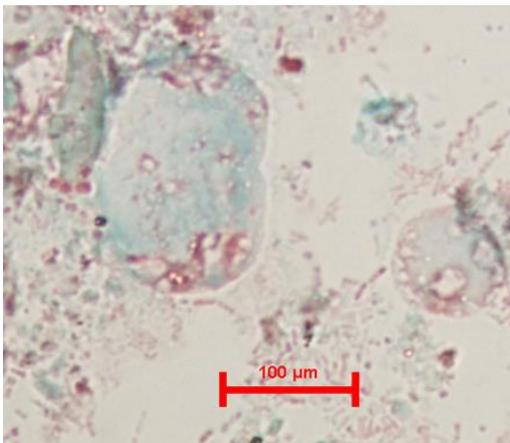


Рисунок 3.4.10. Препарат поликсенической культуры. Окраска Трихром ув. x1000.

Преимущества метода: выявляет структуру ядер, являющуюся важным систематическим признаком простейших, метод незаменим при микст-инфекциях

(бластоцист + другие простейшие), трудно дифференцируемых или мимикрирующих формах бластоцист.

Недостатки метода: Трихром не производится в РФ, необходимо приготовление более 10 емкостей фиксирующих и красящих растворов; ограничен срок хранения растворов красок, минимальное время окраски 1 стекла – 1 час 20 мин. Рекомендуемый для получения лучших результатов окраски фиксирующий состав Шаудинна содержит соль ртути – высоко токсичный ингредиент, требующий соблюдения особых мер предосторожности и утилизации.

Таким образом, из большого арсенала предлагаемых методов окраски (таблица 3.4.1.) простейших, мы выбрали один, оптимальный для бластоцист, наиболее доступный и универсальный – Романовского-Гимза и апробировали экспресс-метод – «Лейкодиф 200». Эти два метода с небольшими вариациями дают примерно однозначные результаты окрашивания в отношении цветопередачи и контраста: ядра – красно-фиолетовые, цитоплазма - голубовато-синяя. Вполне ожидаемо, что оба метода дают лучшие результаты при окрашивании тонкого и быстро высушенного мазка нефиксированного кала, вероятно за счет лучшей адгезии клеток к предметному стеклу и сохранности морфологии.

Таблица 3.4.1. Методы окрашивания *Blastocystis spp.*

Метод окраски	Окрашивание клеточных структур		Затраты времени на 1 препарат	Особенности метода		Биоматериал		
	Ядро	Цитоплазма		Преимущества	Недостатки	Натив	Поликсен. культура	Фиксирован. кал
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Трихром	Красный или фиолетовый	Зеленовато - голубой	1 час 20 мин	- «золотой стандарт» цитологической диагностики <i>Protozoa</i> ;	-лучшие результаты при фиксации раствором Шаудинна, содержащим ртуть; -более 10 отдельных емкостей для растворов; - отсутствие готовых растворов; - приготовление растворов с ограниченным сроком действия; - длительность окрашивания; - не производится в РФ;	++	++	++
Романовского - Гимза	Темно-красный или темно-фиолетовый	Бледно - голубой	Кал – 50 мин, культура клеток и осадок ФЭО – 40 минут.	- готовые растворы; -универсальный (кровь, моча, мокрота, ликвор и др.)	- результаты окраски варьируют в зависимости от качества краски фирмы-производителя, регламента и партии.	++	+	++

1	2	3	4	5	6	7	8	9
«Лейкоди ф 200»	красновато- фиолетовый	Голубой, синий	10 минут – нативны й кал; 8 – минут культура и осадок ФЭО	- экспресс метод; - готовый набор красок; - универсальный (кровь, моча, мокрота, ликвор и др.)	- не производится в РФ.	++	+++	+++

Примечание: +++ - хорошо выявляются ядро и структуры цитоплазмы, ++- плохо выявляются ядро и структура
цитоплазмы, +- не выявляются структуры клетки.

Преимущества и недостатки исследуемого нативного и фиксированного биоматериала материала представлены в таблице 3.4.2.

Таблица 3.4.2 Преимущества и недостатки исследуемого материала при окрашивании

	Нативный материал	Фиксированный материал после концентрации ФЭО
Преимущества	Сохранение морфологии, подвижности и адгезивных свойств клеток	Получение максимального количества объектов в препарате
	Возможность сочетания разных методов диагностики	Возможность транспортировки и повторных исследований
	Приготовления постоянных препаратов	Длительное хранение
Недостатки	Малое количество клеток в препарате	Изменение морфологии объектов при несоблюдении правил сбора материала
	Сложности при сборе и времени доставке	Снижение адгезивных свойств

Вероятно, что при адгезии к стеклу и распластывании клеток возбудителя естественным путем отсекаются отмирающие и деградирующие организмы. За счет этого результаты окрашивания физиологически полноценных клеток получаются более четкими. При выполнении этих условий наиболее оптимальным для КДЛ является готовый набор Лейкодиф 200. Мы впервые применили его для окраски *Blastocystis* в кале и подобрали регламент окрашивания. Возможность заказа готового для использования набора и быстрое выполнение процедуры окрашивания (8 мин) позволяют считать его наиболее подходящим для экспресс-диагностики и рекомендовать в практику КДЛ. Эффективность применения методов окрашивания зависит также от интенсивности инфекции. Вполне

очевидно, что поиски единичных окрашенных клеток при увеличении 1000× потребуют много времени.

Метод Трихром остается «золотым стандартом» для дифференциальной диагностики случаев часто встречающихся микст-инфекций и трудно дифференцируемых простейших в кале. Желательно его иметь в арсенале лабораторий экспертного уровня.

3.5. Обнаружение *Blastocystis spp.* при атипичной локализации в слизистой влагалища

Полиморфная природа *Blastocystis* и отсутствие стандарта морфологической диагностики паразита затрудняют их идентификацию и интерпретацию лабораторных результатов. При рутинных микроскопических исследованиях чаще всего обнаруживают вакуолярные, реже гранулярные и совсем редко амeboидные и цистные формы паразита. При подозрении на внекишечную локализацию бластоцист крайне важно определить морфоформу паразита в зоне поражения. Маркером клинического значения инфекции может быть находка в биоматериале амeboидных форм, так как очевидность патогенной роли этой клетки паразита установлена *in vitro* [135].

Нами представлен оригинальный материал по расшифровке не венерической инфекции, обусловленной паразитированием *Blastocystis* в зоне влагалища с оценкой диагностической ценности микроскопического исследования.

Описание случая. Пациентка Ш. 49 лет, обратилась в КДЛ ИМПТ и ТЗ им. Е.И Марциновского Сеченовского Университета с целью установления этиологии острого вагинита. Она наблюдалась в течение года в Московском областном онкологическом диспансере в связи с проведением специфического лечения (хирургическое, химио - и лучевая терапия) по поводу рака матки. Терапия привела к стабилизации процесса, однако, появились жалобы, связанные с обильными выделениями из влагалища, сопровождающимися болями, раздражением и зудом. Результат цитологического исследования мазка со слизистой влагалища из онкологического диспансера: обилие полиморфноядерных лейкоцитов и эритроцитов, слущенного плоского эпителия разной степени дезинтеграции,

скопление кокко – бактериальной флоры и незначительное числа амёб.

Для уточнения этиологии процесса пациентка Ш. обратилась за консультацией в Институт Марциновского, где были выполнены лабораторно – диагностические процедуры, проведенные *ex tempore*:

1. Взятие мазков со слизистой влагалища с последующей фиксацией и окрашиванием препаратов по Романовскому - Гимза;
2. Посев материала на среду Павловой.

В связи с отрицательным результатом первичного посева, диагностические процедуры проведены повторно через неделю. Отрицательный результат посева на среду Павловой был полностью компенсирован данными цитологического исследования окрашенных по Романовскому мазков. В результате микроскопического изучения препаратов подтверждена цитологическая картина воспаления слизистой влагалища: наличие полиморфно–ядерных клеток и эритроцитов при значительном количестве слущенного плоского эпителия разной степени дезинтеграции. Следует отметить скопление кокко–бактериальной флоры. Окрашивание способствовало выявлению небольшого числа вакуолярных форм бластоцист с четко выраженным ядром в краевом расположении и необычных клеток с псевдоподиальной активностью. Были также обнаружены овально-сферические или асимметричные шизонтоподобные образования, наполненные дочерними клетками разной степени зрелости. Показано разнообразие форм (округлая, овальная, вытянутая) и размеров клеток (3-7 мкм, 7-12 мкм, 18-25 мкм), а также варьирующая интенсивность окрашивания цитоплазмы и вакуолярных включений (рисунки 3.4.1.1-3.4.1.5).

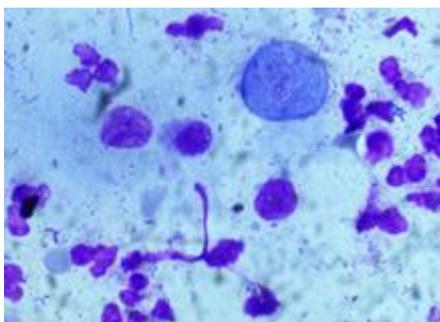


Рисунок 3.4.1.1. Вакуолярная форма *Blastocystis spp* с четко выраженным ядром в краевом положении в слизистой влагалища. Окраска по Романовскому - Гимза ув. x1000

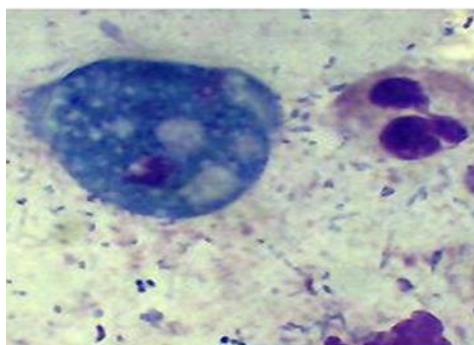


Рисунок 3.4.1.2. Вакуолярная форма *Blastocystis spp.* с гранулярными включениями в слизистой влагалища. Окраска по Романовскому - Гимза ув. x1000

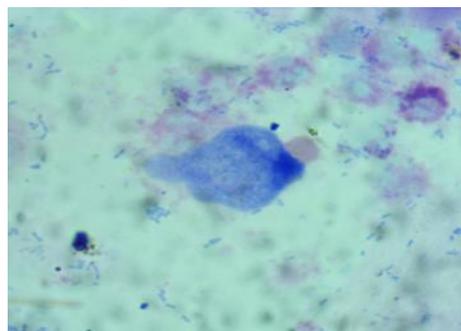
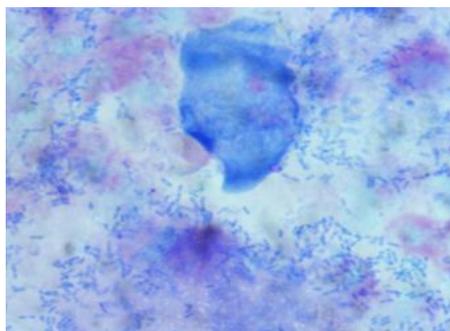


Рисунок 3.4.1.3. Амебодная форма *Blastocystis spp* с псевдоподиальной активностью в вагинальном мазке пациентки Ш. Окраска по Романовскому - Гимза ув. x1000

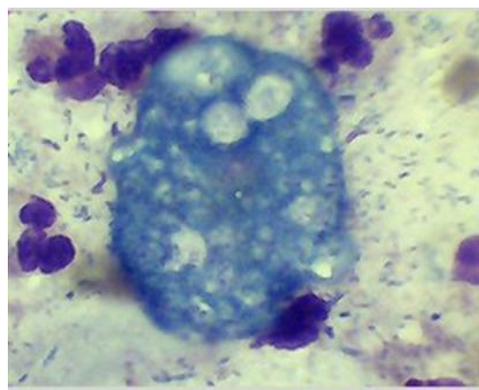
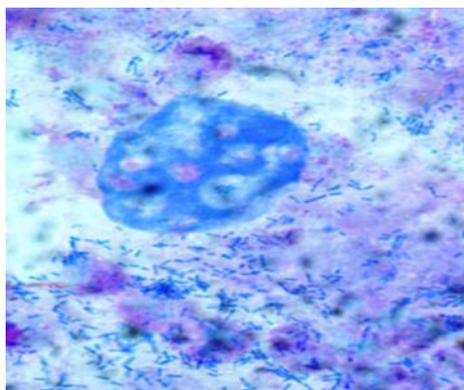


Рисунок 3.4.1.4. Шизонтоподобные формы паразита, наполненные дочерними образованиями разной степени зрелости с тенденцией к выходу из клетки в вагинальном мазке пациентки Ш. Окраска по Романовскому - Гимза ув. x1000

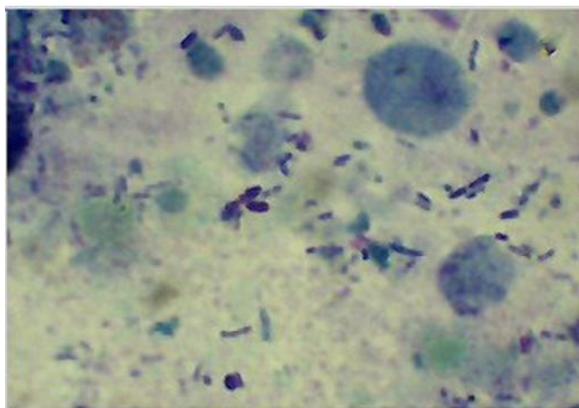


Рисунок 3.4.1.5. Небольшие, округлой формы образования с конденсированной цитоплазмой, предположительно представляющие вышедшее потомство *Blastocystis* в вагинальном мазке пациентки Ш. Окраска по Романовскому - Гимза ув. x1000

Современные исследователи рассматривают бластоцисты, как неинвазивного представителя просвета толстого кишечника человека и многих других видов хозяев без предпочтения к какому-то либо из них. Эта особенность свидетельствует о высоком уровне пластичности и адаптогенности *Blastocystis* к меняющимся условиям паразитирования. Вероятность такого предположения подтверждает малоизвестная публикация польских авторов Wolynska M. & Soroczan W. [148]. При обследовании 312 крестьянок на наличие паразитарных

инфекций женских половых органов авторам удалось выявить разную степень зараженности *Blastocystis* у 47 женщин (11,5 %), *Trichomonas vaginalis* (60%), *Enterobius vermicularis* (8,6%), и дрожжеподобными грибами рода *Monilia* (3,4%). В 16 случаях обнаружены бластоцисты в соскобах со слизистой прямой кишки, 22 случая во влагалище и в 9 случаях в обеих зонах (вагинальной и ректальной). У инфицированных диагностированы кольпиты, цервикальные эрозии, отнесенные к наличию инфекций за счет низкого уровня личной гигиены.

Изложенное позволило с особым вниманием отнестись к результатам обнаружения бластоцист в мазках влагалища, даже при отрицательных посевах на среду Павловой в случае диагностики иных видов *Protista*, включая трихомонад. Нахождение паразита в деструктивной зоне слизистой влагалища возможно объясняет неспособность его роста на бедных водносолевых средах. Выявление в препаратах пациентки Ш., окрашенных по Романовскому – Гимза, разнообразных и необычных форм бластоцист на фоне слущенного плоского эпителия, лейкоцитов и эритроцитов свидетельствовало в пользу активно протекающего процесса с участием *Blastocystis*. Полученные результаты послужили основанием для назначения курса специфической противопаразитарной терапии метронидазолом с хорошим эффектом.

В современных публикациях имеются противоречивые данные о шизогонии как индикаторе тканевой инфекции, вызванной *Blastocystis*, так как процесс был зафиксирован только световой микроскопией без подтверждения методами электронной микроскопии [90]. Имея конечной целью поиск стадийно – специфических молекулярных маркеров паразита, современный подход не исключает дальнейших исследований по изучению variability репродуктивных процессов *Blastocystis* всеми доступными способами.

За последние несколько лет в КДЛ Института Марциновского при цитологическом исследовании окрашенных препаратов из культуры, гнойного отделяемого, мазков слизистых и\или фекалий с патологическими примесями (слизь, кровь) с достоверностью установлено 9 случаев клинически выраженной тканевой инфекции, обусловленной наличием *Blastocystis* в фазе шизогонии [37].

Полученные данные позволили обозначать проблему взаимосвязи клинического проявления инфекции с морфологией паразита. Данное положение должно быть протестировано не только с учетом расширяющегося алгоритма диагностики идентифицируемых морфотипов *Blastocystis* (нативная микроскопия, посев, исследование постоянно окрашенных препаратов, определение субтипа изолята), но и с точки зрения досконального уточнения сведений о пациентах: сопутствующие заболевания, иммунный статус, характер и длительность медикаментозной терапии. Комментируя данные клинико – диагностического наблюдения с точки зрения статуса пациента, необходимо акцентировать внимание на снижение иммунной реактивности макроорганизма за счет онкологического процесса (рака матки) в стадии стабилизации. Тогда становится реальным предположение, что возможность развития инфекции, обусловленной *Blastocystis* в зоне слизистой оболочки влагалища, связана с активными структурными изменениями в пограничной ткани за счет атак радиационного и\или химического характера, а также высокими адаптивными возможностями морфотипов паразита – анаэроба существовать в аэробных условиях.

Описанное наблюдение по верификации активно протекающего процесса, обусловленного *Blastocystis* в зоне слизистой влагалища, существенно расширяет представления о клиническом значении паразита на фоне вторичного иммунодефицита.

ГЛАВА 4. АПРОБАЦИЯ И ОЦЕНКА СПЕЦИАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *BLASTOCYSTIS SPP*

4.1. Культивирование как метод идентификации *Blastocystis spp.*

Необходимость верификации образцов исследуемого материала на наличие *Blastocystis*. потребовала обеспечения успешного выделения и поддержания бластоцист *in vitro*. Согласно данным литературы [57], паразит настолько хорошо культивируется, что его коротко живущие изоляты могут быть использованы в качестве метода детекции паразита при отсутствии возможности проведения молекулярно–генетических тестов. В этом отношении изолят и/или культура паразита играют роль положительного контрольного образца, источника биомассы для проведения генетических исследований, а также стабильного ресурса в качестве справочного или обучающего материала.

В данной главе представлены результаты о диагностической ценности метода культивирования в детекции бластоцист при сравнении с методом рутинной микроскопии исследуемых образцов после обогащения на основе ФЭО. Кроме того, проанализированы результаты наблюдений по выделению и поддержанию на среде Павловой изолятов бластоцист от разных групп лиц с выраженными и/или неясными симптомами проявления кишечной инфекции. В случае непрерывного поддержания *Blastocystis* в культуре, удалось проследить наличие и соотношение основных морфоформ паразита, используя методику посева в качестве важного механизма определения его биологических свойств.

За последние 3 года при обследовании 154 пациентов на наличие инфекции *Blastocystis* был оценен метод посева материала на среду Павловой, результаты которого представлены в таблице 4.1.1

В нашей работе чувствительность и специфичность (таблица 4.1.1.) метода культур в сравнении с микроскопией на базе обогащения материала в ФЭО была зафиксирована как 96,6% и 18,94% соответственно. Эффективность метода культивирования при данных операционных характеристиках теста не превышала 48,7%. Это может быть связано с двумя принципиальными ограничениями метода

получения культур: форма (характер) существования паразита в момент посева и влияние сопутствующей микрофлоры (зарост или гибель метаболически активных микросимбионтов). Известно, что в некоторых случаях внесение бактерий из фекалий человека может привести к увеличению роста *Blastocystis* в культуре [119].

Таблица 4.1.1. Сравнительная оценка методов микроскопии и культивирования в детекции бластоцист

Число исследуемых образцов	Результаты			
	ФЭО		Посев	
154	Положительные	59	57	Истинно положительные (ИП)
			2	Ложноотрицательные (ЛО)
	Отрицательные	95	77	Ложноположительные (ЛП)
			18	Истинно отрицательные (ИО)

$$\chi^2 = 6.884, P = 0.009$$

Чувствительность, специфичность и точность рассчитывались по формулам:

$$\text{ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ} = \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО}),$$

$$\text{Чувствительность} = 57 / (57 + 2) * 100\% = 96,6\%$$

$$\text{СПЕЦИФИЧНОСТЬ} = \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП}),$$

$$\text{Специфичность} = 18 / (18 + 77) * 100\% = 18,9\%$$

$$\text{ТОЧНОСТЬ} = (\text{ИП} + \text{ИО}) / (\text{ИП} + \text{ИО} + \text{ЛО} + \text{ЛП}) * 100\%$$

$$\text{Точность} = (57 + 18) / (57 + 18 + 2 + 77) * 100\% = 48,7\%$$

Большинство ранее опубликованных работ [47, 63] показали, что метод культивирования более эффективен при детекции бластоцист, чем метод микроскопии, но менее чувствителен, чем ПЦР [58, 119, 126]. Однако, по данным других авторов [101], оба метода в совокупности существенно увеличивают находки *Blastocystis* и могут быть полезны как действенный, уместный и альтернативный инструмент в идентификации паразита особенно в диагностических лабораториях, не оснащенных ПЦР оборудованием.

Данные ретроспективного анализа ранее проведенных наблюдений (134 человек) с целью выделения бластоцист от разных групп лиц согласуются с мнением исследователей из Индии и Таиланда, существенно дополняя его вариативностью результатов в зависимости от источника и характера материала. Наблюдения, сведенные в таблицу 4.2, констатируют следующее:

✓ наличие почти у половины обследуемых (64 из 134, т.е. 47,76%) основных обитателей толстого кишечника, относящихся к представителям семейства *Entamoebae* (14 изолятов) и *Blastocystis* (50 изолятов). Данные, согласующиеся с мнением других авторов [25], указывают на адекватность используемой среды для выделения назначенных паразитов, а также свидетельствуют о существовании среди обследуемых микст-инфекций: амебы + бластоцисты (2 случая);

✓ обнаружение *Blastocystis* среди обследованных не превышало 37,31% (50 из 134 посевов) с колебанием от 15,78% до 63,95% среди разных групп. Наиболее значимое число изолятов бластоцист зарегистрировано среди обследованных 2-ой группы, т.е. у пациентов с хронической, вялотекущей симптоматикой расстройств ЖКТ (23 из 36 посевов, т.е. 63,9%). Столь же существенное число изолятов получено от лиц без наличия расстройств ЖКТ (9 из 18 посевов, т.е. 50%), т.е. в 3-ей группе;

✓ эффективность метода культивирования в идентификации *Blastocystis* среди лиц с предварительно установленной инфекцией бластоцист методом обогащения (группы 1-4) достигала 48,71% (38 изолятов из 78 посевов). Однако у пациентов 1-ой группы, страдающих острым расстройством ЖКТ и даже при наличии патологических включений в исследуемых образцах (слизь, кровь), число выделенных изолятов оказалось наименьшим (3 из 19 посевов, т.е. 15,78%);

✓ обнаружение паразитов в группе с высокой дифференциально - диагностической значимостью теста (гр 5) также была невелика, т.е. 21,42% (12 изолятов из 56 посевов).

Таким образом, становится очевидным, что в противовес мнению, существующему в литературе [57], *Blastocystis* не являются паразитом, который

может быть легко изолирован в культуру. Неудачи в получении изолятов бластоцист от лиц с клинически выраженной инфекцией косвенно упоминаются в ряде работ, связанных с выделением бластоцист для генетического анализа, а также в обзоре по культивированию паразита [152, 137].

Таблица 4.1.2. Идентификация *Blastocystis* методом выделения изолятов на среде Павловой от инфицированных лиц

№ группы	Характеристика лиц (пациентов)	Число посево в	Изоляты <i>Blastocystis</i>		Изоляты семейства <i>Entamoebae</i>		Выделено всего	
			Абс.	%	Абс.			
1.	Острые расстройства ЖКТ в т.ч с патологическим признаками	19	32*	5,7	52*	6,3	8	42,1
2.	Расстройства ЖКТ с хрон. вялотекущей симптоматикой	36	23 6 ++ 8+ 1∞	63,9	1	2,8	24	66,7
3.	Без нарушений функции ЖКТ	18	9	50,0	0	0	9	50,0
4.	Аллергические проявления	51∞	3+	60,0	0	0	3	60,0
5.	Дифференциальный лабораторный диагноз, идентификация обследование	56	12 2+	21,4	8	14,3	20	35,7
Итого		134	50	37,4	14	10,44	64	47,7

Примечание: *- микст – инфекция, + – короткоживущие, ++ – длительноживущие, ∞ - редкий феномен.

Жизнеспособность паразита в культуре при переносе из естественных в искусственные условия существенно меняется и не только за счет сдвига в

сопутствующем микробиоценозе, но и в связи с исходным состоянием паразита при посеве, т.е. его потенцией к росту. Важно напомнить, что хозяин может предоставлять разные условия паразиту в случае бессимптомного носительства или при различных патологических состояниях, когда характер паразита остается неясным. Исследования в этом направлении редки или носят фрагментарный характер [95, 101].

Мы располагаем небольшим числом наблюдений, связанных с особым характером клеток *Blastocystis* при посеве на среду Павловой. Необычность ситуации и интерес был вызван отрицательным результатом двукратного посева свежесделанного материала в случае колонизации и размножения паразита в тканях слизистой владалища и лимфоидной ткани миндалин [37]. В данных наблюдениях микроскопия постоянно окрашенных препаратов по Романовскому-Гимза показала, что исходными формами при посеве были клетки, отражающие процесс размножения *Blastocystis* по типу шизогонии. Аналогичный результат был отмечен и при внесении в среду шизонтообразующихся клеток *Blastocystis spp* из патологического материала больных из 1 группы с расстройством ЖКТ (слизь, кровь).

Наличие клинически-выраженных признаков у больных с традиционной и, что особенно важно, атипичной локализацией *Blastocystis spp* в совокупности с обнаруживаемыми морфoформами шизонтов, свидетельствует в пользу поражения бластоцистами ткани колонизируемого органа (кишечник, слизистая владалища, лимфоидная ткань миндалин).

Доказательством существования феномена шизогонии при тканевой инфекции *Blastocystis* явилось обнаружение клеток шизонтов у больных с клинически выраженной инфекцией *Blastocystis spp* при наличии патологических примесей в случаях расстройств ЖКТ. Эти явления можно было наблюдать при идентификации бластоцист у 4 стационарных и амбулаторных больных г. Москвы. В постоянно окрашенных по Романовскому - Гимза препаратах (2 стационарных больных) и свежем нативном материале (2 амбулаторных больных) были найдены *Blastocystis* в фазе размножения по типу шизогонии [37].

В целом, из 9 достоверно диагностированных случаев поражения ткани бластоцистами, подтвержденных наличием развивающегося паразита по типу шизогонии, каждый из 5 случаев посева не имел развития в условиях среды Павловой.

Вероятность такого исхода вполне реальна, если предположить, что шизонты, как тканевые формы паразита, не способны к молниеносной адаптации и росту в условиях «голодной» среды. Это позволило обозначить проблему взаимосвязи клинических проявлений инфекции с формой развития паразита.

Поддержание изолятов на среде Павловой, помимо особенности их выделения, сопряжено также с рядом зафиксированных вариаций. Помимо подтверждения возможности существования бластоцист *in vitro* в виде коротко- и долгоживущих изолятов, отмечен вариант длительного (до 1 мес) наблюдения бластоцист в исходной пробирке при отсутствии роста при пересеве, а также необычная вспышка роста клеток (1-3 дня) сразу при внесении в пробирку обычной дозы материала.

О вариабельности существования изолятов бластоцист *in vitro* можно судить по кратким наблюдениям ряда авторов [18, 45], так как большая часть работ по культивированию бластоцист связана с решением проблемы их диагностики.

С методической точки зрения наиболее достоверным подходом в изучении морфоформ паразита является идентификация *Blastocystis* при микроскопии препаратов непосредственно из культуры, так как, по мнению современных авторов [58], морфология и число описанных типов клеток [158] может быть не всегда достаточно верно истолкованной, в связи с вероятно значимо большим воздействием кислорода на паразита вне организма, чем *in vivo* [58].

Возможность непрерывного наблюдения за изолятами при еженедельной реинокуляции клеток бластоцист на свежую среду позволила подтвердить концепцию Zierdt и его последователей [134] о полиморфизме бластоцист, несмотря на его анаэробную природу.

Помимо обнаружения приоритетно существующих ВАФ и ГРАФ форм (рисунок 4.1.3. А, В), в культуре можно было обнаружить амебоидные (рисунок

4.1.3. Г) и иные, так называемые, «переходные» [4] и/или делящиеся формы (рисунок 4.1.3. Д, Е): мультивакуолярные, кластерные, цистоподобные (рисунок 4.1.3 Б) и весьма редкие гигантские клетки (рисунок 4.1.3. Ж), функциональная роль которых, как и иных форм, остается неясной. Соотношение указанных морфоформ внутри 3-х длительно живущих изолятов («К», «Л», «Х»), по данным усредненного и индивидуального подсчета каждого типа клеток бластоцист на протяжении месяца, представлено в виде рисунка 4.1.1. - 4.1.2.

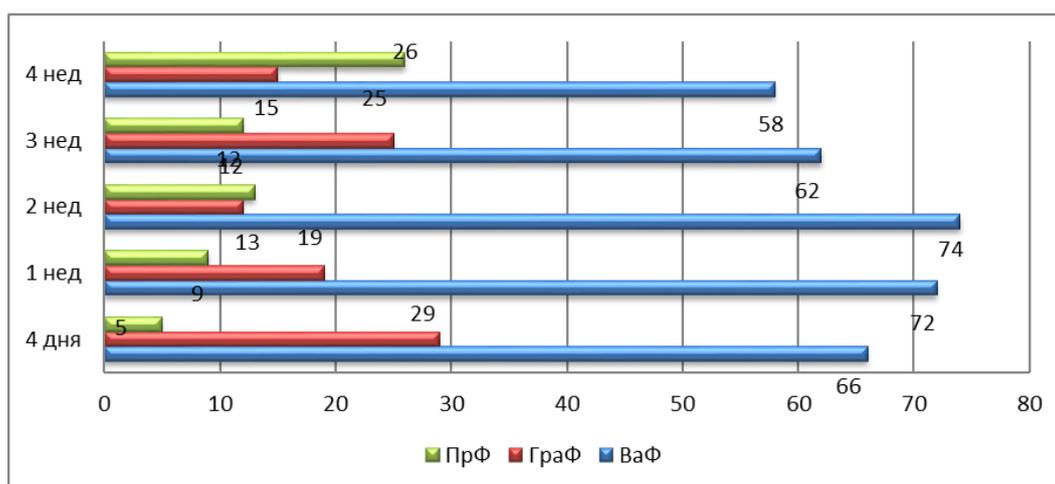


Рисунок 4.1.1. Средние показатели соотношения морфоформ бластоцист (ВаФ и ГраФ) в разные сроки культивирования 3-х изолятов

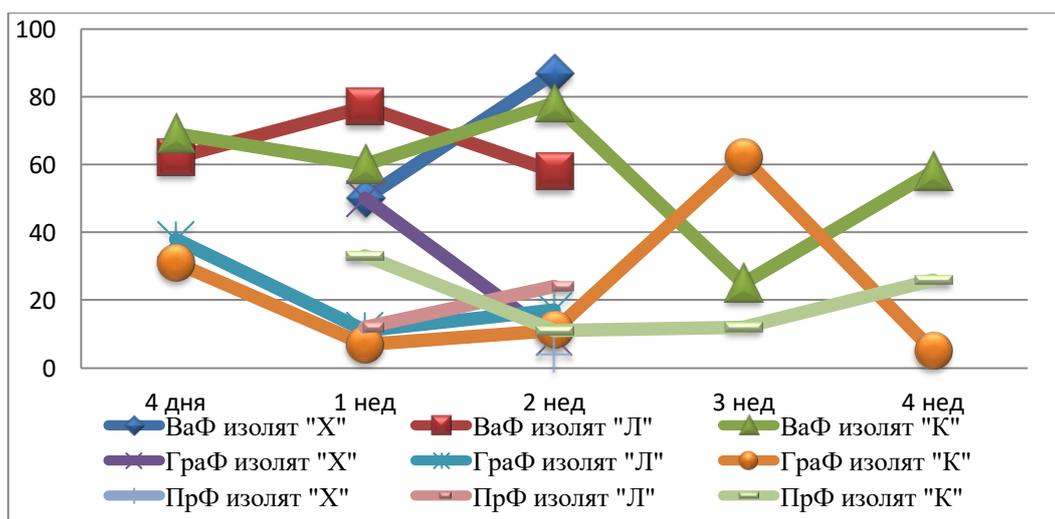


Рисунок 4.1.2. Индивидуальные кривые соотношения морфологических форм (%) бластоцист 3-х изолятов в разные сроки культивирования

На рисунке 4.1.1. отражено существенное преобладание ВаФ с тенденцией к умеренному увеличению их численности на 2-ой неделе наблюдений (от 66 до 74 в

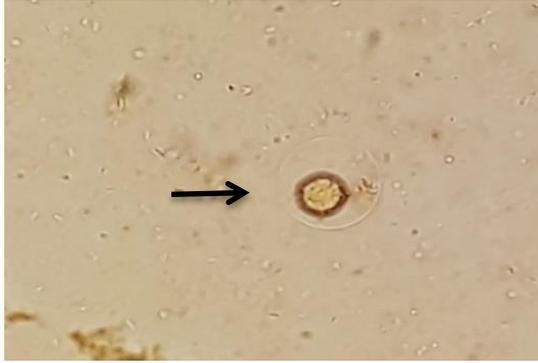
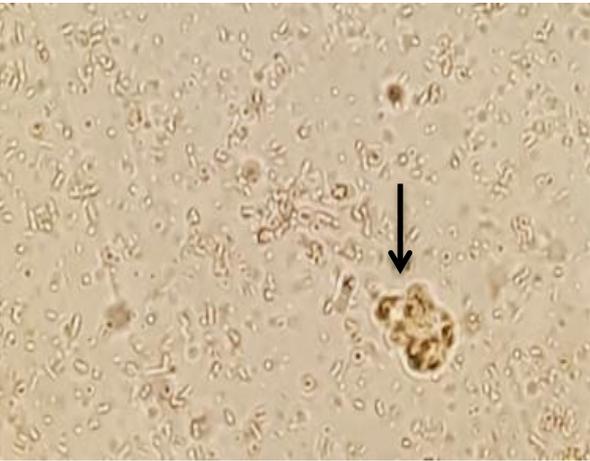
препарате) при синхронном уменьшении ГРАФ (от 29 до 12) в противовес последовательному накоплению «прочих» - переходных и/или делящихся форм (от 5-9-12 клеток до 15 – 26) к четвертой неделе. Данные были использованы, чтобы охарактеризовать динамику указанных морфоформ в процессе функционирования системы клеток бластоцист внутри наблюдаемых долгоживущих изолятов. Полученные результаты расходятся с наблюдениями в соотношении морфоформ изолята, выделенного от носителя, но поддерживаемого на сходной среде [13]. Динамика развития клеток бластоцист в этой культуре, оказалась иной: гранулярные формы превалировали над вакуолярными, достигая 100% на поздних стадиях рекультивирования изолята (через два месяца от начала эксперимента).

Соотношение морфоформ, существующих среди коротко - и длительноживущих изолятов, как функционирующих клеточных систем с гетерогенными свойствами, требует специального рассмотрения в качестве предмета принципиального изучения своеобразия морфологии и жизнеспособности клеток. Пионерская работа Yason J A, Tan R S W [150], выполненная на основе проточной цитометрии, доказала экстенсивность морфологического разнообразия внутри изолятов *Blastocystis*. Наше внимание было сосредоточено на корректной идентификации своеобразных характеристик паразита с использованием различных методических подходов микроскопической диагностики.

Из хорошо известных и общепринятых морфоформ во всех изолятах идентифицированы ВАФ, ГРАФ, реже АМФ. Размеры, форма и внутренний состав (содержимое, характер) клеток (включения, вакуоли, гранулы, наличие ядра) демонстрировали существенную вариабельность. Находки необычных форм *Blastocystis spp*, в частности гигантские клетки, наблюдаемых у ряда изолятов, были подтверждены методом микроскопии постоянно окрашенных препаратов. Помимо небольшого числа, эти формы можно было идентифицировать только в длительноживущих культурах. Образования представляли собой извитые комплексы внешних мембран, содержащие разное число гранулярных тел. Необычные по прозрачности клетки, как правило, не имели цитоплазмы и обладая,

экстремальными размерами (50-100 мкм), определялись как Giant клетки [158], роль которых, так же, как и иных промежуточных форм пока неясна.

Непосредственного перехода одних форм в другие не зафиксировано. Однако наличие размножающихся форм свидетельствовало в пользу развития и активного функционирования клеточной системы бластоцист *in vitro*.

	
<p>А. Вакуолярная форма с периферийными ядрами (стрелочка). Вакуолярная форма с полупрозрачной цитоплазмой и без выступающих ядер (звездочка) (Ув.10 x40).</p>	<p>Б. Цистоподобная форма (стрелка, показывающая формирование цисты внутри дегенерирующих клеток) (ув. 10x40).</p>
	
<p>В. Гранулярная форма (ув. 10x40).</p>	<p>Г. Амебоидная форма <i>Blastocystis</i> с псевдоподиями (ув.10 x40).</p>

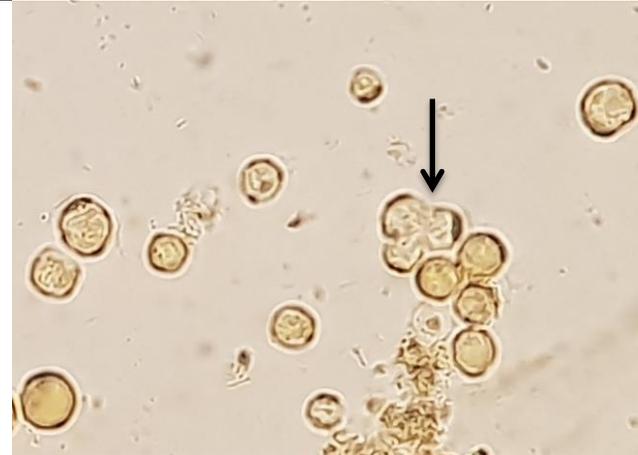
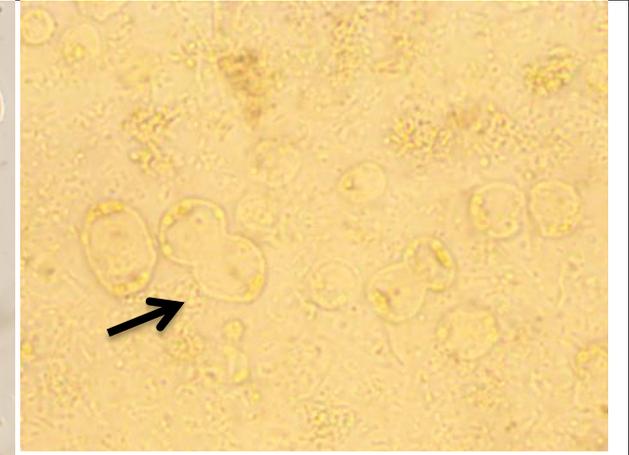
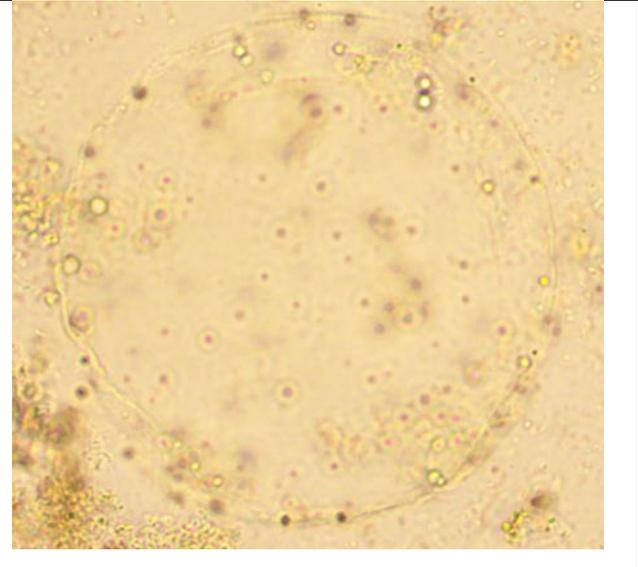
	
<p>Д. Почкование (ув. 10x40).</p>	<p>Е. Процесс бинарного размножения, показывающий деление цитоплазмы (ув. 10x40).</p>
	
<p>Ж. Гигантская клетка - извитые комплексы внешних мембран, содержащие разное число гранулярных тел (ув 10x40).</p>	<p>И. Эндодиогения</p>

Рисунок 4.1.3. Морфологические формы *Blastocystis spp.* в поликсенической культуре, окрашенные 2% раствором Люголя

Проведенные исследования показали, что точность метода культивирования в детекции *Blastocystis* не превышала 48,7% при чувствительности и специфичности теста 96,6% и 18,94% соответственно. Существенные колебания в выявлении бластоцист (от 15,78% до 63,9%) зависели как от характера

обследуемых, так и от морфотипов паразита, вносимых в среду. Отрицательный результат посева, подтверждающий такую возможность, получен в случае впервые установленной атипичной локализации *Blastocystis* в ткани слизистой влагалища с размножающимися морфоформами по типу шизогонии. Это позволило обозначить проблему взаимосвязи клинического проявления инфекции с формой существования паразита и заключить, что метод идентификации паразита *in vitro* не может заменить микроскопию, однако при совместном использовании должен быть признан действенным инструментом обнаружения бластоцист, особенно в слабо оснащенных диагностических лабораториях.

Следует также подчеркнуть, что метод культивирования крайне необходим для изучения морфофункциональных и фенотипических особенностей изолятов *Blastocystis* с оценкой вариабельности развивающихся морфоформ, роль которых до настоящего времени неясна, но в дальнейшем сможет содействовать более точной идентификации паразита при разных условиях существования. Выделение изолятов *Blastocystis* на среде Павловой от инфицированных лиц с симптомами расстройств ЖКТ или их отсутствием показало высокую степень вариабельности ростовых свойств паразита *in vitro*: наличие коротко- и долгоживущих образцов с непостоянным соотношением культивируемых морфоформ при их высоком полиморфизме. Одно из своеобразных свойств паразита, проявляющееся наличием неокрашиваемой круговой полосы по периферии клетки, позволяет выделять и корректно идентифицировать бластоцисты с помощью световой микроскопии.

4.2 Оценка иммунологического метода лабораторной диагностики CoproELISA *Blastocystis*

Ведущая роль в лабораторной диагностике бластоцист до настоящего времени принадлежит методам световой микроскопии, позволяющей на основе характера их морфологических свойств, установить паразитологический диагноз. Учитывая полиморфизм паразита и вариабельность изолятов *Blastocystis*, актуальность поиска новых, чувствительных и доступных методов диагностики возрастает.

В последние годы для верификации диагноза паразитоза все большее значение приобретают методы, не требующие квалификации и опыта врача КДЛ. В большинстве случаев одни и те же технологии могут быть адаптированы к определению АГ и/или АТ, каковым является Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). При разработке данного теста источником получения специфического АГ служила культура *Blastocystis* ST–3 или сумма ST – 1, 2, 3 и 5. По мнению авторов, сочетание указанных субтипов позволяет выявить более 95% случаев инфекции бластоцист, циркулирующих у человека.

Относительно новый и пока еще мало применяющийся тест был исследован на 179 образцах фекалий в Турции [62]. В качестве референс – метода использовали: мазок, окрашенный раствором Люголя, культуру и РИФ. В зависимости от референс–метода чувствительность и специфичность варьировала как 82-92%.

Нашей задачей было сравнить ИФА с модифицированным методом ФЭО. Микроскопическая характеристика, изученных в ИФА образцов (культура, фекалии) представлена в таблице 4.2.1. Испытание коммерческой тест-системы проведено на 122 образцах, из которых 116 представлены фиксированными пробами фекалий, предварительно исследованных в ФЭО (референс-метод) на наличие различных паразитов кишечника. Важный момент при испытании теста, это единообразие методики, характера, сбора, хранения и доставки материала для исследования. Такой подход необходим для сохранения растворенного АГ *Blastocystis*. Все исследуемые образцы до проведения реакции хранили при 0 - +5°C не более 30 дней в консерванте Турдыева.

Из исследованных в ИФА образцов, 30 не содержали кишечных паразитов, а 34 образца содержали: *Lambliа intestinalis* – 4 (3,28%); *Entamoeba coli* – 9 (7,38%); *Dientamoeba fragilis* – 4(3,28%); *Endolimax nana* - 9 (7,38%); *Chilomastix mesnili* - 2 пробы (1,64%); *Entamoeba hartmanni* – 1 (0,82%); *Iodamoeba butschlii* - 2 (1,64%); *Diphyllobothrium spp*- 1 (0,82%); и *Opisthorchis felineus* – 2 (1,64%). Наиболее представительной была испытываемая группа образцов, содержащая 52 пробы с наличием разного числа бластоцист.

Таблица 4.2.1 Характеристика исследуемых проб кала и культуры *in vitro*

Биоматериал	Возбудитель	Количество образцов	Результат			
			ФЭО		CoproELISA® Blastocystis	
			+	-	+	-
Культура (К+)	<i>Blastocystis spp</i>	6	6	0	6	0
Фиксированный кал в консерванте Турдые ва	<i>Blastocystis spp</i>	52	52	0	37	15
	<i>Chilomastix mesnili</i>	2	2	0	0	2
	<i>Dientamoeba fragilis</i>	4	4	0	0	4
	<i>Diphyllobothrium spp</i>	1	1	0	0	1
	<i>Endolimax nana</i>	9	9	0	0	9
	<i>Entamoeba coli</i>	9	9	0	2	7
	<i>Entamoeba hartmanni</i>	1	1	0	1	0
	<i>Iodamoeba butschlii</i>	2	2	0	0	2
	<i>Lambia intestinalis</i>	4	4	0	0	4
	<i>Opisthorchis felineus</i>	2	2	0	1	1
	Отрицательный контроль (К-)		30	0	30	3
Всего		122	92	30	50	72

Результаты испытания теста указывают, что 3 из 30 проб отрицательного контроля (оптическая плотность (ОП) - 0,40; 2,66 и 2,73) были положительны в ИФА. Этот факт, вероятнее всего, свидетельствует о высокой чувствительности апробируемого метода в выявлении бластоцист, так как антиген может быть идентифицирован в случае разрушения или деструкции клеток, но при условии его сохранения в фиксированных образцах.

Ложноположительные результаты теста зафиксированы в образцах: с *Entamoeba coli* (ОП 2,40 и 2,05) и с *E. hartmanni* (ОП 0,44). Если положительная реакция (ОП 0,9), зарегистрированная в случае с *O. felineus*, возможно объясняется вышеуказанными предположениями, то ложноположительный результат анализа (ОП 2,40; 2,15 и 0,4) с двумя видами амеб вызывает настороженность. Вероятно, это связано с морфологической гетерогенностью паразита. Наличие множества морфотипов и вариации форм и размеров осложняет идентификацию паразитов даже для опытного персонала КДЛ [4, 26, 129]. Например, цисты *E. coli* (ОП 2,40 и 2,05) были определены нами в двух образцах осадка ФЭО, однако методом ИФА, они были идентифицированы как бластоциты. По-видимому принятые за *E. coli* многоядерные цисты (рисунок 4.2.1) относились к морфотипу бластоцист впервые описанному [130] при электронной микроскопии изолятов от обезьян *Macaca sp* и *Presbytis sp*.

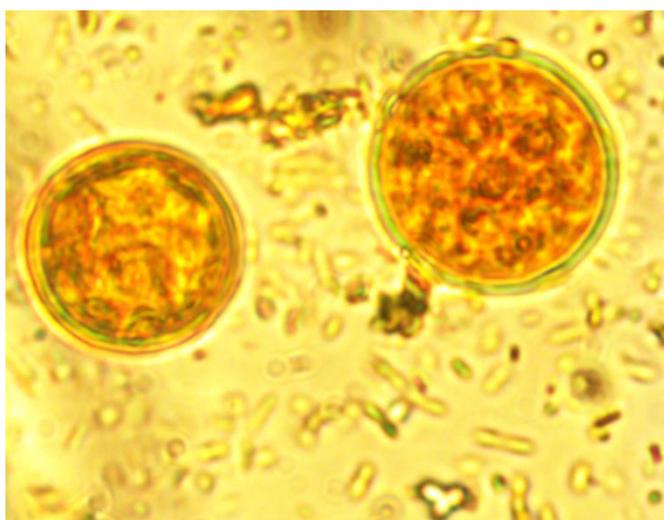


Рисунок 4.2.1. Многоядерная циста *Blastocystis* (ув., x1000, окраска 2 % р-р Люголя)

Число образцов с наличием бластоцист является самой представительной группой, изученной в ИФА. Таблица 4.2.1 демонстрирует, что только 37 из 52 (71,1%) проб дали положительный результат на наличие специфичного антигена *Blastocystis*, т. е. примерно в 1/3 проб растворимый АГ бластоцист не обнаружен.

Полученные результаты возможно объяснить: зависимостью чувствительности теста от интенсивности инфекции в образцах; условиями получения, хранения и доставки материала (проб); формой и/или клиническими проявлениями инфекции, а также спектром поликлональных антител, соответствующих субтипов, циркулирующих на данной территории. Если учитывать степень генетических различий внутри субтипов и вариабельность циркулирующих изолятов, то отбор культуры *Blastocystis* в качестве источника поликлональных АТ является ведущим фактором конструирования теста. Вероятно, что спектр субтипов и их вариабельность влияет на результат теста. По данным отечественных авторов [2], в Чукотском автономном округе и г. Санкт - Петербург помимо указанных субтипов выявлены дополнительные изоляты (ST1, ST2, ST3, ST4, ST7), что может влиять на результаты теста. К сожалению, данные по субтипам в Москве и Московской области в настоящее время отсутствуют.

При сборе материала для данного исследования мы отбирали пробы, руководствуясь, внутрилабораторной оценкой количества бластоцист в крестах, т.е «+» - до 5 клеток в п/зр.; «++» - от 5 до 10 кл. в п/зр.; «+++» - от 10 и больше. В ходе работы мы получили 21 образец, содержащий *Blastocystis* в единичных количествах, из них 10 оказались отрицательными в ИФА, из 7 образцов, содержащих бластоцисты до 5 клеток в поле зрения, в ИФА один отрицательный. Дальнейшим этапом нашего исследования была оценка наличия корреляционной связи между количественными критериями при микроскопии и ОП каждого образца, а также определен коэффициент корреляции Пирсона.

Значение коэффициента корреляции Пирсона (r) составило - 0,123, следовательно, взаимосвязь между ОП и количественным критерием при микроскопии слабая. Силу корреляционной связи оценивали по таблице Чеддока. Отрицательная корреляция показывает отсутствие взаимосвязи большого

количества бластоцист при микроскопии с высоким значением оптической плотности при ИФА, например, 35 клеток в поле зрения соответствует 0,75 ОП в ИФА.

Для оценки линейности между двумя показателями построили диаграмму рассеяния и рассчитали коэффициент детерминации R^2 , который представляет собой квадрат коэффициента корреляции Пирсона R^2 . Рисунок 4.2.2 демонстрирует, что сгущение точек корреляционного поля имеет хаотичный характер, а эмпирическая линия регрессии имеет тенденцию к явному уменьшению на всех отрезках.

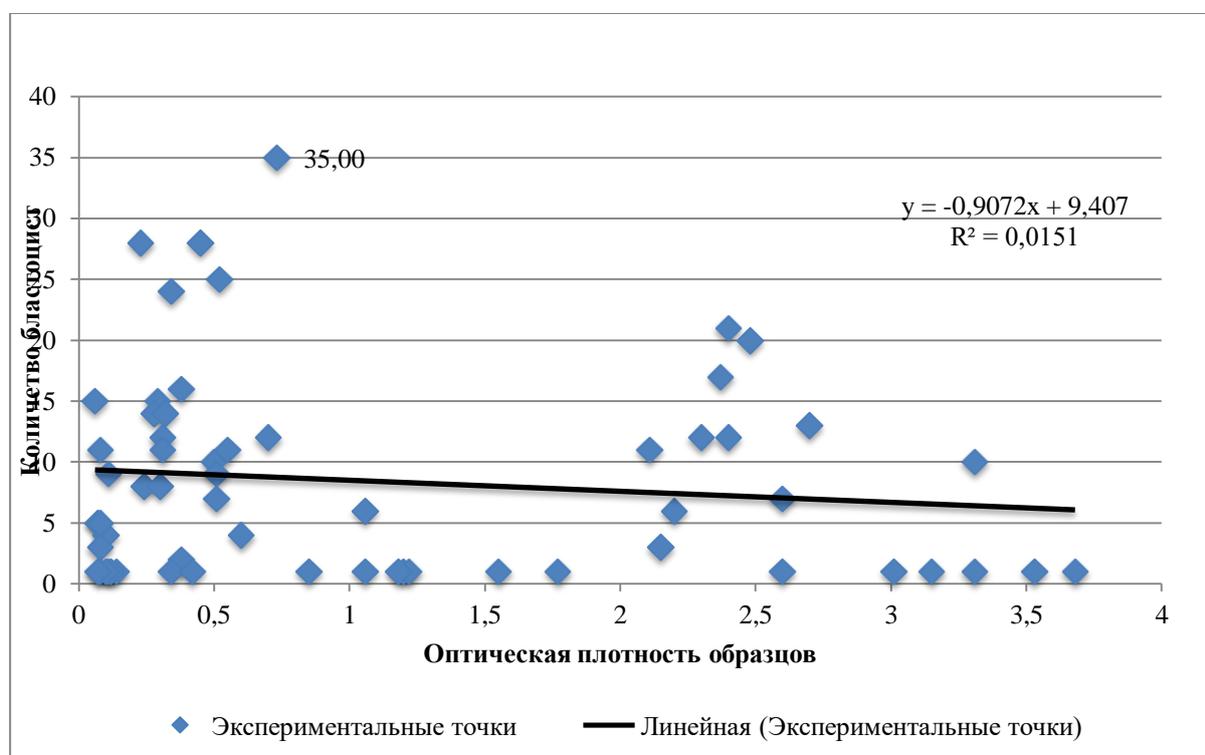


Рисунок 4.2.2. Корреляционная связь между оптической плотностью образца и количественным критерием при микроскопии

Коэффициент детерминации R^2 заключен в пределах от 0 до 1, а должен быть $0 \leq R^2 \leq 1$. В нашей работе коэффициент детерминации r^2 равен 0.016 (факторный признак x определяет 1.6% дисперсии зависимого признака y), следовательно, мы можем говорить о строгом линейном соотношении (линейной функции) между переменными количественного критерия по микроскопии и ОП в ИФА.

Число степеней свободы (f) составляет 58, t-критерий Стьюдента равен 0.964. Критическое значение t-критерия Стьюдента при данном числе степеней свободы составляет 2.002. $t_{набл} < t_{крит}$, зависимость признаков статистически не значима ($p=0.339183$). Средняя ошибка аппроксимации (характеризует адекватность регрессионной модели) составляет 287.2%.

Далее была проведена оценка диагностической эффективности CoproELISA. Диагностические характеристики определяли относительно «золотого стандарта» с помощью четырехпольной таблицы (таблица 4.2.2).

Для оценки эффективности диагностических тестов рассчитывали следующие показатели: чувствительность (Se), специфичность (Sp), точность (test eff.). Чувствительность определялась как доля действительно инфицированных пациентов среди тех, у кого тест был положительным. Специфичность определяли как долю неинфицированных людей среди всех, у кого тест оказался отрицательным. Точность показывает долю «правильных срабатываний теста» среди всех обследованных и является совокупным показателем информативности теста.

Таблица 4.2.2. Оценка чувствительности и специфичности теста CoproELISA® Blastocystis

Число исследуемых образцов	Результаты модифицированного ФЭО		Результаты CoproELISA® Blastocystis	Результаты
	122	Положительные	52	37
15				Ложноотрицательные
Отрицательные		70	6	Ложноположительные
			64	Истинно отрицательные

$$\chi^2 = 51.200, P < 0,001$$

Чувствительность, специфичность и точность рассчитывались по формулам:

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ = ИП/ИП+ЛО,

Чувствительность = $37/37+15*100\%=71,1\%$

СПЕЦИФИЧНОСТЬ= ИО/ИО+ЛП,

Специфичность= $64/64+6*100\%=91,4\%$

ТОЧНОСТЬ=ИП+ИО/ИП+ИО+ЛО+ЛП*100%

Точность= $37+64/37+64+15+6*100\%=82,7\%$

Таким образом, на основании проведенных сравнительных исследований нами установлено, что чувствительность и специфичность ИФА составляет 71% и 91,4% соответственно, а точность - 83%. Высокая специфичность теста позволяет верифицировать отличные от общепринятых форм - многоядерные формы паразита, следовательно, тест-система может быть использована для дифференциальной диагностики инфекции *Blastocystis* от инфекции, обусловленной представителями рода *Entamoeba*. Аналитические характеристики коммерческого теста представляют надежную и достаточно достоверную скрининговую технику обнаружения паразита.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА СОЧЕТАННО - ИНТЕГРИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *BLASTOCYSTIS SPP*

Интерпретация результатов лабораторных исследований, критически зависит от методов идентификации *Blastocystis spp.* На сегодняшний день разработан и апробирован широкий спектр методов диагностики, используемых в клиническо – диагностических лабораториях разного уровня. Однако существующие методы различаются по чувствительности и специфичности, обладают рядом достоинств и недостатков, что необходимо учитывать при планировании исследования.

Аналитическая часть диссертационной работы связана с сопоставлением результатов и фактов, полученных при экспериментальных наблюдениях и оценке диагностических приемов выявления паразита. Проблема идентификации *Blastocystis* рассматривается на фоне широко распространенного носительства, а также путем изучения образцов и изолятов паразита, полученных от инфицированных лиц с наличием и/или отсутствием расстройств ЖКТ.

Апробация, испытание и сравнительное изучение 4-х известных (ФЭО, посев на среду Павловой, окраска Трихромом и по Романовскому-Гимза) и 3-х оптимизированных («Mini Parasep®108900», ИФА, «Лейкодиф 200») техник лабораторной диагностики бластоцист доказали возможность их использования при обнаружении паразита. Модификация метода ФЭО, предусматривающая стандартизированные условия забора, хранения и доставки, фиксированных в консерванте Турдыева образцов биоматериала обеспечили эффективность его использования в качестве метода сравнения (референс - метода) при обнаружении бластоцист.

Использование коммерческого набора Copro ELISA в качестве скрининг метода при обследовании амбулаторных и стационарных больных обусловлено возможностью автоматической техники постановки, не требующей наличия квалифицированного персонала и значительных трудозатрат. Несмотря на ограниченное число испытаний по практическому использованию ИФА теста, в

совокупности с данными литературы получены достаточно убедительные результаты по его использованию не только в плане скрининг-теста, но и для дифференциальной диагностики и верификации атипичных, редко встречающихся форм, особенно в случае микст-инфекции с представителями паразитических амёб на основе высокоспецифичной реакции АГ – АТ.

Метод выделения бластоцист в культуре продемонстрировал не только эффект зависимости от характера расстройств ЖКТ у обследованных, но и вариабельность существования *Blastocystis spp in vitro*: наблюдение вспышек роста, коротко- и долгоживущих изолятов, с развитием среди них как промежуточных форм, соответствующих типу размножения, так и нетипичных (многоядерных) и редких (гигантские клетки) морфотипов. Полученные данные еще раз подтверждают феномен полиморфизма бластоцист.

Методы окраски обеспечивают морфологическую идентификацию паразита не только при типичной, но и при атипичной локализации. Впервые испытанный экспресс-вариант окраски бластоцист с применением коммерческого набора «Лейкодиф 200» позволил выявлять различия между гибнущими и вегетирующими клетками (характерная окраска ядра), которые могут различаться по их клиническому значению, то есть верифицировать присутствие наиболее значимых вегетативных форм бластоцист.

В нашей работе проведено сравнение диагностической эффективности паразитологических, культуральных и иммунологических методов диагностики бластоцистной инфекции и на основании результатов разработана сочетанно – интегрированная система идентификации паразита, учитывающая основные характеристики методов (рисунок 5.1.).

Обнаружение паразита в фиксированном биоматериале (А) на основе скрининг-тестов (ФЭО и ИФА) (1 и 2) фиксирует чаще всего, инфицирование макроорганизма, то есть наличие или отсутствие паразита в организме хозяина. При получении отрицательного результата методом концентрации или ИФА (1б, 2б), можно считать, что в биоматериале бластоцисты не обнаружены. При получении положительного результата ФЭО (типичные ВАФ, ГРАФ) выдается

результат исследования (6). Последовательность действий скрининг – диагностики отражена на схеме СИС синими стрелками.

Модифицированный ФЭО в отличие от других скрининговых методов позволяет оценить популяцию бластоцист в целом. В случае обнаружения амебоидных форм, мимикрии, микст – инфекции и других нетипичных форм (шизонтоподобные клетки) (С), а также в случаях атипичной локализации паразита следует применить методы дифференциальной диагностики, которые обозначены на схеме СИС красными стрелками. Для этого этапа необходим нативный материал (В), который исследуется микроскопией влажного мазка (3) с физиологическим раствором или 2% раствором Люголя. При обнаружении (3а) амебоидных, шизонтоподобных клеток, мимикрии, микстов и других нетипичных форм клеток (С), а также в случаях атипичной локализации паразита в нативном материале необходимо провести посев (4) и окраску (5) биоматериала для последующей идентификации морфоформ. Техника посева и варианты окраски материала, используемые в нашей работе, более подробно представлены в 3-й главе рукописи.

Заключительным этапом СИС является выдача результатов (6, желтая последовательностью действий) пациентам на любом этапе диагностики (скрининг, идентификация) при наличии и/или отсутствии (1б, 2б, 3б, 4б) типичных (С) или нетипичных форм паразита.

Предложенная система в целом отражает объективное единство связанных друг с другом приемов и явлений, а именно соединение принципиально различающихся техник лабораторной диагностики выявления и/или идентификации паразита с анализом характера существующих морфоформ бластоцист в реально складывающихся условиях. Спектр лабораторных техник в дальнейшем может быть дополнен более чувствительными и тонкими диагностическими, а также исследовательскими методами (ПЦР, проточная цитометрия и специфическая окраска ядер).

Суммируя вышеизложенное, следует заключить, что в современных условиях решение проблем диагностики бластоцист на базе единой стандартизированной лабораторной техники оказывается весьма затруднительным, и

только сочетание разных методик способствует оценке неоднозначных характеристик поведения, присущих паразиту в реально складывающихся условиях: полиморфизм, вариабельность ростовых особенностей и возможность атипичной локализации.

Однако интерпретация результатов лабораторного обследования должна быть основана и связана с пониманием биологических особенностей паразита, которые, как рассматривалось выше, раскрываются при использовании различных лабораторных техник.

Следовательно, *Blastocystis spp.* как организм, существующий в разных морфоформах при генетическом разнообразии и вариабельности фенотипических проявлений, должен быть представлен и рассматриваться как объект с системой многообразных типов связей, для выявления которых необходимо использовать различные диагностические техники, варьирующие по чувствительности, но исключительно полезные при определении вегетативных форм паразита, связанных с проявлением инфекции.

В условиях практики и при современных возможностях КДЛ может быть предложен вариант схемы идентификации бластоцист с адекватным использованием всех апробированных классических протозоологических и иммунологических методов обнаружения паразита.

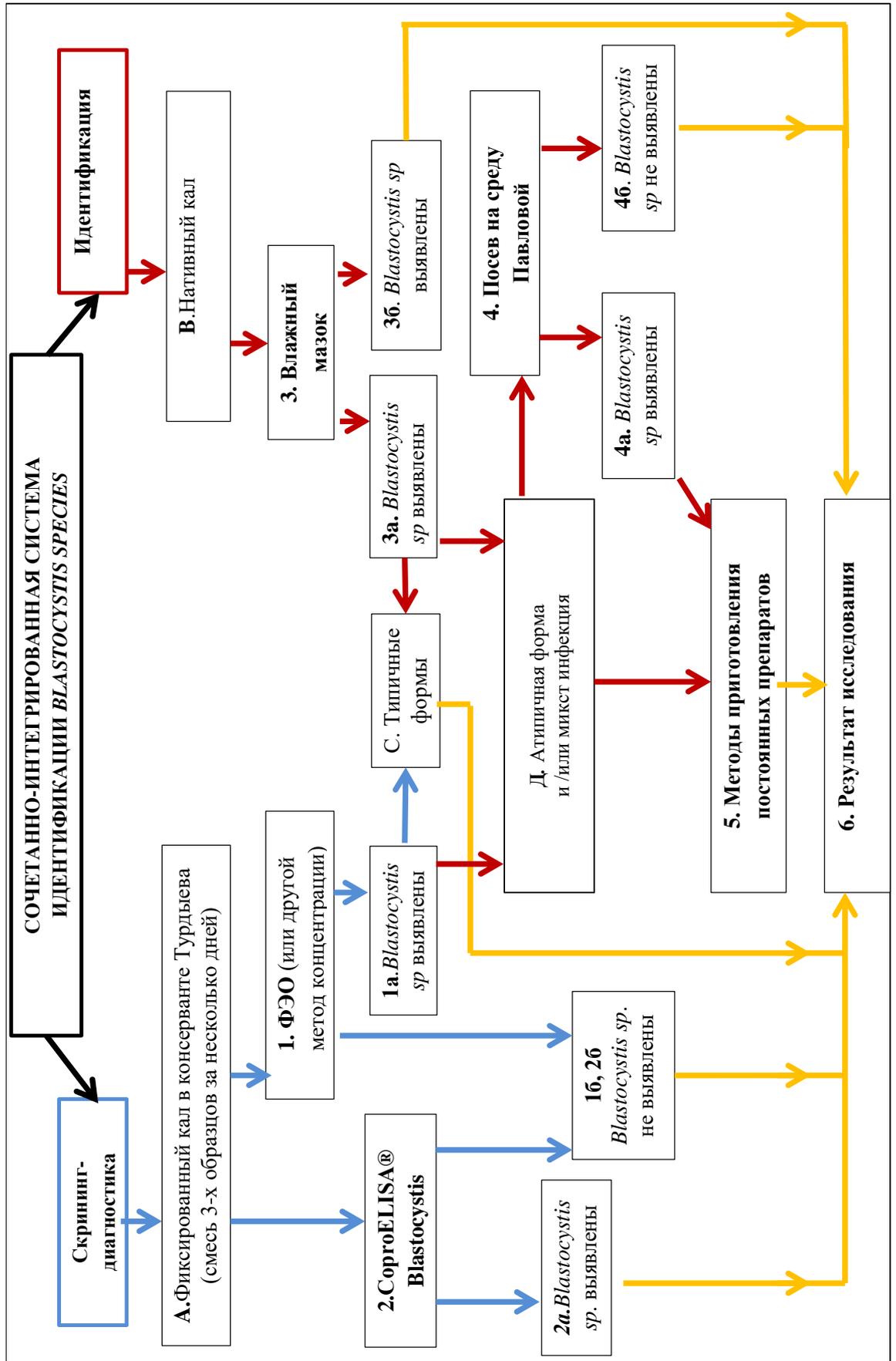


Рисунок 5.1. Сочетанно - интегрированная система идентификации бластоцист

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современное представление о простейших рода *Blastocystis* свидетельствует в пользу его принадлежности к гетерогенному сообществу *Stramenopiles* из надцарства эукариот. Необычный таксономический статус в сочетании с варьирующими характеристиками паразита (морфологическими, генетическими) потребовало оптимизации системы обнаружения и морфологической дифференциации бластоцист на основе общепринятых диагностических техник.

Микроскопическое исследование 3807-и образцов нативного и фиксированного биоматериала методами обогащения (ФЭО, «Mini Parasep® 108900»), окраски (Трихром, Романовского – Гимза, «Лейкодиф 200») и культивирования в совокупности со специальным иммуноферментным тестом CoproELISA позволило апробировать, адаптировать и оценить значение вышеперечисленных методик для диагностики бластоцист.

Эффективное использование различных комбинаций указанных методов позволяет достоверно выявлять наличие инфекции в организме хозяина. Сочетание методического подхода по сохранению фиксированного биоматериала с техникой обогащения обеспечило эффективность скрининг - диагностики, осуществляемой не только за счет ФЭО, «Mini Parasep® 108900», но и высокоспецифического метода ИФА. В силу высокой специфичности метода ИФА (91,4%), тест эффективен не только как скрининг метод, но также может использоваться при видовой дифференциальной диагностике микст-инфекций, вызванных бластоцистами и представителями рода *Entamoeba*.

Эффективность универсального метода ФЭО в диагностике простейших кишечника на основе фиксированных образцов в консерванте Турдыева оценено путем ретроспективного анализа 34838 образцов стула за 5 лет (2014 – 2019 гг.). В результате исследований, установлен высокий уровень инфицированности обследованных (15-23%) с распределением инфекции по возрастам в виде двугорбой кривой с максимальным инфицированием в возрасте от 5 до 9 лет - 18% и 30-39 лет до 9%. На основе семидневного мониторинга исследуемого

биоматериала методом ФЭО отмечены резкие колебания в выявлении численности бластоцист в исследуемых пробах. Зафиксированные изменения позволили констатировать, что количественная оценка на момент обследования не является постоянно-значимой величиной и однократно проведенное исследование не может служить объективным критерием текущей инфекции.

Светооптические исследования по идентификации бластоцист *in vivo* и *in vitro* подтвердили феномен полиморфизма паразита как его биологическую особенность. Новые данные о характере морфофункциональных свойств бластоцист, важных для понимания их связей с проявлением инфекции, получены на основе метода изучения культур на среде Павловой от лиц с разными проявлениями (расстройства ЖКТ, аллергические проявления). Сведения о вариации ростовых свойств изолятов (от однократной вспышки до коротко и долгоживущих) коррелируют с варьирующим количественным и качественным соотношением морфоформ внутри функционирующих клеточных систем с преобладанием полученных изолятов от лиц с клиническими проявлениями заболеваний ЖКТ.

Изучение постоянно окрашенных препаратов бластоцист методами Романовского – Гимза и впервые апробированного экспресс – метода «Лейкоцид 200» составило доказательную основу для идентификации паразита. Определение бластоцист по наличию вишнево-красной окраски ядер и варьирующей интенсивности сине-голубых тонов цитоплазмы подчеркнуло принципиальное отличие паразитов рода *Blastocystis* от типичных представителей простейших кишечника. Корректно подобранная техника окраски нативного материала дает возможность идентификации и дифференциации бластоцист различных морфоформ. С помощью окраски по Романовскому – Гимза впервые показано развитие паразита по типу шизогонии в ткани слизистой оболочки влагалища – атипичной локализации возбудителя. Идентификация методами окрашивания существенно расширяет представление о клиническом значении бластоцист, подчеркивая неоднозначность роли этого энтеропаразита.

Все вышеперечисленное позволяет сделать вывод, что оптимальное использование сочетания принципиально различающихся техник лабораторной диагностики (идентификация, скрининг) позволяет осуществить системный подход к анализу полученных результатов, позиционированный нами как сочетанно-интегрированная система идентификации паразита.

Предлагаемый подход способствует своевременной диагностике паразита даже в случае атипичной локализации возбудителя и позволяет, с высокой степени вероятности, не только выявить инфекцию в КДЛ разного уровня, но и доказательно обозначить проблему взаимосвязи клинического проявления инфекции с формой существования паразита.

ВЫВОДЫ

1. Сравнение основных методов лабораторной диагностики, применяемых при идентификации простейших кишечника, показало, что основным скрининговым методом является модифицированный метод формалин-эфирного осаждения.
2. Сравнительное изучение эффективности методов концентрации «MiniParasep 108900» и ФЭО как референс - метода показало возможность применения «MiniParasep 108900» для обработки фиксированных в консерванте Турдыева проб кала и введения адаптированного метода в практику КДЛ. Чувствительность MiniParasep составила 80%, а специфичность – 100%.
3. Эффективность метода диагностики бластоцист при посеве на среду Павловой не превышала 48,7% при чувствительности и специфичности 96,6% и 78,9% соответственно. Выделение изолятов оказалось зависимым как от характера расстройств ЖКТ у обследуемых, так и от особенности существования бластоцист *in vivo* - получение вспышек роста, коротко- и долгоживущих изолятов с непредсказуемой вариабельностью развивающихся морфоформ.
4. Проведенный мониторинг ежедневного выделения *Blastocystis* при наблюдении двух групп пациентов с клиническими проявлениями заболеваний ЖКТ и дерматологическими заболеваниями показал, что применяемая ранее количественная оценка на момент обследования не является постоянно-значимой величиной и однократно проведенное обследование не может служить объективным критерием течения инфекции.
5. Copro ELISA *Blastocystis* показала высокую чувствительность – 74%, специфичность – 91%, точность – 83%. Тест-система позволяет верифицировать атипичные, редко встречающиеся морфотипы бластоцист и микст-инфекции с представителями *Entamoeba*, а также использовать набор в скрининг – диагностике.
6. Сравнение трех методов окрашивания (Трихром, Романовского – Гимза, «Лейкодиф 200») бластоцист в различном биоматериале показало преимущество

экспресс – метода «Лейкодиф 200». При хорошем качестве дифференциального окрашивания время экспозиции: на 1 препарат – 5 минут.

7. Диагностика, проведенная на основе постоянно окрашенных препаратов, позволила проследить развитие бластоцист по типу шизогонии в случае атипичной вагинальной локализации инфекции, существенно расширяющий представление о клиническом значении паразита.

8. Проведенные исследования подтвердили методические принципы обнаружения и верификации инфекции при последовательном выполнении методик, необходимых в каждом конкретном случае, на основании которых была разработана сочетанно - интегрированная система диагностики. Предлагаемый алгоритм позволяет с высокой степенью вероятности выявить инфекцию, вызванную *Blastocystis spp.* в КДЛ различного уровня.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты, полученные в ходе работы могут служить основой для рекомендации в качестве скрининг – методов обнаружения бластоцист: модифицированный ФЭО, «MiniParasep 108900», «Copro ELISA Blastocystis».
2. Для верификации результатов микроскопической диагностики бластоцист в кале и других биоматериалах целесообразно использовать экспресс-метод окрашивания «Лейкодиф 200».
3. Применяемый количественный критерий течения бластоцистной инфекции - 5 и более клеток возбудителя в поле зрения микроскопа при ув. x400 - на момент обследования не является постоянной величиной и не может считаться критерием оценки тяжести инфекции. Следовательно, количественный критерий не должен фигурировать в результатах исследования КДЛ.
4. Разработанная система может использоваться лабораториями различного уровня для оптимизации процедур при диагностике инфекции, вызванной бластоцистами, что позволит упростить идентификацию паразита и уменьшить число ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВАФ - вакуолярная форма

ГРАФ - гранулярная форма

АМФ - амeboидная форма

ЦИФ - цистная форма

МВФ - мультивакуолярная форма

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ОП – оптическая плотность

spp. - species

ФЭО – формалин – эфирное осождение

СИС – сочетанно – интегрированная система

ЦТ – центральное тело

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдюхина, Т.И.. Паразитарные болезни, передающие с продуктами питания / Авдюхина Т.И. Довгалева А.С., Имамкулиев К.Д., Константинова Т.Н., Гузеева Т.М. // Инфекция и иммунитет- 2012. - № 1-2.Т.2- С.350.
2. Азаров, Д.В. Блостоцистная инвазия в Санкт-Петербурге. Эпидемиологический анализ за 2015 – 2017 гг./ Азаров Д.В., Гончаров А.Е и др // Профилактическая и клиническая медицина. – 2018. - № 2(67). – С. 49-53.
3. Апякин, А.В. Редкий случай локализации блостоцист в нёбной миндалине в сочетании с мицетомой верхнечелюстной пазухи / Апякин А.В., Продеус Т.В., Продеус А.П., Кочегарова Т.Э // Российская ринология.- 2016.- Т. 24.- № 4.- С. 59-63.
4. Белова, Л.М. Мировая фауна и морфофункциональная организация блостоцист (Protista, Rhizopoda) / Белова Л.М. –СПб. : 1992.- С.10-53.
5. Бондаренко, В.М., Учайкин В.Ф., Мурашова А.О. Дисбиоз: современные возможности профилактики и лечения. – 2008 – С.20.
6. Воробьев, А.А. Исследование пристеночной микрофлоры кишечника человека / Воробьев А.А., Несвижский Ю.В., Липницкий Е.М и др. // Журнал микробиологии 2004-№1- С.60-63.
7. Глебова, Н.С. Особенности микробиоценозов кожи и кишечника при экземе на фоне *Blastocystis hominis*: автореф. дис. ...канд. мед. наук: 03.00.16 / Глебова Наталья Сергеевна - Ульяновск , 2007. – 17 с.
8. Грицюк, О.В. О вариабельности изолятов *Blastocystis species*, поддерживаемых *in vitro* / Грицюк О.В., Продеус Т.В., Максимова М.С., Садыкова В.Д // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2016. - № 3. - С. 12-18.
9. Гумаюнова, Н.Г. Синдром избыточного роста бактерий в тонкой кишке при псориазической болезни на фоне блостоцистной инвазии: автореф. дис. ...

канд. мед. наук: 03.00.07/ Гумаюнова Наталья Геннадьевна – Челябинск, 2009. – 15 с.

10. Давис, Н.А. *Blastocystis hominis* и непатогенные простейшие кишечника у больных туберкулезом легких и ВИЧ-инфицированные / Давис Н.А., Бадалова Н.С., Исламова Ж.И., Осипова С.О., Гиясов Х.З., Латипов Р.Р., Тахтоходжаева Г.Р // Мед. паразитология – 2010 - №3 - С.8 -11.

11. Ильина, Н.А. Микробиоценоз кишечника человека при бластоцистной инвазии и воздействие *Blastocystis hominis* на макроорганизм: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.16, 03.00.07 / Ильина Наталья Анатольевна. – Ульяновск, 2005. – 37 с.

12. Ириков, О.А. Зараженность простейшими кишечника детских коллективов г. Москвы / Ириков О.А., Прудеус Т.В // Мед. паразитология - 2007. - № 1. - С. 11-13.

13. Ириков, О.А., Антохин А.И., Романов Ю.А. Изучение динамики репродукции *Blastocystis hominis in vitro* / Ириков О.А., Антохин А.И., Романов Ю.А // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины/ - 2009 - Т. 148. - № 7/ - С. 114-117.

14. Коза, Н.М. Распространение кишечных протозоозов среди населения крупного города / Н.М. Коза, В.И. Сергевнин, Л.Я. Горбань // Материалы VIII Всерос. съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. — М. : ООО «Росинекс», 2002. – Т. 1. – С. 339–340.

15. Ласкин, А.В. Клинико-лабораторные особенности течение острых кишечных диарейных инфекций, ассоциированных с *Blastocystis hominis*: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.10, 03.00.19 / Ласкин Александр Викторович. - Санкт-Петербург, 2006. – 54с.

16. Лысенко, А.Я. ВИЧ- инфекция и СПИД – ассоциируемые заболевания / Лысенко А.Я., Турьянов М.Х., Лавдовская М.В., Подольский В.М // Монография. - 1996. - С. 187-189.

17. Максимова, М.С. Взаимосвязь между интенсивностью выделения *Blastocystis* spp. и проявлениями дисфункции желудочно-кишечного тракта / Максимова М.С., Продеус Т.В. // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. - 2018. - Т. 7. - № 4 (27). С. 52-57.
18. Максимова М.С., Продеус Т.В., Федянина Л.В, Грицюк О.В Об Ассоциации *Blastocystis species* и микробиоты кишечника при различных состояниях макроорганизма // Мед. паразитология - 2015.- № 4.- С. 55-58.
19. Миронов, А. Ю. Основные характеристики условно-патогенных микроорганизмов // Руководство по медицинской микробиологии – 2013- М. Бином. Книга-3.т.1-С. 20-28.
20. МУК 4.2.735-99. Паразитологические методы лабораторной диагностики гельминтозов и протозоозов. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России.- 2012. – 72 с.
21. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018. – 191 с.
22. Основные методы лабораторной диагностики паразитарных болезней. ВОЗ, Женева, 1994
23. Пинегин, Б.В., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. Дисбиозы кишечника. Москва. – 2004 - .С.56.
24. Продеус, Т.В. Внекишечная инфекция, обусловленная *Blastocystis* spp., у больного с абсцессом печени / Продеус Т.В., Зеля О.П., Хлебникова Т.А., Пикуль Д.А // Мед. паразитология - 2014 - № 2. - С.6-9.
25. Продеус, Т.В. Культивирование *Blastocystis* spp. как метод диагностики паразита / Продеус Т.В., Федянина Л.В., Грицюк О.В., Волкова И.В., Бегунова С.В // Мед. паразитология - 2013. - № 4. - С. 16-19.

26. Продеус, Т.В. Медицинское значение инфекции *Blastocystis spp.* / Продеус Т.В., Федянина Л.В., Волкова И.В // Мед. паразитология - 2012. - № 4. - С. 55-58.
27. Продеус, Т.В. Морфологическая идентификация бластоцист / Продеус Т.В., Федянина Л.В., Фролова А.А. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни.- 2014.- № 1.- С. 9-13.
28. Сафронова, Н.А. Паразитофауна кишечника детей с аллергодерматозами (регион среднего Урала) автореферат дис. ... кандидата биологических наук / Москва, 2000.
29. Сергиев, В.П. Паразитарные болезни человека, их профилактика и лечение / Сергиев В.П., Лебедева М.П., Фролова А.А. // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2003.- № 2. С. 8.
30. Сергиев, В.П. Современные проблемы в сфере паразитарных болезней и их терапии / В.П. Сергиев, К.Ю. Кузнецова // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2014. – №. 1. – С. 12-15.
31. Сигидаев, А.С. Клинико-лабораторная характеристика бластоцистной инвазии у больных HCV-инфекцией: дис. ... канд. мед. наук : 14.01.09 / Сигидаев Алексей Сергеевич. – СПб., 2012. – 116 с.
32. Сигидаев, А.С., Козлов С.С., Тарасова Е.А., Суворова М.А. Изучение генетического профиля *Blastocystis species* у жителей Санкт-Петербурга с патологией желудочно-кишечного тракта в разных возрастных группах // Мед. паразитология - 2013. - № 4. - С. 19-23.
33. Смирнова, М.О. Инфекция *Blastocystis hominis* у грудного ребенка с пищевой аллергией Сигидаев А.С., Козлов С.С., Тарасова Е.А., Суворова М.А // Мед. паразитология - 2010.- № 3.- С. 11-15.
34. Старостина, О.Ю. Распространенность паразитических инвазий у городских жителей / О.Ю. Старостина, С.П. Запарий, Л.М. Толмачева // Материалы VIII Всерос. съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М.: ООО «Росинекс». - 2002. – Т. 1. – С. 403–404.

35. Тартаковский, И. С. Оппортунистические инфекции и их значение в современной структуре инфекционной патологии человека. Руководство по медицинской микробиологии: учебное пособие / И. С Тартаковский. Москва, 2013. - Книга-3.т.1-С. 15-19.
36. Тихонова, Д.В. ДНК-диагностика бластоцистоза с помощью метода ПЦР / Тихонова Д.В., Волкова И.В., Морозов Е.Н.,Федянина Л.В // Мед. паразитология - 2012. - № 4. - С. 27.
37. Токмалаев, А.К. Инфекции BLASTOCYSTIS SPP в клинической практике / Токмалаев А.К., Кожевникова Г.М., Половинкина Н.А., Голуб В.П., Барышева И.В., Продеус Т.В., Сметанина С.В // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.- 2016.- № 1.- С. 34-38.
38. Тонкин, Н. Паразитологические исследования при некоторых кожных заболеваниях / Тонкин Н., Генов Г., Дмитриев Х // Вестн. дерматол. и венерол. — 1986. — №5. — С. 39—40.
39. Федянина, Л. В. Blastocystis hominis, Brumpt 1912 – загадочный организм, относящийся к простейшим кишечника / Федянина Л. В., Продеус Т. В., Волкова И. В // Мед. паразитология - 2011.- № 2.- С. 47-52.
40. Федянина, Л. В. Лабораторная диагностика Blastocystis spp / Федянина, Л. В., Продеус Т.В., Соловьева О.А // Мед. паразитол. - 2012.- N 4. - С.52-58
41. Чайка, Н.А. Бластоцистоз и СПИД. / Чайка Н.А // Мед. паразитология - 1992-№4.- С. 48-51.
42. Alexeieff A. Sur la nature des formations dites kystes de Trichomonas intestinalis / A Alexeieff // CR Soc Biol. – 1911. – Vol. 71. – P. 296-298.
43. Alfellani M. A. et al. Variable geographic distribution and conventional polymerase chain reaction for detection of Blastocystis sp. in clinical stool samples / M. A. Alfellani et al // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2011. - Vol. 84.- P. 308–312.
44. Amin O. Epidemiology of Blastocystis hominis in the United States / O. Amin // Research Journal of Parasitology. - 2005. – No. 1. P. 1–10.

45. Armentia A. et al. Blastocystis hominis. Successful treatment with paromomycin / A Armentia. Et. al // Allergol Immunopathol (Madr) - 1993. - Vol. 21. No. 4. - P. 149-151.
46. Audebert C. et al. Colonization with the enteric protozoa Blastocystis is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota / C Audebert. et al // Scientific reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 255.
47. Azza S. Elghareebet al. Laboratory diagnosis of Blastocystis spp. in diarrheic patients // Tropical parasitology – 2015 - Vol. 5. P. 36-41.
48. Biedermann T. Hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs and chronic urticaria cured by treatment of Blastocystis hominis infection / T Biedermann., K. Hartmann, A. Sing, B. Przybilla // J Dermatol. - 2002. - Vol. 146. No. 6. - P.1113-1114.
49. Bohne A. Zur Frage der Flagelatendysenterie / A. Bohne, S. Prowazek // Arch. Protistenkd. – 1908. - Bd 12. S. 1.
50. Boorom K. F. et al. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, Blastocystis, and asymptomatic infection / K. F Boorom. et al. // Parasites & Vectors. – 2008. – T. 1, №. 1. – C. 40.
51. Brumpt E. Blastocystis hominis n. sp. et formes voisines / E. Brumpt // Bull Soc. Pathol. Exot. – 1912. – Vol. 5. – P. 725-730.
52. Bueno L, Fioramonti J. Protease-activated receptor 2 and gut permeability: a review/ L. Bueno, J. Fioramonti // Neurogastroenterol Motil. – 2008. - Vol. 20. – P. 580-587.
53. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) of the United States federal agency, Atlanta, Georgia. Blastocystis sp. infection [Internet]. Available in: <http://www.cdc.gov/parasites/blastocystis/biology.html>
54. Chandramathi S, Suresh KG, Mahmood AA, Kuppusamy UR (2010b) Urinary hyaluronidase activity in rats infected with Blastocystis hominis—evidence for invasion? // Parasitol Res. – 2010. - Vol. 106. P. 1459-1463.

55. Cifre S, Gozalbo M, Ortiz V, Soriano JM, Merino JF, Trelis M. Blastocystis subtypes and their association with Irritable Bowel Syndrome // *Med Hypotheses*. – 2018. - Vol. 116. P. 4-9.
56. Clark C. G., Diamond L. S. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance // *Clinical microbiology reviews*. – 2002. – Vol. 15. – №. 3. – P. 329-341.
57. Clark C. G; Stensvold C. R. Blastocystis: Isolation, Xenic Cultivation, and Cryopreservation // *Current protocols in microbiology* – 2016 - Vol. 43. P. -20A.1.1-20A.1.8.
58. Clark C. G; Van G. M; Alfellani M. A; Stensvold C. R. Recent developments in blastocystis research. *Advances in parasitology microbiology* – 2016 - Vol. 82. P. 1-32.
59. Clark, C. G. 1997. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol. Biochem. Pa Kaya S., Cetin E.S., Aridogan B.C. et al. // Turk. Parazit. Derg.* – 2007. – Vol. 31, No. 3. – P. 184-187. *Parasitol.* 87:79–83.
60. Cunningham D. D. On the development of certain microscopic organisms occuring in the intestinal canal // *Quart. J. Mic. Sci.* - 1881. - Vol.21. - P. 234-
61. Denoeud F., Roussel M., Noel B., Wawrzyniak I., Da Silva C., et al. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite // *Genome Biol.* – 2011. - Vol. 12. No. 3. - P. 29.
62. Dogruman-Al F, S. Turk, G. Adiyaman-Korkmaz, et al. A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens // *Parasitol. Res.* – 2015. – Vol. 114– P. 495–500.
63. Dogruman-Al F. et al. Blastocystis subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* – 2009. – T. 104, №. 5. – C. 724-727.
64. Domínguez-Márquez M. V. et al. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain) // *Parasitology research*. – 2009. – Vol. 105. – №. 4. – P. 949.

65. Doyle P. W. et al. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis* // Journal of Clinical Microbiology. – 1990. – Vol. 28. – №. 1. – P. 116-121.
66. Dobell C. Some remarks upon the «autogamy» of *Bodo lacertae* (Grassi) // Biol. Centralbi. - 1908. - Bd.- P. 548.
67. Eroglu F., Koltas I.S. Evaluation of the transmission mode of *Blastocystis hominis* by using PCR method // Parasitology Research. – 2010. - Vol. 107. - № 4. – P. 841-845.
68. Espinoza L.R., van Solingen R. Insights into the pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis // Am. J. Med. Sci. 1998. - V. 316. -P. 271-276.
69. Garcia, L. S., and R. Y. Shimizu. Evaluation of intestinal protozoan morphology in human fecal specimens preserved in EcoFix: comparison of Wheatley's trichrome stain and EcoStain // J. Clin. Microbiol. – 1998. - Vol. 36. – P. 1974–1976.
70. Garcia, L. S., R. Y. Shimizu, T. C. Brewer, and D. A. Bruckner. Evaluation of intestinal parasite morphology in polyvinyl alcohol preservative: comparison of copper sulfate and mercuric chloride base for use in Schaudinn's fixative // J. Clin. Microbiol. – 1983. - Vol. 17. – P. 1092–1095.
71. Gecse K., Roka R., Ferrier L., Leveque M., Eutamene H., et al. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity // Gut. – 2008. – Vol. 57. No. 5. – P. 591–599.
72. Guidelines for drinking-water quality. Third edition. Incorporating first and second addenda / WHO Geneva, 2008 [Электронный ресурс]. – Режим доступа:https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/gdwq3rev/en/
73. Gupta R. Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis* // Australas J. Dermatol. – 2006. - Vol. 47. No. 2. - P. 117-119.
74. Hameed D. M. A., Hassanin O. M., Zuel-Fakkar N. M. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria // Parasitology research. – 2011. – Vol. 108. – №. 3. – P. 553-560.

75. Horen W. P. Modification of Schaudinn's fixative // J. Clin. Microbiol. – 1981. – Vol. 13. – P. 204-205.
76. Hussain R. et al. Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome // The American journal of tropical medicine and hygiene. – 1997. – Vol. 56. – №. 3. – P. 301-306.
77. Idris NS, Dwipoerwantoro PG, Kurniawan A, Said M. Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response // J Infect Dev Ctries. –2010. - №. 4. – P. 309-317.
78. Javanmard E. et al. Impacts of human development index and climate conditions on prevalence of *Blastocystis*: A systematic review and meta-analysis // Acta tropica. – 2018. – Vol. 5. – №. 4. – P. 124-129.
79. Johnson A.M., Thanou A.A., Boreham P.F. et al. *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison // Exp. Parasitol. - 1989.- V.68.- P.283-289.
80. Kain K. C. et al. Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection // Diagnostic microbiology and infectious disease. – 1987. – Vol. 8. – №. 4. – P. 235-244.
81. Katsarou - Katsari A, Vassalos C M. et al. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3 // Acta dermato-venereologica. – 2008. – Vol. 88. – №. 2. – P. 80-81.
82. Kaya S., Cetin E.S., Aridogan B.C. et al. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation // Turk. Parazitol. Derg. – 2007. – Vol. 31, No. 3. – P. 184-187.
83. Ken Dror S, Pavlotzky E, Barak M. Evaluation of the NanoCHIP® Gastrointestinal Panel (GIP) Test for Simultaneous Detection of Parasitic and Bacterial Enteric Pathogens in Fecal Specimens // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, No. 7. – P. e0159440.

84. Kumarasamy V, Kuppusamy UR, Jayalakshmi P, Samudi C, Ragavan ND, Kumar S. Exacerbation of colon carcinogenesis by *Blastocystis sp* // PLoS One. – 2017. - . Vol. 12. - No. 8. – P. e0183097
85. Leelayoova S. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis* / Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M // Ann Trop Med Parasitol. - 2002. - . Vol. 96. - No. 8. – P. 803-807.
86. Lemos E. R., Daher R. R. Intestinal protozoa and helminthes among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis* // Rev. Soc. Bras. Med. Trop. – 2007. – Vol. 40. – P. 631–634.
87. Li L. H. et al. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China // Parasitology research. – 2007. – Vol. 102. – №. 1. – P. 83-90.
88. Lynch K. M. Dauercystformation of *Trichomonas intestinalis* // The Journal of Parasitology. – 1916. – Vol. 3. – №. 1. – P. 28-33.
89. Mehlhorn H. *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912: are there different stages or species? // Parasitol. Res.- 1988 - Vol 74 - P.393–395.
90. Mehlhorn H., Tan K. S., Yoshikawa H. *Blastocystis*: Pathogen or Passenger? – 2012. – P. 65-83
91. Micheloud D., Jensen J., Fernandez-Cruz E., Carbone J. Chronic angioedema and *blastocystis hominis* infection. // Rev Gastroenterol Peru. - 2007. - Vol. 27. No. 2. – P. 191-193.
92. Mirza H., Tan K. S. *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity // Parasitol Res. - 2009. - Vol. 104. – P. 335-361.
93. Moe K. T. et al. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces // Parasitology research. – 1996. – Vol. 82. – №. 5. – P. 439-444.
94. Moe K.T. et. al. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice /, M. Singh, J. Howe et al. // Parasitology Research. – 1997. - Vol. 83. - № 4. - P. 267-268.

95. Nagel R, Gray C, Bielefeldt - Ohmann H, Traub R. J. Features of *Blastocystis* spp. in xenic culture revealed by deconvolutional microscopy // *Parasitology research*. – 2015. – Vol. 114. – №. 9. – P. 3237-3245.
96. Nagel R. et al. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy // *Internal medicine journal*. – 2012. – Vol. 42. – №. 11. – P. 1187-1195.
97. Nakamura Y, Hashimoto T, Yoshikawa H. et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* that contains cytochrome-free mitochondria, inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1 alpha // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 1996. – Vol. 77. - №2. – P. 241-245.
98. Nasirudeen A. M., Tan K. S, Singh M. *et al.* Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis* // *Parasitology*. – 2001. - Vol. 123. - P. 235–246.
99. Nimril L, et. Al. Intestinal Colonization of Symptomatic and Asymptomatic Schoolchildren with *Blastocystis hominis* // *Journal of clinical microbiology*. – 1994. - Vol. 32. - No. 11. – P. 2865-2866.
100. Ozyurt M., et.al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey / Kurt O., Molbak K., Nielsen H.V., Haznedaroglu T., Stensvold C.R. // *Parasitol. Int.* - 2008. - Vol. 57, No. 3. – P. 300-306.
101. Padukone S. et.al. Detection of *Blastocystis* in clinical stool specimens using three different methods and morphological examination in Jones' medium / Padukone S, Mandal J, Rajkumari N, Bhat B. V, Swaminathan R. P, Parija S. C. // *Trop Parasitol.* – 2018. - Vol. 8. – №. 1. – P. 33-40.
102. Parija S.C., Jeremiah S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence // *Trop Parasitol.* - 2013 - Vol. 3. - № 1. – P. 17-25.
103. Parkar U. et al. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential // *Parasitology*. – 2007. – T. 134. – №. 03. – C. 359-367.

104. Pasqui A. L., et al. Chronic urticaria and blastocystis hominis infection: a case report / Pasqui AL., Savini E., Saletti M., Guzzo C., Puccetti L., Auteri A // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. - 2004. - Vol. 8, No. 3. – P. 117-120.
105. Patino W. D et al. Cytologic diagnosis of blastocystis hominis in peritoneal fluid: a case report // Acta Cytol. – 2008. - Vol.52. – №. 6. – P. 718-720.
106. Pegelow K. et al. Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia // The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. – 1997. – Vol. 28. – №. 1. – P. 173-190.
107. Phillips B.P., Zierdt C.H. *Blastocystis hominis*: pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics // Experimental Parasitology. – 1976. – Vol. 39. - № 3. – P. 358-364.
108. Pipatsatitpong D. et al. Prevalence and risk factors for Blastocystis infection among children and caregivers in a child care center, Bangkok, Thailand // The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2015. – Vol. 93. – №. 2. – P. 310-315.
109. Pistono P. G. et al. Blastocystis hominis in Canavese: a retrospective study of samples received for fecal parasitological examination at the Ivrea-Castellamonte Hospital over 42 months // Giornale di batteriologia, virologia ed immunologia. – 1991. – Vol. 84. – №. 1-12. – P. 67-76.
110. Poirier P. et al. New insights into Blastocystis spp.: a potential link with irritable bowel syndrome // PLoS pathogens. – 2012. – Vol. 8. – №. 3. – P. e1002545.
111. Ragavan N. D, Govind S. K, Chye T. T, et al. Phenotypic variation in *Blastocystis sp.* ST3 // Parasit Vectors. – 2014. –Vol. 7. – P. 404.
112. Rayan H. Z., O. A. Ismail, and E. K. El Gayar. Prevalence and clinical features of Dientamoeba fragilis infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. J. Egypt. Soc. Parasitol. . – 2007. – Vol. 37. – P. 599–608.
113. Reinthaler F.F., Mascher F., Marth E. *Blastocystis hominis*-intestinal parasite or commensal? // Wiener medizinische wochenschrift. - 1988. - V15. -P.545-552.
114. Ritchie L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations // Bull U.S. Army Med Dept. – 1948. - №. 8. – P. 326.

115. Roberts T. et al. 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. – 2011. – Vol. 84. – №. 2. – P. 308-312.
116. Salim H. R. et al. Blastocystis in animal handlers // Parasitology research. – 1999. – T. 85. – №. 12. – P. 1032-1033
117. Santos H.L., Sodr  F.C, and Macedo H.W . *Blastocystis sp.* in splenic cysts: causative agent or accidental association? A unique case report // Parasitology research. – 2001. – T. 10. – No 1 . – P. 132-133.
118. Scanlan P.D., Stensvold C.R., et al. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota // FEMS Microbiol Ecol. – 2014. - Vol. 90. No. 1. – P.326-330.
119. Scicluna S. M., Tawari B., Clark C. G. DNA barcoding of Blastocystis // Protist. – 2006. – T. 157. – №. 1. – C. 77-85.
120. Senay H., MacPherson D. Blastocystis hominis: epidemiology and natural history // Journal of Infectious Diseases. – 1990. – Vol. 162. – №. 4. – P. 987-990.
121. Sheehan D. J., Raucher B. G., McKittrick J. C. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease // Journal of clinical microbiology. – 1986. – Vol. 24. – №. 4. – P. 548-550.
122. Silberman J.D, Sogin M.L, Leipe D.D, Clark C.G. Human parasite finds taxonomic home // Nature. – 1996.- P. 380-398
123. Singh M. et al. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan Blastocystis hominis // Parasitology research. – 1995. – Vol. 81. – №. 5. – P. 446-450.
124. Stensvold C. R. et al. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction // Journal of Parasitology. – 2006. – Vol. 92. – №. 5. – P. 1081-1087.
125. Stensvold C. R. et al. Subtype distribution of Blastocystis isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype // International journal for parasitology. – 2009. – Vol. 39. – №. 4. – P. 473-479.

126. Stensvold C. R. et al. Terminology for Blastocystis subtypes—a consensus // Trends in parasitology. – 2007. – T. 23. – №. 3. – C. 93-96.
127. Stensvold C. R., Alfellani M., Clark C. G. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes // Infection, Genetics and Evolution. – 2012. – Vol. 12. – №. 2. – P. 263-273.
128. Stensvold C. R., Clark C. G. Current status of Blastocystis: a personal view // Parasitology international. – 2016. – Vol. 65. – №. 6. – P. 763-771.
129. Stenzel D. J., Cassidy M. F., Boreham P. F. L. Morphology of Blastocystis sp. from domestic birds // Parasitology research. – 1994. – T. 80. – №. 2. – C. 131-137.
130. Stenzel D. J., Lee M. G., Boreham P. F. L. Morphological differences in *Blastocystis* cysts—an indication of different species? // Parasitology research. – 1997. – T. 83. – №. 5. – C. 452-457.
131. Stenzel D.J., Boreham P.F.L. *Blastocystis hominis* revisited // Clin. Microbiol. Rev. – 1996. – Vol. 9. – P. 563-584.
132. Tan K. S. W. Mirza H et al. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis spp* // Current infectious disease reports. – 2010. – T. 12. – №. 1. – C. 28-35.
133. Tan K. S., J. Howe, E. H. Yap, and M. Singh. 2001. Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death? // Parasitol. Res. – 2001. - Vol. 87.- P 362–367.
134. Tan K.S.W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis spp*. // Clin. Microbiol. Rev. -. 2008.- Vol.21.-P.639-683
135. Tan K.S.W., Suresh K.G. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients // Parasitology Research. – 2006. – Vol. 98. - № 3. – P. 189-193
136. Tan T. C, Ong S. C, Suresh K. G. Genetic variability of *Blastocystis sp*. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients // Parasitol Res. – 2009. - Vol. 105.- P. 1283–1286.

137. Tan T. C, Suresh K G, Smith H V: Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential // Parasitol Res. – 2008. - Vol. 104.- P 85-93.
138. Tasova Y. Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy // Acta Med Okayama. – 2000. - Vol. 54. – P. 133–136.
139. Tawil Y.S., Gilger M.A., Gopalakrishna G.S., Langston C., Bommer K.E. Invasive *Blastocystis hominis* infection in a child.// Arch Pediatr Adolesc Med.- 1994. - Vol. 148. No. 8. – P. 882-885.
140. Udkow M. P., Markell E. K. *Blastocystis hominis*: prevalence in asymptomatic versus symptomatic hosts // Journal of Infectious Diseases. – 1993. – Vol. 168. – №. 1. – P. 242-244.
141. Valsecchi, R. 2004. Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection / Valsecchi, R., P. Leghissa, and V. Greco //Acta Derm. Venereol. – 1993. – Vol. 84. – P. 322-323.
142. Vannatta J. B., Adamson D., Mullican K. *Blastocystis hominis* infection presenting as recurrent diarrhea // Ann. Intern. Med.– 1985. - Vol. 102.- P 495-496.
143. Vargas-Sánchez GB, Romero-Valdovinos M, Ramírez-Guerrero C, et al. *Blastocystis* isolates from patients with irritable bowel syndrome and from asymptomatic carriers exhibit similar parasitological loads, but significantly different generation times and genetic variability across multiple subtypes // PLoS One. –. 2015. – Vol.10. – №. 4. – P. e0124006.
144. Vennila G. D., Suresh K. G et al. Irregular shedding of *Blastocystis hominis* // Parasitology research. – 1999. – Vol. 85. – №. 2. – P. 162-164.
145. Vogelberg C. et al. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms // Parasitology international. – 2010. – Vol. 59. – №. 3. – P. 469-471.

146. Wenyon C. M. A new flagellate (*Macrostoma mesnili* n. sp.) from the human intestine, with some remarks on the supposed cysts of *Trichomonas* // *Parasitiol.* - 1910. - Vol. 3. - P. 210
147. Wiebe J. M., et al. Development and use of a gold-standard data set for subjectivity classifications. In *ACL99, Proceedings of the 37th Annual Meeting of the Association for Computational Linguistics* // College Park, MD. -1999. - P. 246-253.
148. Wolynska. M., and Soroczyn W. *Blastocystis hominis* Brumpt, 1912 (Phycomycetes) w narzadzie rodnym kobiety // *Pol. Tyg. Lek. (Poland).* - 1972.- Vol. 27. – P. 788-791.
149. Yakoob J. et al. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis* / J. Yakoob et al. // *The American journal of tropical medicine and hygiene.* – 2004. – Vol. 70. – №. 4. – P. 383-385.
150. Yason J.A.; Tan, K.S.W. Seeing the Whole Elephant: Imaging Flow Cytometry Reveals Extensive Morphological Diversity within *Blastocystis* Isolates // *PLoS ONE.*- 2015. – 10. e0143974
151. Yoshikawa H. et al. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats // *Parasitology research.* – 2004. – Vol. 94. – №. 6. – P. 391-396.
152. Yoshikawa H. et al. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities // *Journal of clinical microbiology.* – 2000. – Vol. 38. – №. 4. – P. 1324-1330.
153. Yoshikawa H. et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries // *Parasitology research.* – 2004. – T. 92. – №. 1. – P. 22-29.
154. Yoshikawa H. et al. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches // *Journal of Eukaryotic Microbiology.* – 2007. – Vol. 54. – №. 1. – P. 33-37.
155. Young C.R., Yeo F.E. *Blastocystis* and Schistosomiasis Coinfection in a patient with Chronic Kidney Disease // *Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Medicine.* – 2014. - Vol. 51. – №. 1. – P. 45-49.

156. Zaman V. The diagnosis of *Blastocystis hominis* cysts in human faeces // J. Infect.- 1996. - Vol.33. – P. 15–16.
157. Zaman V., Howe J., Ng M. Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis* // Parasitology research. – 1997. – Vol. 83. – №. 3. – P. 306-308.
158. Zierdt C. H. *Blastocystis hominis* - past and future // Clinical Microbiology Reviews. – 1991. – Vol. 4. – №. 1. – P. 61-79.
159. Zierdt C. H. *Blastocystis hominis*, a protozoan parasite and intestinal pathogen of human beings // Clin. Microbiol. Newsl. – 1983. - Vol. 57. – №. 5. – P 57–59.
160. Zierdt C. H. Studies of *Blastocystis hominis* // J Protozool. – 1973. – Vol. 20. – P. 114–121.
161. Zierdt C. H. Taxonomic status of *Blastocystis hominis*: reply // Parasitol. Today. – 1993. Vol. 9. - P. 18 – 19.
162. Zierdt C. H., Tan H. K. Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1976. – Vol. 50. – №. 3. – P. 277-283.
163. Zierdt C. H., Rude W. S., Bull B. S. Protozoan characteristic of *Blastocystis* // Am. J. Clin. Pathol. 1967. Vol. 48. P. 495—501.
164. Zuel-Fakkar N. M., et. al. Study of *Blastocystis hominis* isolates in urticaria: a case–control study / Zuel-Fakkar N. M., Abdel Hameed D. M., Hassanin O. M. // Clinical and Experimental Dermatology: Experimental dermatology. – 2011. – Vol. 36. – №. 8. – P. 908-910.

ОБРАЗЕЦ АНКЕТЫ-ОПРОСНИКА

1. Фамилия (чей анализ) _____
2. Имя, отчество (полностью) _____
3. Дата рождения _____
4. Домашний адрес: _____
5. Телефон: _____
6. Номер детского сада или школы: _____
7. В какую страну выезжали в ближайшее время (6-12 мес.):

8. Основные жалобы (подчеркнуть):

аллергические реакции, высыпание по телу, зуд тела, анальный зуд, боли в животе, метеоризм, диарея, запор.

9. Наличие хронических заболеваний (если есть написать):
