



Uniwersytet  
Kardynała Stefana Wyszyńskiego  
w Warszawie

**mgr Adam KACZMAREK**

***Blastocystis* u ludzi i zwierząt stałocieplnych w Polsce:  
różnorodność genetyczna i potencjał zoonotyczny**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. i n. o zdr. Rusłan SAŁAMATIN

Promotor pomocniczy: dr n. med. Aleksandra SĘDZIKOWSKA

Zakład Mikrobiologii i Parazytologii



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

**Warszawa 2022 r.**

*Serdeczne podziękowania składam mojemu promotorowi  
Rusłanowi Sałamatinowi za wsparcie i ogromne pokłady cierpliwości oraz za wiarę  
w to iż ta praca powstanie.*

*Chciałbym również podziękować Danucie Cieleckiej i Marii Wesołowskiej oraz  
Aleksandrowi Masnemu i Aleksandrze Sędzikowskiej za wszystkie merytoryczne  
uwagi.*

*Podziękowania kieruję również do wszystkich osób, które dostarczały nam materiał,  
bez ich pomocy ta praca nie miałaby takiego kształtu.*

***Słowa kluczowe:***

*Blastocystis*, człowiek, ssaki, ptaki, pasożyt, różnorodność genetyczna, Polska

***Key words:***

*Blastocystis*, human, mammals, birds, parasite, genetic diversity, Poland

## Spis treści

I. WSTĘP .....	13
<b>I.1. Przegląd historyczny .....</b>	<b>13</b>
I.1.1. Historia odkrycia i ustalenia pozycji taksonomicznej .....	13
I.1.1.1. Opisanie nowego gatunku i rodzaju .....	13
I.1.1.2. Pierwsze próby określenia pozycji taksonomicznej <i>Blastocystis</i> .....	15
I.1.1.3. Pierwsze badania molekularne.....	16
I.1.1.4. Przełomowe badania molekularne.....	18
I.1.1.5. Krótka charakterystyka Stramenopile i ich pozycja wśród eukariontów.....	19
I.1.1.6. Współczesne poglądy na miejsce <i>Blastocystis</i> wśród organizmów żywych .....	20
I.1.2. Gatunki opisane w obrębie rodzaju <i>Blastocystis</i> .....	24
I.1.2.1. Gatunki <i>Blastocystis</i> opisane u organizmów stałocieplnych .....	24
I.1.2.2. Gatunki <i>Blastocystis</i> opisane u zwierząt zmiennocieplnych .....	26
I.1.2.3. Pasożyty bezkręgowców.....	27
I.1.3. Historia badań <i>Blastocystis</i> sp. w Polsce .....	28
<b>I.2. Biologia .....</b>	<b>32</b>
1.2.1. Morfologia.....	33
1.2.1.1. Forma wakuolarna.....	33
1.2.1.2. Forma granularna .....	35
1.2.1.3. Forma ameboidalna.....	35
1.2.1.4. Cysty .....	36
1.2.2. Cykl życiowy.....	41
I.2.3. Woda jako nośnik oraz rekomendacje WHO.....	43
1.2.4. Genom .....	44
1.2.5. Mikrobiom jelita .....	44
1.2.5.1. <i>Blastocystis</i> a mikrobiom.....	46
1.2.5.2. <i>Blastocystis</i> a wpływ na behavior .....	48
<b>I.3. Chorobotwórczość <i>Blastocystis</i>, leczenie blastocystozy.....</b>	<b>49</b>
I.3.1. Kopatogenność.....	50
I.3.2. <i>Blastocystis</i> w niedoborach odporności. ....	51
I.3.3. Najczęstsze terapie farmakologiczne. ....	51
<b>I.4. Laboratoryjne metody wykrywania inwazji <i>Blastocystis</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY .....</b>	<b>57</b>

<b>III. MATERIAŁ I METODY .....</b>	<b>58</b>
<b>III.1. Materiał .....</b>	<b>58</b>
III.1.1. Materiał pochodzący od zwierząt.....	58
III.1.1.1. Puszcza Białowieska.....	58
III.1.1.2. Psy .....	60
III.1.1.3. Jeże .....	60
III.1.2. Materiał pochodzący od ludzi.....	60
<b>III.2. Metody.....</b>	<b>62</b>
III.2.1. Zabezpieczenie materiału.....	62
III.2.2. Badanie metodą hodowli .....	62
III.2.3. Badanie molekularne.....	65
III.2.3.1. Izolacja DNA.....	65
III.2.3.2. PCR.....	65
III.2.3.3. Sekwencjonowanie.....	65
III.2.4 Analiza wyników sekwencjonowania .....	68
III.2.5 Określenie subtypów <i>Blastocystis</i> .....	68
III.2.5.1 Analiza filogenetyczna .....	68
III.2.5.2 Serwis PubMLST .....	69
III.2.5.3. Badania podobieństwa faunistycznego subtypów <i>Blastocystis</i> spp. człowieka, innych ssaków i ptaków.....	69
III.2.6. Nomenklatura zwierząt stałocieplnych i <i>Blastocystis</i> .....	70
III.2.7. Sekwencje zgłoszone do GenBank.....	70
<b>IV. WYNIKI I OMÓWIENIE .....</b>	<b>71</b>
<b>IV.1 Walidacja metody pobierania, przechowywania i transportowania kału za pomocą wymazówek na podłożu transportowym. ....</b>	<b>71</b>
<b>IV.2 Różnorodność żywicieli, u których wykryto <i>Blastocystis</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>IV.3 Wykaz stwierdzonych subtypów <i>Blastocystis</i>.....</b>	<b>79</b>
<b>IV.4 Występowanie <i>Blastocystis</i> u przebadanych żywicieli.....</b>	<b>84</b>
IV.4.1. Ptaki .....	84
IV.4.2 Ssaki .....	86
IV.4.2.1. Występowanie i różnorodność <i>Blastocystis</i> u ssaków europejskich – przykład Białowieskiego Parku Narodowego (BPN).....	90
IV.4.2.2. Pies jako potencjalny rezerwuar <i>Blastocystis</i> – opis przypadku.....	92
IV.4.3 Podobieństwo struktury subtypów <i>Blastocystis</i> człowieka, innych ssaków i ptaków.....	95

V. DYSKUSJA .....	97
<b>V.1. Opisane Subtypy <i>Blastocystis</i> .....</b>	<b>97</b>
<b>V.2. <i>Blastocystis</i> u ludzi .....</b>	<b>97</b>
Subtypy ST1–ST4 .....	97
Subtyp ST4 .....	97
Subtyp ST5 .....	98
Subtypy ST6 .....	98
Subtyp ST7 .....	98
Subtyp ST9 .....	98
<b>V.3. <i>Blastocystis</i> u zwierząt.....</b>	<b>98</b>
V.3.1. Subtypy zoonotyczne, enzotyczne i antroponotyczne <i>Blastocystis</i> .....	99
V.3.2. Subtypy <i>Blastocystis</i> wykrywane u zwierząt (Polska vs Świat) .....	100
VI. PODSUMOWANIE .....	106
VII. WNIOSKI.....	106
VIII. PIŚMIENNICTWO .....	107
IX. ZAŁĄCZNIKI.....	137
Załącznik 1. Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe (wykaz) .....	137
Załącznik 2. Streszczenia ze zjazdów międzynarodowych i krajowych (wykaz) .....	138

# Wykaz ilustracji

## RYSUNKI

Rysunek 1. Formy morfologiczne <i>Blastocystis hominis</i> _____	14
Rysunek 2. Drzewa filogenetyczne z badań Johnson et al. 1989 _____	17
Rysunek 3. Pozycja filogenetyczna <i>Blastocystis hominis</i> na podstawie analizy molekularnej sekwencji genu <i>rRNA</i> małej podjednostki rybosomu _____	19
Rysunek 4. Drzewo filogenetyczne eukariontów _____	22
Rysunek 5. Formy wakuolarne <i>Blastocystis</i> wykrywane w rutynowym badaniu kału (barwienie płynem Lugola) _____	34
Rysunek 6. Cykl rozwojowy oraz drogi transmisji <i>Blastocystis</i> spp. _____	42
Rysunek 7. Immunomechanizm bariery jelitowej _____	46
Rysunek 8. Proponowany model ekologiczny mikrobiomu u osób niebędących i będących nosicielami <i>Blastocystis</i> spp. _____	47
Rysunek 9. Miejsca przyłączenia starterów _____	67
Rysunek 10. Przykładowy chromatogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania produktu PCR metodą Sanger'a _____	68
Rysunek 11. Analiza filogenetyczna <i>Blastocystis</i> stwierdzonych u ludzi i zwierząt _____	79
Rysunek 12. Analiza filogenetyczna <i>Blastocystis</i> stwierdzonych u zwierząt z terenu Białawieskiego Parku Narodowego _____	91
Rysunek 13. Subtypy <i>Blastocystis</i> wykryte u psa i jego właścicieli _____	92
Rysunek 14. Analiza filogenetyczna <i>Blastocystis</i> stwierdzonych u psa i jego opiekunów _____	93
Rysunek 15. Koła Eulera ilustrujące podobieństwo struktury subtypów <i>Blastocystis</i> człowieka, innych ssaków i ptaków _____	96

## ZDJĘCIA

Zdjęcie 1. Forma wakuolarna w hodowli ksenicznej _____	34
Zdjęcie 2. Forma granularna w hodowli ksenicznej _____	35
Zdjęcie 3. Forma ameboidalna w hodowli ksenicznej _____	36
Zdjęcie 4. Komórki <i>Blastocystis</i> obrazowane różnymi metodami _____	40
Zdjęcie 5. Podział binarny formy wakuolarnej, hodowla kseniczna _____	42
Zdjęcie 6. Badania kału w kierunku <i>Blastocystis</i> metodą hodowli _____	63
Zdjęcie 7. Formy wakuolarne <i>Blastocystis</i> wykryte u Opiekuna 1 _____	92

## MAPY

Mapa 1. Obszar badań z zaznaczeniem lokalizacji oraz ilości zbadanych zwierząt _____	59
Mapa 2. Geograficzne rozmieszczenie punktów zbioru materiału _____	61
Mapa 3. Geograficzne rozmieszczenie punktów zbioru materiału z których uzyskane były dodatnie wyniki _____	73
Mapa 4. Kraje, u których wykryto <i>Blastocystis</i> u psów _____	94

## *Wykaz stosowanych skrótów*

- BPN – Białowieski Park Narodowy
- ISP – International Society of Protistologists
- MLO – mitochondria-like organelle
- NIZP PZH-PIB – Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy  
Instytut Badawczy
- NMR – magnetyczny rezonans jądrowy
- PTP – Polskie Towarzystwo Parazytologiczne
- Sar – takson eukariontów zawierający trzy grupy: Stramenopile,  
Alveolata i Rhizaria
- SMX – Sulfamethoxazole
- ST – subtyp
- STS – sequence-tagged-site
- TMP – Trimetoprim



## Streszczenie

### *Blastocystis* u ludzi i zwierząt stałocieplnych w Polsce: różnorodność genetyczna i potencjał zoonotyczny

*Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis* to jeden z najczęściej wykrywanych pierwotniaków w jelicie grubym człowieka oraz zwierząt. Zараżenie *Blastocystis* na ogół przebiega bezobjawowo, w niektórych przypadkach blastocystozie towarzyszą: biegunka, bóle brzucha, wzdęcia, zaparcia, nudności. Na świecie częstość występowania *Blastocystis* spp. u ludzi waha się w przedziale od 1,5–10% w krajach rozwiniętych do 30–50% w krajach rozwijających się. *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis* stanowi kompleks gatunków, w którym dotychczas wyróżniono 28 subtypów (ST), w tym co najmniej 9 wyizolowanych od człowieka. Przypuszcza się, że subtyp ST1 jest najbardziej wirulentnym spośród dotychczas zbadanych subtypów. Wykazano także, że struktura subtypów ludzkich izolatów *Blastocystis* może wskazywać na rezerwuar i źródło zarażenia.

Przebadano materiał pochodzący od człowieka i 73 gatunków zwierząt, w tym 33 gatunków ssaków należących do 7 rzędów i 41 gatunków ptaków należących do 6 rzędów – łącznie 1413 próbek (784 próbki od człowieka oraz 629 próbek od zwierząt). Do wykrywania *Blastocystis* wykonywano mikroskopowe badanie próbek kału oraz hodowlę. Metodą PCR amplifikowano fragment genu kodującego rRNA małej podjednostki rybosomu. Produkty PCR sekwencjonowano, otrzymane sekwencje porównywano z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank. Wykonano analizę filogenetyczną z użyciem wnioskowania bayesowskiego. Po raz pierwszy w Polsce zbadano różnorodność alleli genu kodującego rRNA małej podjednostki rybosomu.

**Wyniki.** Obecność *Blastocystis* wykryto w 156 próbkach (86 dodatnich próbek pochodziło od człowieka, 70 – od zwierząt).

Stwierdzono:

- występowanie *Blastocystis* spp. u człowieka, 20 gatunków innych ssaków oraz u 13 gatunków ptaków;
- po raz pierwszy w Polsce występowanie *Blastocystis* spp. u 18 gatunków ssaków i 12 gatunków ptaków;

– dużą różnorodność subtypów występujących u ludzi i zwierząt stałocieplnych w Polsce (11 subtypów, w tym 8 subtypów wykryto u człowieka).

Opisano 7 nowych alleli genu kodującego rRNA małej podjednostki rybosomu.

Największe podobieństwo wykazują struktury subtypów człowieka i innych ssaków, najmniejsze zaś struktury subtypów ptaków i ssaków. Większość wykrytych subtypów (7 z 11) stanowią subtypy zoonotyczne.

Należy spodziewać się wykrycia w przyszłości w Polsce jeszcze innych subtypów, niż stwierdzone dotychczas.

## Summary

### *Blastocystis* in Humans and Warm-Blooded Animals in Poland: Genetic Diversity and Zoonotic Potential

*Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis* is one of the most frequently detected protozoa in the large intestines of humans and animals. Infection with *Blastocystis* is generally asymptomatic, but in some cases, blastocystosis is accompanied by diarrhea, abdominal pain, flatulence, constipation, and nausea. The worldwide prevalence of *Blastocystis* spp. in humans ranges from 1.5 to 10% in developed countries, and from 30 to 50% in developing countries. *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis* is a complex of species in which 28 subtypes (ST) have been distinguished so far, including at least nine isolated from humans. It is assumed that the ST1 subtype is the most virulent of the subtypes studied so far. It has also been shown that the subtype structure of human *Blastocystis* isolates may indicate a reservoir and a source of infection.

**Material** from humans and 73 animal species were tested, including 33 species of mammals belonging to seven orders, and 41 species of birds belonging to six orders: a total of 1,413 samples (784 samples from humans and 629 samples from animals). Microscopic examination of fecal samples and cultures was performed in order to detect *Blastocystis*. PCR was used to amplify a fragment of a gene that encodes the rRNA of a small subunit of the ribosome. The PCR products were sequenced; the obtained sequences were then compared with the sequences deposited in the GenBank database. Phylogenetic analysis using Bayesian inference was performed next. For the first time in Poland, the diversity of alleles of the gene that encodes the rRNA of a small subunit of the ribosome has been studied.

**Results.** The presence of *Blastocystis* was detected in 156 samples (86 positive samples were from humans, 70 from animals).

Found:

- the occurrence of *Blastocystis* spp. in humans, 20 species of other mammals, and 13 species of birds;
- *Blastocystis* spp. was found in 18 species of mammals and 12 species of birds in which the protozoa had not been detected before in Poland;
- a large variety of subtypes were found in humans and warm-blooded animals in Poland (11 subtypes, including eight subtypes detected in humans).

Seven new alleles of the gene that encodes the rRNA of a small subunit of the ribosome have been described.

When comparing subtypes, the most similar are the structures of the subtypes of man and other mammals, while the smallest are the structures of the subtypes of birds and mammals. Most of the subtypes detected (7 out of 11) are zoonotic subtypes.

It should be expected that in Poland more subtype variants will be detected in the future than those found so far.

## I. Wstęp

*Blastocystis* jest beztlenowym jednokomórkowym endosymbiontem, często występującym w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt [1]. Historia jego odkrycia i opisanie jest niezwykła i obejmuje początkowy okres badań z przed ponad 100 lat, lata zapomnienia oraz okres intensywnych badań w obecnych czasach [2].

Żeby lepiej zrozumieć i ocenić wydarzenia prowadzące do ustalenia pozycji taksonomicznej *Blastocystis* oraz pozwalające postrzegać *Blastocystis* jako ważny symbiont człowieka warto dokładnie prześledzić historię jego odkrycia i dalszych badań.

### I.1. PRZEGLĄD HISTORYCZNY

#### I.1.1. HISTORIA ODKRYCIA I USTALENIA POZYCJI TAKSONOMICZNEJ

##### I.1.1.1. OPISANIE NOWEGO GATUNKU I RODZAJU

Pierwsze rzetelne doniesienie na temat *Blastocystis* autorstwa Aleksieja ALEKSIEJEWY pojawiło się w 1911 roku w czasopiśmie *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie* [3]. W tej pracy zaproponował on nazwę *Blastocystis enterocola* dla organizmów wyizolowanych, m. in., z jelita trzustki, opisując w ten sposób nowy gatunek „*enterocola*” i jednocześnie nowy rodzaj „*Blastocystis*”.

Francuski parazytolog E. Brumpt na łamach czasopisma *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* zaproponował użycie stosowanej do dzisiaj nazwy *Blastocystis hominis* dla nowego gatunku wyizolowanego od ludzi. W 1912 roku ukała się praca, w której przedstawiono rysunki i opisy form morfologicznych tego pierwotniaka<sup>1</sup> (Rys. 1 a, b) [4].

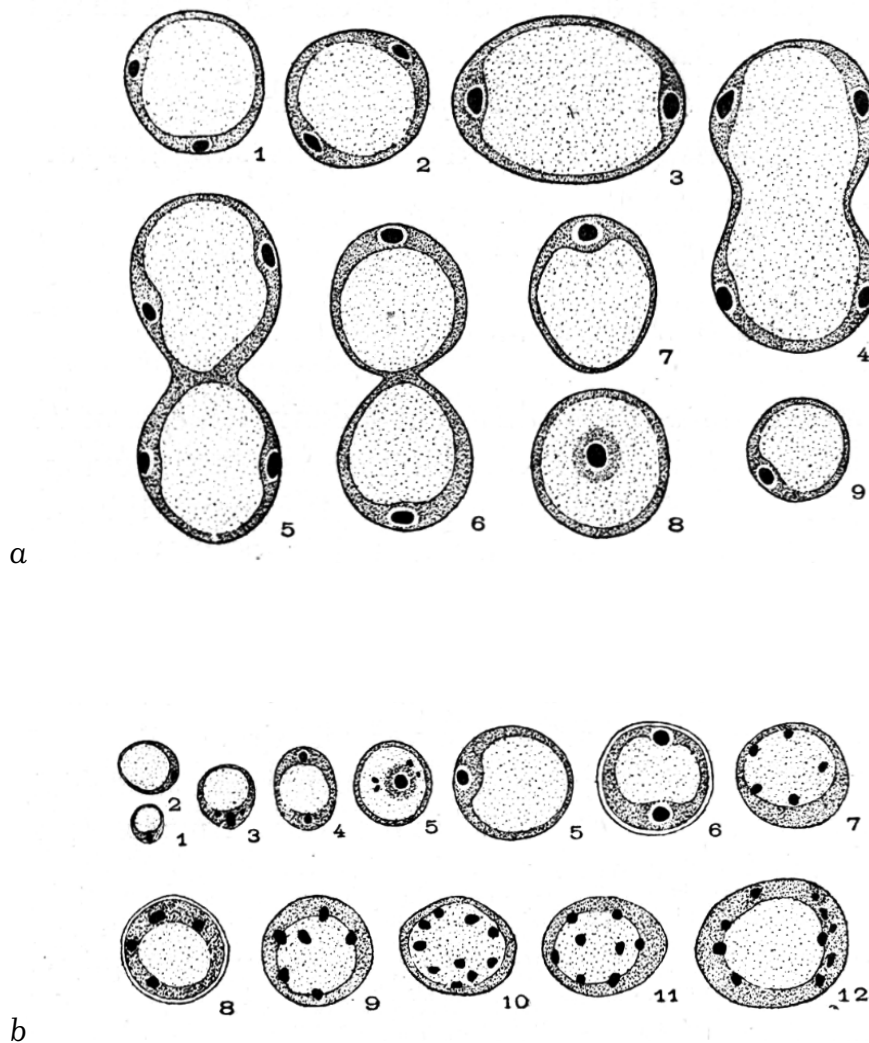
W tej pracy Brumpt zaproponował również nazwy dla kilku innych gatunków *Blastocystis* wyizolowanych od: koczkodana (*Cercopithecus ruber*) – *Blastocystis cercopithecii*, ropuchy szarej (*Bufo vulgaris*, = *Bufo bufo*) – *Blastocystis bufonis* oraz pijawki końskiej (*Haemopsis sanguisuga*) – *Blastocystis sanguisugae*. Niestety nie podano ich opisów ani ilustracji, dlatego na podstawie Art. 12 Kodeksu Nomenklatury

---

<sup>1</sup> Tu i dalej używamy historycznego określenia „pierwotniaki” dla nazwania cudzożywnych (heterotroficznych) protistów [278].

Zoologicznej nazwy te powinno się traktować jako *nomen nudum* (łac. "naga nazwa") [5].

W roku 1932 włoski badacz Ettore Micheletti [6] zaproponował stosowanie nazwy *Blastocystis jalinus* (Perroncitto, 1901) powołując się na domniemane wcześniejsze odkrycie gatunku przez E. Perroncitto. Propozycja E. Micheletti pozostała bez odzewu.



**Rysunek 1. Formy morfologiczne *Blastocystis hominis***

*a* – liczne formy w trakcie podziału (kał biegunkowy); *b* – formy wykrywane u tego samego pacjenta w stolcu uformowanym kilka dni później.

Źródło: [4].

### I.1.1.2. PIERWSZE PRÓBY OKREŚLENIA POZYCJI TAKSONOMICZNEJ *BLASTOCYSTIS*

Ustalenie pozycji taksonomicznej *Blastocystis* od samego początku sprawiało trudności. Pierwsi badacze zajmujący się tematem, czyli A. Alexeieff i E. Brumpt zaklasyfikowali go do grzybów (drożdżaków) – odpowiednie do rodzajów *Schizosaccharomyces* i *Saccharomyces*. Jednak W. Bensen i S. von Prowasek zaobserwowali, że *Blastocystis hominis* wytwarza spory różniące się od tych wytwarzanych przez grzyby. Pomimo iż później proponowano aby umieścić *Blastocystis* w rodzaju *Prototheca* należącego do alg [7], to w większości publikacji *Blastocystis* nadal był opisywany jako drożdżak. Istniały ku temu powody. Morfologicznie *Blastocystis* przypomina drożdżaki: uważało się wtedy, że nie ma nibynózek, nie porusza się aktywnie, zmienność wielkości jest dużo większa niż oczekiwana u pierwotniaków, podobnie jak i duża różnorodność form morfologicznych. Podział binarny łatwo było błędnie interpretować jako pączkowanie. Nieznane wtedy były formy cyst, a formy pełzakowate nie były rozpoznawane jako *B. hominis*. Brak widocznego jądra w jasnym polu na preparatach niebarwionych również sugerował że *Blastocystis* należy klasyfikować jako gatunek grzyba [2].

Dopiero postęp w technologii i nowe możliwości obrazowania pozwoliły na dokładniejszą ocenę tego mikroorganizmu. W 1967 roku Zierdt i współpracownicy przeprowadzili badania ultrastrukturalne przy pomocy mikroskopii elektronowej [8]. Uzyskane w ten sposób wyniki upewniły ich, że *B. hominis* zdecydowanie nie należy do grzybów. Wobec powyższego mikroorganizm został zreklasyfikowany do pierwotniaków. Pojawiło się wówczas pytanie o jego przynależność taksonomiczną wśród pierwotniaków. Początkowo *Blastocystis* zaliczano do sporowców. Zaproponowano nawet odrębną gromadę *Blastocystea* i odrębny rząd *Blastocystida* [9]. Systematyka wyglądała następująco:

Królestwo **Protozoa** Goldfuss 1818 emend. von Liebold, 1845

Typ **Protozoa** Goldfuss 1818

Podtyp **Sporozoa** Leuckart, 1879 emend. Levine 1963

Gromada **Blastocystea** Zierdt, 1978

Rząd **Blastocystida** Zierdt, 1978

Rodzaj ***Blastocystis*** Alexeieff, 1911

Gatunek ***B. hominis*** Brumpt, 1912.

Ch. H. Zierdt zaznaczył przy tym, że do sporowców *Blastocystis* jest zaklasyfikowany wstępnie i że mogą nastąpić późniejsze zmiany [9]. Dziesięć lat później autor stwierdził, że, ponieważ niektóre z form *Blastocystis* wykształcają nibynóżki oraz że komórki *Blastocystis* nie mają kompleksu apikalnego, to pierwotniak ten powinien mieścić się w podtypie Sarcodina. Przy czym rząd Blastocystida został obniżony do rangi podrzędu Blastocystina Zierd, 1988 w granicach rzędu Amoebida [10]:

**Królestwo Protista**

Podkrólestwo **Protozoa**

Typ **Sarcomastigophora**

Podtyp **Sarcodina**

Nadgromada **Rizopoda**

Gromada **Lobosea**

Podgromada **Gymnamoeba**

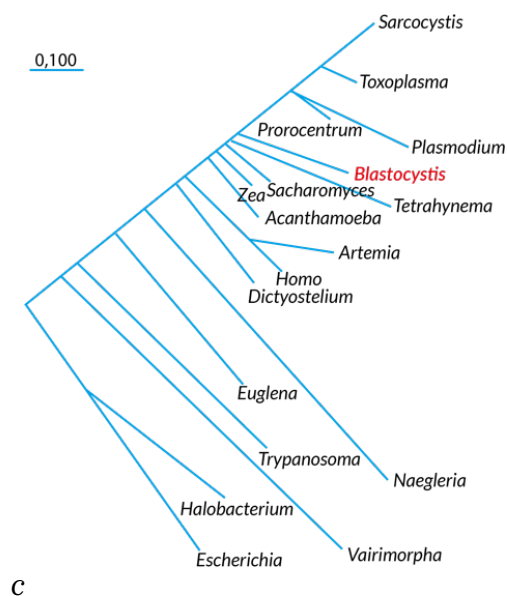
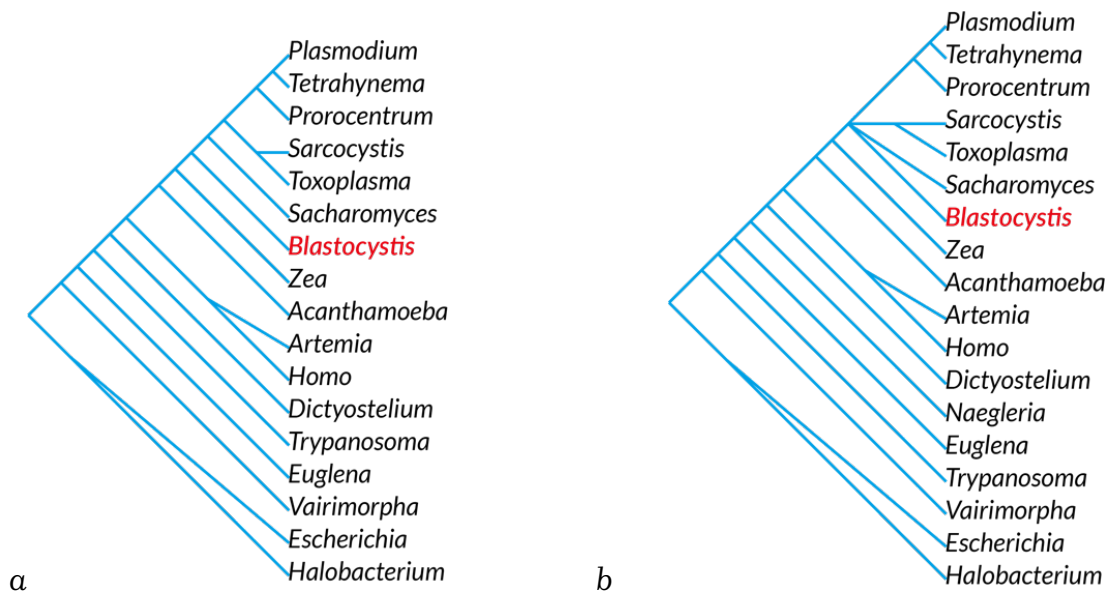
Rząd **Amoebida**

Podrząd **Blastocystina** Zierdt, 1988.

**I.1.1.3. PIERWSZE BADANIA MOLEKULARNE**

Już w następnym roku zostały opublikowane wyniki badań molekularnych rRNA małej podjednostki rybosomu z akсенicznego szczepu *Blastocystis*, które pokazały, że *Blastocystis* nie tworzy monofiletycznej grupy z *Saccharomyces*, *Neurospora*, *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Dictyostelium*, *Trypanosoma* czy *Euglena* (Rys. 2) [11]. Ponieważ wyniki badań sugerowały, że *B. hominis* nie jest blisko spokrewniony ani z drożdżakami, ani z grzybami, pełzakami czy sporowcami [11,12], zaproponowano dla *Blastocystis* status *incertae sedis* (lat. „o niepewnej pozycji”).





**Rysunek 2. Drzewa filogenetyczne z badań Johnson et al. 1989**

a – drzewo zbudowane metodą maksymalnej parsymonii; b – drzewo konsensusu dla trzech drzew zbudowanych metodą maksymalnej parsymonii; c – drzewo zbudowane metodą Fitch'a-Margoliash'a.

Źródło: opracowanie własne na podstawie [11].

Kilka lat później, chińscy badacze Jiang i He [13] uznali, że jeżeli *Blastocystis* nie pasuje do sporowców ani pełzaków, to może warto wyodrębnić dla *Blastocystis* specjalny takson rangi podtypu (!) i zaproponowali następujący układ:

Królestwo **Protista**

Podkrólestwo **Protozoa**

Typ **Sarcomastigophora**

Podtyp **Blastocystida** Jiang & He, 1993

Gromada **Blastocystea** Jiang & He, 1993

Rząd **Blastocystida** Jiang & He, 1993

Rodzina **Blastocystodae** Jiang & He, 1993

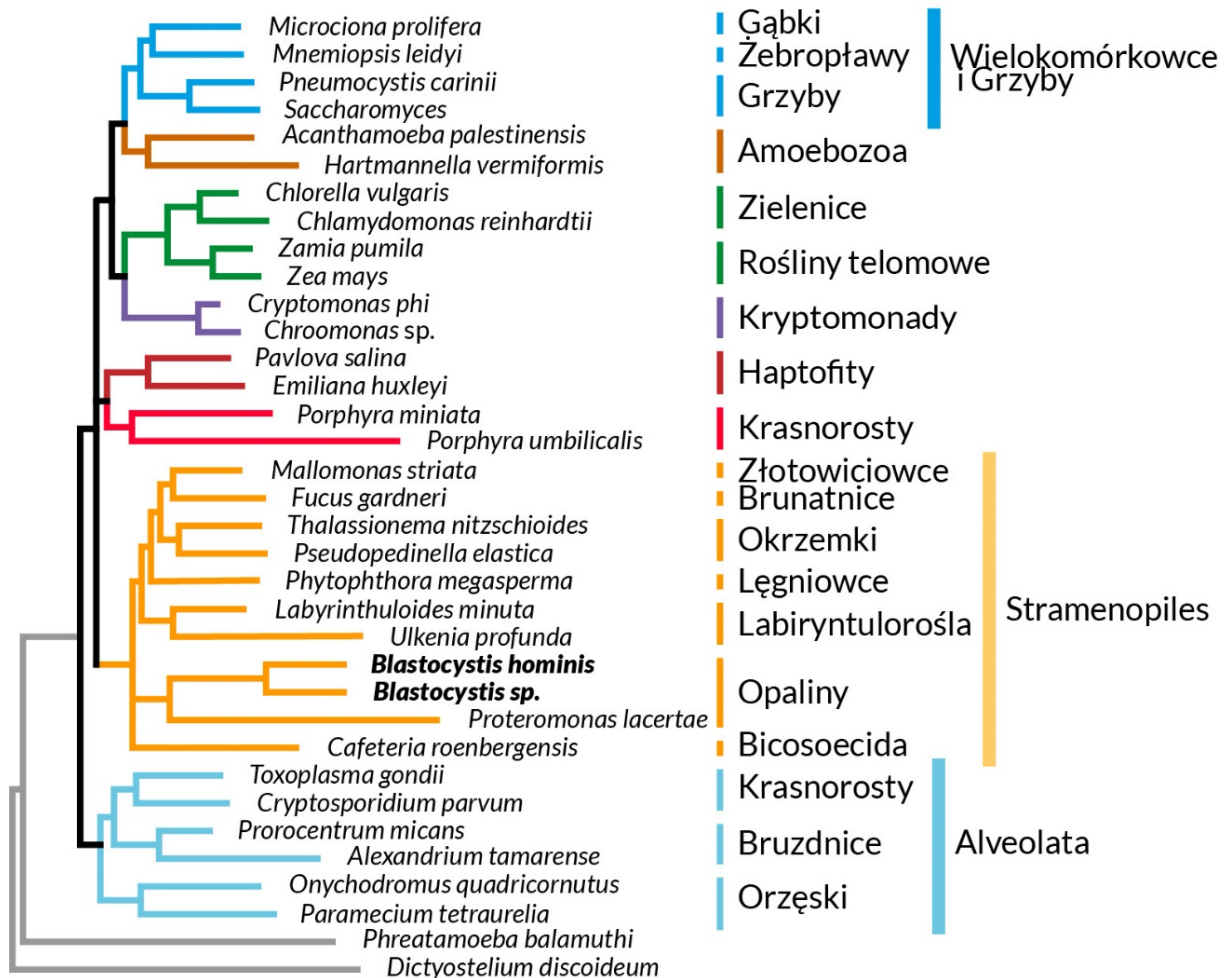
Rodzaj ***Blastocystis***

Gatunek ***B. hominis***.

W krótkim czasie pomysł ten został skrytykowany, uznano bowiem, że sam fakt, iż *Blastocystis* nie pasuje do ówczesnej klasyfikacji Protista to zbyt mało żeby tworzyć takson tak wysokiego szczebla [14–17]. Późniejsze badania molekularne oparte na sekwencji genu czynnika elongacyjnego  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ) również nie pozwoliły jednoznacznie ustalić pozycji taksonomicznej *Blastocystis* [18]; padła sugestia odniesienia *Blastocystis* do podtypu Conosa (typ Amoebozoa Lühe, 1913, infrakrólestwo Sarcomastigota) [19].

I.1.1.4. PRZEŁOMOWE BADANIA MOLEKULARNE

W roku 1996 w Nature został opublikowany artykuł pod tytułem „Human parasite finds taxonomic home” [20]. Autorzy otrzymali sekwencje genu rRNA małej podjednostki rybosomu dwóch gatunków *Blastocystis* (*B. hominis* oraz *Blastocystis* wyizolowany od świnki morskiej) i porównali je z homologicznymi sekwencjami przedstawicieli głównych grup eukariontów. Rekonstrukcja filogenetyczna wykonana z użyciem różnych metod, w tym: metody największej wiarygodności (maximum-likelihood), metody Fitch-Margoliash, metody przyłączenia sąsiada (neighbour-joining), metody parsymonii, jednoznacznie wykazała, że *Blastocystis* należy do grupy Stramenopile (Rys. 3). Przynależność *Blastocystis* do Stramenopile była potwierdzona wynikami późniejszych badań molekularnych, w których oprócz genu małej podjednostki rRNA przeanalizowano również kilka innych genów [21].



Rysunek 3. Pozycja filogenetyczna *Blastocystis hominis* na podstawie analizy molekularnej sekwencji genu rRNA małej podjednostki rybosomu

Źródło: opracowanie własne na podstawie [20].

#### I.1.1.5. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA STRAMENOPILE I ICH POZYCJA WŚRÓD EUKARIONTÓW

Straminopile stanowią niejednorodną grupę obejmującą jednokomórkowe i wielokomórkowe protisty, zarówno heterotroficzne jak i fotosyntetyczne. Przedstawicielami tej grupy są, m.in., brunatnice, okrzemki, labiryntulorośla, łęgniowce.

Stramenopile wraz z roślinami zielonymi, czerwonymi algami, zwierzętami, grzybami i alweolatami wyodrębniły się prawie jednocześnie miliard lat temu [20][22]. W przeciwieństwie do wszystkich innych eukariontów, Straminopile mają trójdzielne rurkowe włoski na powierzchni komórki lub na długiej przedniej witce (tzw. mastigonemy), a ich mitochondria posiadają tabularne grzebienie.

Już na samym początku zauważono [20], że *Blastocystis* jest bardzo nietypowym przedstawicielem Stramenopile. Wprawdzie, „mitochondria” *Blastocystis*

mają tabularne grzebienie, jednak *Blastocystis* jest organizmem beztlenowym, więc funkcje metaboliczne tych „mitochondriów” stają się niejasne („mitochondria” nie mają wielu elementów klasycznego szlaku mitochondrialnego). *Blastocystis* nie ma „włosek na witykach” (ang. „flagellar hairs”) ani też wici. Prawdopodobnie wynika to z wtórnej utraty tych cech, ponieważ przedstawiciele spokrewnionej z *Blastocystis* grupy Proteromonadidae mają wici oraz „flagellar hairs”. Ponieważ Proteromonadidae należą do podtypu Opalinata, a *Blastocystis* jest jedyną grupą pośród Opalinata które nie mają na powierzchni rzęsek, to powstało pytanie czy można *Blastocystis* odnieść do gromady Opalineae?

Pod koniec XX wieku, w trakcie przeglądu „Systemu Sześciu Królestw” (Six-Kingdom System of Life) wybitny brytyjski biolog ewolucyjny Thomas Cavalier-Smith zaproponował wyróżnić w granicach podtypu (*subphylum*) Opalinata odrębną gromadę (*classis*) Blastocystea, uzasadniając decyzje tym, że na powierzchni komórek *Blastocystis* brak rzęsek (lat. *sine ciliis*). Jednocześnie postulowało się przeniesienie Opalinata z królestwa Protozoa do królestwa Chromista (infrakrólestwo Heterokonta), gdzie Opalinata razem z Pseudofungi i Bigyromonada utworzyły nową botaniczną gromadę (*phylum*) Bigyra [23]. Grupę Stamenopiles Cavalier-Smith uznał za identyczną z infrakrólestwem Heterokonta [24]. Systematyka wyglądała następująco:

#### Królestwo **Chromista**

Podkrólestwo **Chromobiota** Cavalier-Smith, 1991

Infrakrólestwo **Heterokonta** Cavalier-Smith, 1986

Nadgromada/Nadtyp **Gyrista** Cavalier-Smith, 1998

Gromada/Typ **Bigyra** Cavalier-Smith, 1998

Podgromada/Podtyp **Opalinata** Wenyon, 1926

Klasa/Gromada **Blastocystea** Cavalier-Smith, 1998

Rodzina **Blastocystaceae/Blastocystidae**<sup>2</sup>.

#### I.1.1.6. WSPÓŁCZESNE POGLĄDY NA MIEJSCE *BLASTOCYSTIS* WŚRÓD ORGANIZMÓW ŻYWYCH

W XXI wieku ukazały się trzy rewizje klasyfikacji eukariontów, która dotyczyła taksonów wysokiej rangi, wydane pod auspicjami Międzynarodowego Towarzystwa Protistologów (International Society of Protistologist; ISP) [25–27].

---

<sup>2</sup> Nazwa rodziny Blastocystaceae jest zgodna z wymogami „Kodeksu nomenklatury botanicznej”, zgodnie z „Kodeksem nomenklatury zoologicznej” powinno być Blastocystidae.

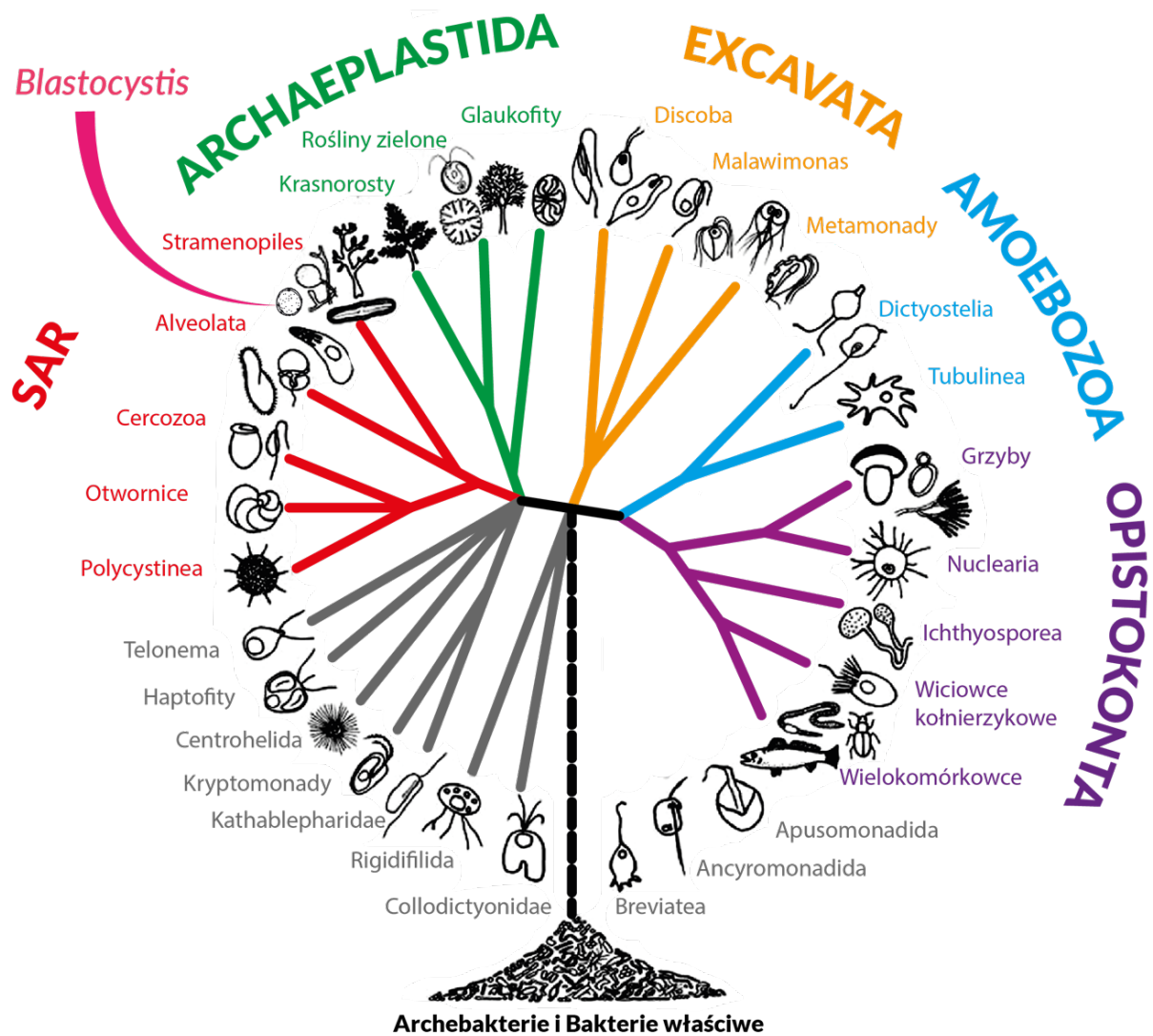
Publikacja z roku 2005 była pierwszą od 25 lat klasyfikacją zaproponowaną przez ISP [28]. Wszystkie Eucariota podzielono w niej na 6 dużych grup – Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Excavata – oraz grupę Chromalveolata obejmującą: Cryptophyceae, Haptophyta, Stramenopiles, Alveolata. Ponieważ zrezygnowano wtedy z formalnego określenia nazw rang (nd. *phylum*, *class*, *order*), to miejsce *Blastocystis* możemy określić w następujący sposób:

**Chromalveolata** Adl et al., 2005 / **Stramenopiles** Patterson, 1989 / **Opalinata** Wenyon, 1926 / **Blastocystis** Alexieff, 1911.

Wcześniej wysunięto hipotezę, według której grupa Chromalveolata (= Chromista sensu Cavalier-Smith, 1998), powstała w następstwie symbiozy fagotroficznych heterotroficznych eukariontów z fotosyntezującymi eukariontami-krasnorostami. Można więc przyjąć, że dotyczy to też *Blastocystis*.

Rewizja z 2012 roku [26] jest ciekawa z tego względu, że grupę Chromalveolata uznano jako prawdopodobnie polifiletyczną. Pokazano związek pomiędzy Alveolata, Stramenopile a Rhizaria i stworzono nowy takson: ribogrupę (ang. ribogroup) Sar (czyli Stramenopile-Alveolata-Rhizaria). Wszystkie Eukaryota zostały podzielone na 2 duże grupy: Diaphoretickes oraz Amorphea (Rys. 4). Pozycję *Blastocystis* wśród innych eukariontów określono wówczas następująco:

**Eukaryota** / **Diaphoretickes** / **SAR** / **Stramenopiles** Patterson 1989 / **Opalinata** Wenyon, 1926 / **Blastocystis** Alexieff, 1911.



Rysunek 4. Drzewo filogenetyczne eukariontów

Źródło: opracowanie własne na podstawie [26]

W lutym 2019 r. opublikowano zaktualizowaną edycję klasyfikacji eukariontów [27]. Została ona określona jako „złoty standard” dla szerokiego przeglądu klasyfikacji biologicznej gatunków oraz klasyfikacji nowo odkrytych organizmów. Współczesna klasyfikacja nie operuje już takimi formalnymi określeniami jak: pierwotniaki, zwierzęta i rośliny. Jednak są one nadal często używane, ponieważ dzięki nim bardziej zrozumiałe są powiązania pomiędzy zwierzętami, grzybami, roślinami, glonami i pierwotniakami. Ze względu na to, że obecna edycja zawiera nieformalną sugestię co do rangi niektórych taksonów i dla grupy *Blastocystis* przewiduje takson rangi niższej niż Rząd, grupę *Blastocystis* można uwzględnić

w randze rodziny Blastocystidae. Podsumowując, położenie *Blastocystis* wśród żywych organizmów na dzień dzisiejszy jest następujące:

**Eukaryota** / Domena **Diaphoretickes** / **Sar** / Typ **Stramenopiles** / Gromada **Bigyra** / **Opalozoa** / Rząd **Opalinata** / Rodzina **Blastocystidae** / Rodzaj ***Blastocystis***.

## I.1.2. GATUNKI OPISANE W OBRĘBIE RODZAJU *BLASTOCYSTIS*

Łącznie opisano co najmniej 22 odrębne gatunki w granicach rodzaju *Blastocystis* – 13 gatunków człowieka i zwierząt stałocieplnych (ptaków i ssaków) i 9 gatunków u zwierząt zmiennocieplnych.

### I.1.2.1. GATUNKI *BLASTOCYSTIS* OPISANE U ORGANIZMÓW STAŁOCIEPLNYCH

#### *Pasożyty ptaków*

##### *Blastocystis anatis* Belova, 1991

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od kaczki domowej (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) z obwodu kaliningradzkiego Rosji [29]. Gatunek ten był także odnotowany w Baszkortostani (Federacja Rosyjska) [30].

##### *Blastocystis anseri* Belova, 1992

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od gęsi domowej (*Anser anser* f. *domestica*) z obwodu kaliningradzkiego Rosji [31].

##### *Blastocystis galli* Belova & Kostenko, 1990

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od kury domowej (*Gallus gallus*) z obwodu leningradzkiego Rosji. Gatunek był odnotowywany także na Białorusi, na Ukrainie i na Kaukazie Południowym [32]. Wg L. Bielowej [33] do tego gatunku należą również pierwotniaki opisane przez M. Kuczyńskiego [34].

##### *Blastocystis meleagridis* Belova, 1992

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od indyka zwyczajnego (*Meleagris gallopavo*) z Uzbekistanu (wilajet kaszkadaryjski) [33].

##### *Blastocystis numidae* Belova, 1992

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od perlicy zwyczajnej (*Numida meleagris*) z Uzbekistanu (wilajet kaszkadaryjski) [33].



## *Pasożyty ssaków*

### *Blastocystis bovis* Belova, 1992

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od bydła domowego (*Bos taurus*) z obwodu kaliningradzkiego Rosji [33].

### *Blastocystis cercopitheci* Brumpt, 1912 – *nomen nudum*

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od koczkodana (*Cercopithecus ruber*). Oryginalna publikacja [4] nie zawiera żadnych cech morfologicznych i, zgodnie z Art. 12 Kodeksu nomenklatury zoologicznej [5], nazwę uznajemy za *nomen nudum*.

### *Blastocystis equi* Belova, 1992

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od konia domowego (*Equus caballus*) z obwodu kaliningradzkiego Rosji [33].

### *Blastocystis felis* Brumpt, 1924

Nie udało się nam dotrzeć do oryginalnej publikacji. Informacje o opisaniu tego gatunku podaje Belova [33].

### *Blastocystis hominis* Brumpt, 1912

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od człowieka (*Homo sapiens*), prawdopodobnie z Francji [4]. Wielokrotnie odnotowywany od ludzi i zwierząt na całym świecie.

### *Blastocystis lemuri* Krylov & Belova, 1997

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od lemura katta (*Lemur catta*) z Zoo w Sankt-Petersburgu (Rosja) [35].

### *Blastocystis ovis* Belova, 1992

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od owcy domowej (*Ovis aries*) z obwodu kaliningradzkiego Rosji [33].

*Blastocystis ratti* Chen, Singh, Ho, Tan, Ng, Moe, Yap, 1997

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od szczura laboratoryjnego szczepu Wistar (*Rattus norvegicus*) z Singapuru. Uważa się, że *B. ratti* odpowiada subtypowi ST4 wg aktualnego nazewnictwa [36].

*Blastocystis suis* Belova, 1992

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od świni domowej (*Sus domesticus*) z obwodu kaliningradzkiego Rosji [33]. Autorka [33] wykryła ten gatunek również u dzika (*Sus scrofa*). Był odnotowany też w Baszkortostani (Federacja Rosyjska) [30].

I.1.2.2. GATUNKI *BLASTOCYSTIS* OPISANE U ZWIERZĄT ZMIENNOCIĘPLNYCH

*Pasożyty płazów*

*Blastocystis bufonis* Brumpt, 1912 – *nomen nudum*

Gatunek opisano na podstawie materiału od ropuchy szarej (*Bufo vulgaris* = *Bufo bufo*). Oryginalna publikacja [4] nie zawiera opisu gatunku, dlatego zgodnie z Art. 12 Kodeksu nomenklatury zoologicznej [5] uznajemy tę nazwę jako *nomen nudum*.

*Blastocystis enterocola* Alexeieff, 1911

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od traszki grzebieniastej (*Triturus cristatus*) [3].

*Blastocystis lessonae* Belova, 1992

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od żaby jeziorkowej (*Rana lessonae*, = *Pelophylax lessonae*) z obwodu kaliningradzkiego Rosji [33].

## *Pasożyty gadów*

### *Blastocystis agrionemidis* Belova, 1997

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od żółwia stepowego (*Agrionemis horsfieldi*) z Petersburskiego Zoo, Rosja [37].

### *Blastocystis cycluri* Singh, Ho, Yap, Ng, Tan, Moe, Yap, 1996

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od legwana nosorogiego (*Cyclura cornuta*) z Zoo w Singapurze [38].

### *Blastocystis geocheloni* Singh, Ho, Yap, Ng, Tan, Moe, Yap, 1996

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od żabuti czarnego (*Geochelone carbonaria*) z Zoo w Singapurze [38].

### *Blastocystis lapemi* Teow, Zaman, Ng, Chan, Yap, Howe, Gopalkrishnakone, Singh, 1991

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od morskiego węża (*Lapemis hardwickii* = *Hydrophis hardwickii*) z Morza Południowochińskiego [39].

### *Blastocystis pythoni* Singh, Ho, Yap, Ng, Tan, Moe, Yap, 1996

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od pytona siatkowego (*Python reticulatus*) z Zoo w Singapurze [38]. W Polsce był odnotowany przez Sałamatina i zespół u żółwia (*Cuora mouhotii*) ze sklepu zoologicznego w Warszawie [40].

#### I.1.2.3. PASOŻYTY BEZKRĘGOWCÓW

### *Blastocystis sanguisugae* Brumpt, 1912 – *nomen nudum*

Gatunek opisano na podstawie badania materiału uzyskanego od pijawki końskiej (*Haemopsis sanguisuga*). Oryginalna publikacja [4] nie zawiera żadnych cech morfologicznych i, zgodnie z Art. 12 Kodeksu nomenklatury zoologicznej [5], nazwę uznajemy za *nomen nudum*.

### I.1.3. HISTORIA BADAŃ *BLASTOCYSTIS* SP. W POLSCE

W 1955 roku pojawia się w literaturze polskiej pierwsza praca na temat *Blastocystis*<sup>3</sup>. Autorzy opisali w niej wykrycie tego pierwotniaka u dzieci z okolic Lublina [41]. Kolejna praca pojawiła się kilkanaście lat później, w 1972 roku. W pracy tej opisano *Blastocystis* w wymazach okołoodbytniczych pobranych od kobiet również z okolic Lublina [42].

Po tej publikacji przez około 20 lat nie ukazała się żadna praca na temat blastocystozy w Polsce. Dopiero w 1990 i 1991 roku prof. E. Siński i zespół wykryli *Blastocystis* u dzieci z Warszawy i okolic [43,44]. W 1995 roku pojawiła się praca pogładowa zatytułowana „*Blastocystis hominis* – nowy patogen jelitowy?”, opublikowana w czasopiśmie Diagnostyka Laboratoryjna [45].

W roku 1997 prof. P. Myjak i zespół [46] wykryli *Blastocystis* metodą PCR u próbkach kału pochodzących od pacjentów. Były to *de facto* pierwsze badania molekularne w kraju dotyczące *Blastocystis*.

Na 18. zjeździe Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego (PTP) zaprezentowano doniesienie „Opportunistic infections caused by Protozoa”, w którym po raz pierwszy w naszym kraju rozważano możliwe zagrożenia *Blastocystis hominis* dla osób z niedoborem odporności, spowodowanym zakażeniem wirusem HIV [47]. Na tym samym zjeździe PTP swoją pracę, dotyczącą *Blastocystis*, zaprezentował również A. Kotłowski [48].

W 2001 r. ukazała się kolejna praca przeglądowa, w której poza weryfikacją dotychczasowej wiedzy na temat *Blastocystis* przedstawiono również diagnostykę laboratoryjną tego pierwotniaka [49]. W 2005 r. na polskim rynku pojawiła się książka pod redakcją D. Prokopowicz pt. „Zagrożenia oportunistyczne”, w której znalazł się podrozdział autorstwa A. Grzeszczuk [50], opisujący *B. hominis*.

W 2007 r. ukazały się dwie prace, jedna opisująca *Blastocystis* u dzieci z okolic Poznania [51], oraz praca P. Nowaka i zespołu, która z punktu widzenia aktualnej na tamten czas wiedzy wydaje się być zastanawiająca, ponieważ wśród 5 tys. przebadanych osób z okolic Krakowa u żadnej nie wykryto *Blastocystis* [52].

---

<sup>3</sup> Wg L. Bielowej [33] pierwszego odnotowania *Blastocystis* na terenie Polski dokonał M. Kuczyński ponad 100 lat temu, wykrywając tego pierwotniaka u kur [34]. Nam nie udało się odnaleźć potwierdzenia tego faktu we wspomnianej pracy M. Kuczyńskiego.

W cyklu artykułów szkoleniowych biuletynu „Farmacja Krakowska” w 2010 r. ukazał się artykuł zatytułowany „*Blastocystis hominis* – enigmatyczny pierwotniak przewodu pokarmowego człowieka”, w którym autorzy przybliżyli farmaceutom ten mikroorganizm [53].

Dwa lata później wydano pierwszą i dotychczas jedyną monografię całkowicie poświęconą tematyce blastocystozy autorstwa A. Kotłowskiego [54]. Przypadki blastocystozy Autor poddał badaniom koprologicznym, hodowlanym, molekularnym, epidemiologicznym i klinicznym. Wykonano łącznie 147 badań, ustalając genotyp *Blastocystis* sp. u 134 osób, natomiast w 13 przypadkach genotypu nie udało się określić. Ustalono, że w badanym materiale dominował genotyp ST3 (u 57,2%), wykryto również genotypy ST1, ST2, ST4 oraz mieszaną inwazję ST1+ST3. Były to pierwsze w Polsce badania określające genotypy *Blastocystis*. Badania wykonano metodą w oparciu o użycie starterów specyficznych dla poszczególnych subtypów (PCR with subtype-specific sequence-tagged-site (STS) diagnostic primer).

Rok później B. Kowalewska i zespół podsumowują wyniki badań pacjentów przychodni Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni z okresu ponad 30 lat (1978–2010) [55]. Ciekawym jest fakt, że w latach 1978–1991 w laboratorium nie identyfikowało się *Blastocystis*; prawdopodobnie organizmy te traktowano jako grzyby (drożdżaki). Natomiast w latach 1992–2010 obserwujemy wzrost prevalencji z 1,34% w roku 1978 do 10,15% w 1996 r., a później nawet do 18,8% w roku 2010.

W tym samym czasie pojawiła się pierwsza informacja o odnotowaniu *Blastocystis* u zwierząt z terenu Polski. Angielski badacz M. Alfellani i zespół [56] zbadali ponad 500 próbek pochodzących od zwierząt z różnych regionów Europy, Afryki i Azji, w tym 8 próbek pochodzących od zwierząt z Polski. W jednej z tych 8 próbek, pochodzącej od myszarki leśnej (*Apodemus flavicollis*) badacze wykryli subtyp ST3 *Blastocystis* sp. Odpowiednia sekwencja nie została zgłoszona do bazy danych GenBank.

W Polsce pierwszą identyfikację *Blastocystis* u zwierząt („kur reprodukcyjnych mięsnych” oraz „indyków rzeźnych”) dokonały K. Bobusia i A. Gawel z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Badania wykonano metodą PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych do *Blastocystis*. Nie określono wówczas subtypu (-ów) [57].

W tym samym roku w Rocznikach Akademii Medycznej w Szczecinie ukała się kolejna praca przeglądowa dotycząca epidemiologii, diagnostyki i leczenia zarażeń *B. hominis* [58]. Następnie opublikowano trzy przeglądowe artykuły: łączące *B. hominis* z objawami chorobowymi przewodu pokarmowego (zespół drażliwego jelita) i chorobami skóry (pokrzywka) [59,60] oraz praca poruszająca temat infekcji oportunistycznych [61].

W tym samym okresie Sałamatin i zespół opisali *B. pythoni* u żółwia kasetkowego, jest to pierwsze i, jak dotychczas, jedyne odnotowanie *Blastocystis* u zmiennocieplnego żywiciela w Polsce [40].

Pierwsza w Polsce identyfikacja subtypu *B. hominis* sensu lato, oparta na sekwencjonowaniu produktu PCR (SSU-rDNA Sequence-Based Identification) była przeprowadzona również przez nasz zespół [62]. Zostały wykryte subtyp ST3, wcześniej odnotowany w naszym kraju przez A. Kotłowskiego metodą „Sequence Tagged Site Technique”, oraz subtyp ST6. Przy tym subtyp ST6 był odnotowany w Polsce po raz pierwszy, jest on stosunkowo rzadko wykrywany u ludzi, częściej natomiast występuje u ptaków. W krótkim czasie, jeszcze w tym samym roku, również nasz zespół wykrył ten sam subtyp ST6 u kur domowych (*Gallus gallus f. domestica*) z okolic Warszawy [63]. Subtyp ST6 był wówczas uznany za nowy zoonotyczny czynnik w Polsce.

W 2016 roku K. Korzeniewski z Zakładu Epidemiologii i Medycyny Tropikalnej Wojskowego Instytutu Medycznego opublikował na łamach Forum Medycyny Rodzinnej artykuł „Choroby pasożytnicze przewodu pokarmowego w Polsce”, w którym ujął między innymi zagadnienia dotyczące zarażeń *B. hominis* [64] oraz na łamach Family Medicine and Primary Care Review pracę „Inwazje pasożytami jelitowymi w środowisku dziecięcym Warszawy” [65].

Natomiast w roku 2017 opublikowano dwie prace, w tym dotyczącą możliwości terapeutycznych diety jako alternatywy dla chemioterapeutyków w leczeniu blastocystozy [66] oraz naszą pracę prezentującą wyniki badań różnorodności genetycznej *B. hominis* na terenie Polski [67].

W 2018 roku na 14 Międzynarodowym Kongresie Parazytologicznym w Korei został zaprezentowany przez nas pierwszy przypadek wykrycia *Blastocystis* u jeża europejskiego [68] oraz określone ich subtypy.

Rudzińska i zespół w 2019 opisują różnice w rozkładzie subtypów *Blastocystis* u osób podróżujących i niepodróżujących do stref tropikalnych [69]

Kolejne doniesienia polskich autorów to rok 2020: opublikowano wyniki badań dotyczących blastocystozy świń, prowadzone przez M. Rudzińską i zespół [70] oraz wyniki naszych badań nad blastocystozą u psów i ich właścicieli [71].

W roku 2021 pojawiają się 3 prace również wcześniej wspomnianych autorów:

(1) nasza praca, opisująca nową metodę pobierania i przechowywania próbek kału w celu dalszego badania w laboratorium z wykorzystaniem wymazówek bakteriologicznych [72];

(2) również nasza praca dotycząca blastocystozy dziko żyjących zwierząt na terenie Białowieskiego Parku Narodowego [73]

oraz

(3) praca zawierająca wyniki badań nad różnorodnością genetyczną zwierząt w Gdańskim ogrodzie zoologicznym [74].

## I.2. BIOLOGIA

*Blastocystis* jest wykrywany w przewodach pokarmowych płazów, gadów, ptaków i ssaków oraz niektórych bezkręgowców [75]. Ten bezwzględnie beztlenowy jednokomórkowy organizm posiada wewnątrzkomórkowe organella przypominające mitochondria, jednak pozbawione całkowicie enzymów cytochromu. Organella biorą udział w wielu szlakach metabolicznych, takich jak: tworzenie kwasów nukleinowych, dystrybucja żelaza lub siarki czy cykl kwasów trójkarboksylowych [76]. *Blastocystis* jest zdolny do syntezy niezbędnych fosfolipidów, które magazynuje w wakuolach [77].

Czas pomiędzy podziałami komórki obserwowany w warunkach *in vitro* w kulturach ksenicznych wynosi 9–22 h [78]. W hodowlach aksenicznych czas między podziałami komórki skraca się do 7–12 h [79]. Stwierdzono także, że czas generacji dla różnych subtypów może być różny [78]. W przypadku zaistnienia niekorzystnych dla rozwoju warunków *Blastocystis* może przejść w stan anabiozy. W hodowlach zjawisko to zaobserwowano w sytuacjach pojawienia się w środowisku warunków tlenowych lub obecności substancji o działaniu przeciwpierwotniakowym, takich jak na przykład metronidazol [80].

Dotychczas opisano 32 wariantów molekularnych, czyli subtypów (STs) *Blastocystis* spp. z grupy *Blastocystis hominis*, oznaczanych kolejnymi numerami (tj. od ST1 do ST32) [81,82]<sup>4</sup>. Niektóre subtypy są wykrywane u różnych żywicieli, natomiast inne są specyficzne dla konkretnego żywiciela.

Człowiek może być żywicielem dla co najmniej dziesięciu subtypów: ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6, ST7, ST8, ST9 oraz ST12.

Subtypy ST1, ST2, ST5 i ST8 wykrywano także u innych ssaków – naczelnych, świń, bydła. Subtyp ST4 wykrywano również u gryzoni, natomiast subtypy ST6, ST7 i ST8 wykrywano również u ptaków.

Subtypy ST10, ST11, oraz ST13–ST32 prawdopodobnie nie występują u człowieka, dotychczas wykrywano je tylko u innych zwierząt, w tym: u naczelnych – ST10, ST13 i ST15, parzystokopytnych – ST10 i ST14, trąbowców - ST11, torbaczy – ST13 i ST16, gryzoni – ST17 [56,81–86].

---

<sup>4</sup> Odrębność niektórych subtypów jest podważana (*vide*: [212]).

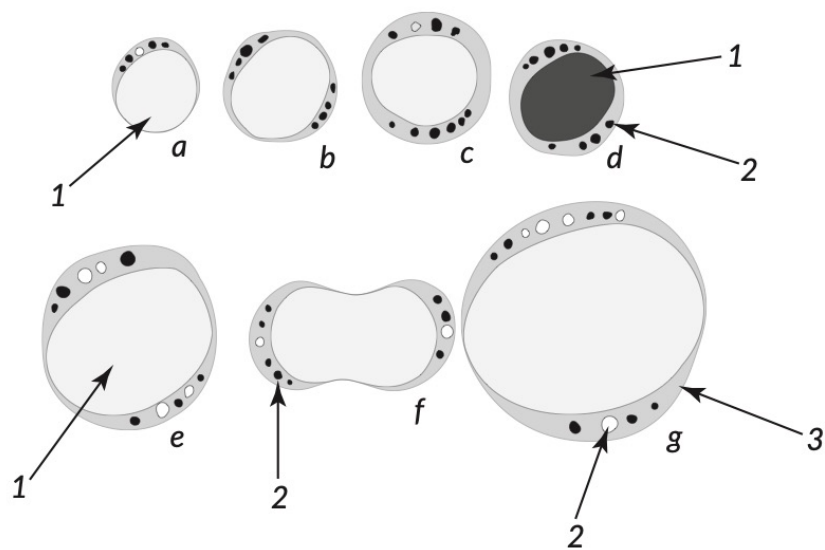


### 1.2.1. MORFOLOGIA

*Blastocystis* jest organizmem polimorficznym. Dotychczas na podstawie badań koprologicznych oraz prób z hodowli opisano cztery formy, w tym inwazyjną cystę oraz trzy formy wegetatywne: wodniczkową (inaczej wakuolarną), ziarnistą (inaczej granularną), pełzakową (inaczej ameboidalną) [87]. Przy użyciu mikroskopii elektronowej opisano także inne formy (bezwakuolarne, wielowakuolarne, mikroformy) które są jednak rzadko spotykane [76].

#### 1.2.1.1. FORMA WAKUOLARNA

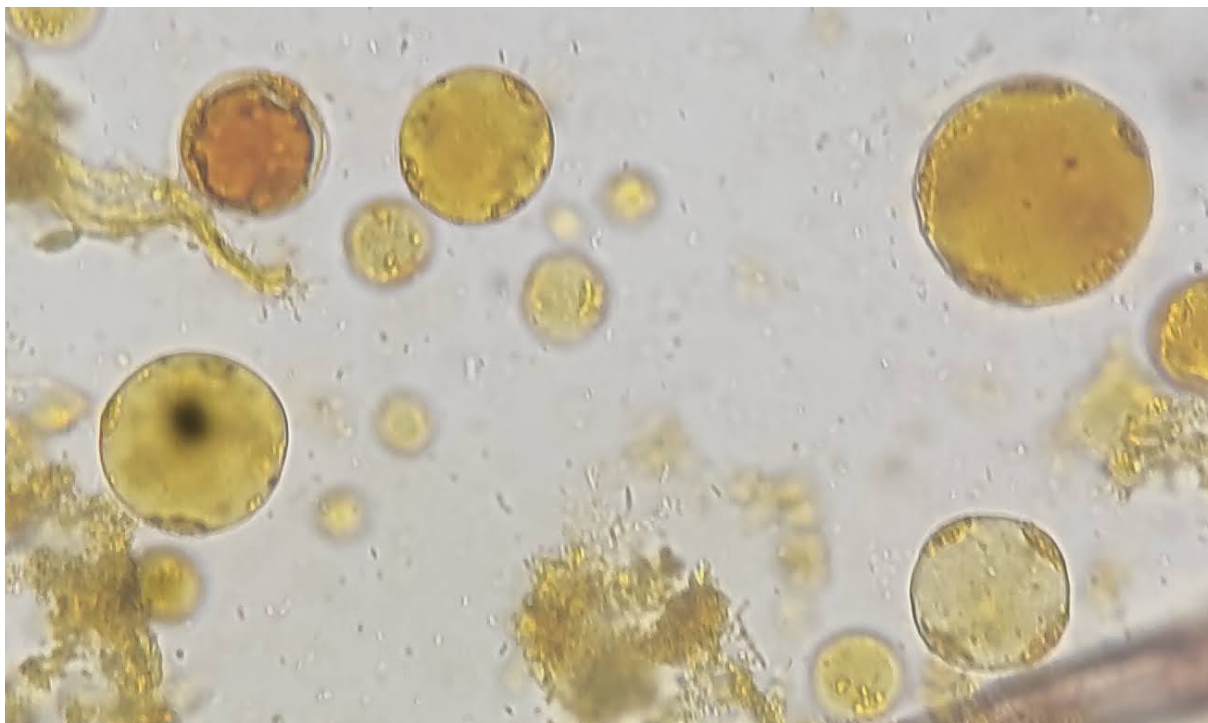
Jest to sferyczna forma *Blastocystis* zawierająca ciało centralne (central body) w postaci dużej wakuoli, zajmującej nawet 90% objętości komórki. Wakuola otoczona jest cienką warstwą cytoplazmy, znajdującej się bezpośrednio pod błoną komórkową. Jądra komórkowe najczęściej występują peryferyjnie w cytoplazmie. Maksymalnie występuje do 7 jąder, jednak z reguły są to dwa jądra, rozmieszczone na przeciwległych biegunach komórki [88]. Organelle podobne do mitochondriów (mitochondria-like organelle, MLO) oraz aparat Golgiego również umieszczone peryferyjnie w cytoplazmie. MLO tworzą układy rozetowe wokół jąder, mogą też wystawać do wewnątrz ciała centralnego [89]. Ciało centralne jest wakuolą zawierającą węglowodany, tłuszcze i białka. Substancje te są magazynowane wewnątrz wakuoli dzięki działalności aparatu Golgiego oraz endocytozy klatrynozależnej [87]. Formy wakuolarne osiągają rozmiary w granicach od 3  $\mu\text{m}$  do 200  $\mu\text{m}$ , ale najczęściej spotykane są komórki o średnicy 5–15  $\mu\text{m}$ . Powszechnie przyjmuje się, że forma wakuolarna występuje u bezobjawowych nosicieli *B. hominis* [76,87].



**Rysunek 5. Formy wakuolarne *Blastocystis* wykrywane w rutynowym badaniu kału (barwienie płynem Lugola)**

*a-c, e-g* – ciało centralne niezabarwione; *d* – zabarwione ciało centralne; *f* – komórka w stadium podziału.  
 1 – ciało centralne, 2 – jądra, 3 – cytoplazma.

Źródło: opracowanie własne na podstawie [90].

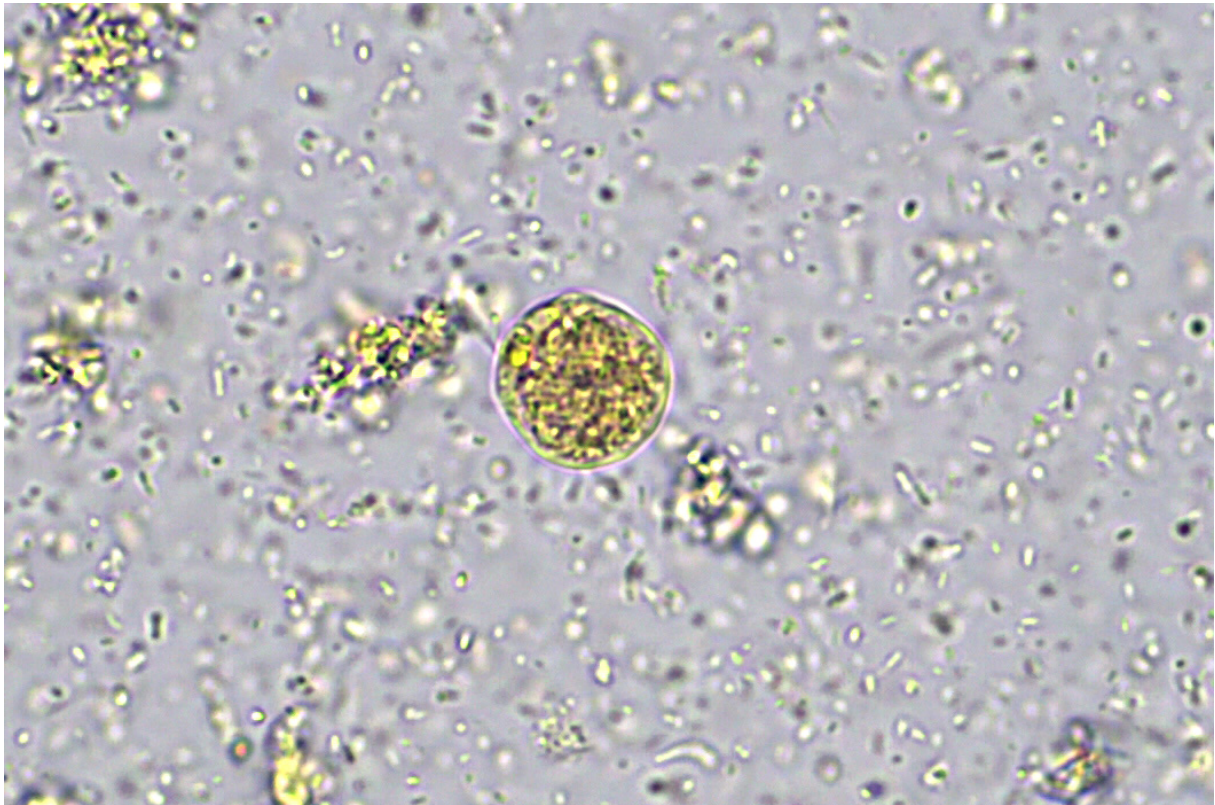


**Zdjęcie 1. Forma wakuolarna w hodowli ksenicznej**

Źródło: opracowanie własne.

### 1.2.1.2. FORMA GRANULARNA

Forma ta jest bardzo podobna do formy wakuolarnej, ale zawiera ziarnistości w cytoplazmie usytuowanej centralnie. Ziarnistości mogą pełnić funkcje metaboliczne, reprodukcyjne albo pełnić funkcję magazynującą, na przykład zawierać materiał zapasowy w postaci kropli tłuszczu [89]. W cytoplazmie komórki występują najczęściej dwa jądra, rzadko 3–4. Formy granularne są mniejsze niż formy wakuolarne: ich średnica mieści się w przedziale 9–28  $\mu\text{m}$  [88]. Formy granularne spotykane są częściej w starszych hodowlach, oraz w hodowlach z dodatkiem antybiotyków. Istnieje hipoteza, że ich pojawianie się ma związek ze śmiercią komórek [76].



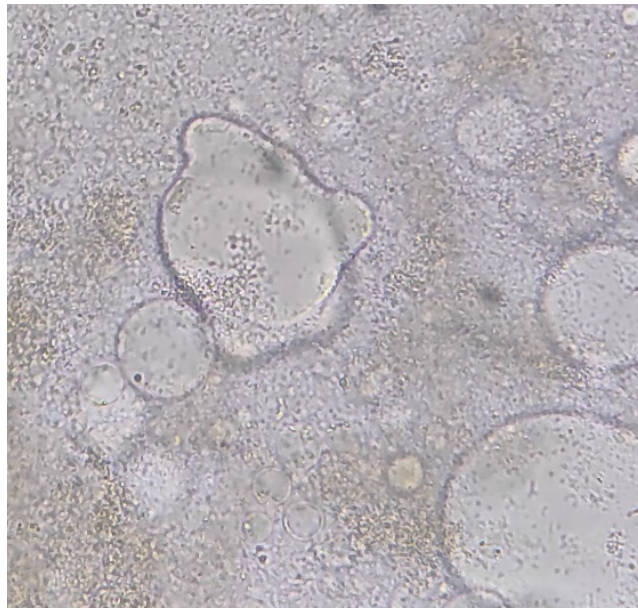
Zdjęcie 2. Forma granularna w hodowli ksenicznej

Źródło: opracowanie własne.

### 1.2.1.3. FORMA AMEBOIDALNA

Forma ameboidalna jest najrzadszą ze spotykanych postaci *Blastocystis*. Jest ona nieregularnego kształtu, z jednym lub dwoma pseudopodiami, z dużymi zdolnościami adhezyjnymi, umożliwiającymi sprawne przywieranie do błony śluzowej jelita [76]. W centrum cytoplazmy komórki znajduje się duża wakuola. Forma

ameboidalna stanowi formę przejściową przed przekształceniem się komórki w cystę. Z powodu dużego podobieństwa do makrofagów i neutrofilii postać ameboidalna łatwo może zostać przeoczona w rutynowym badaniu kału.

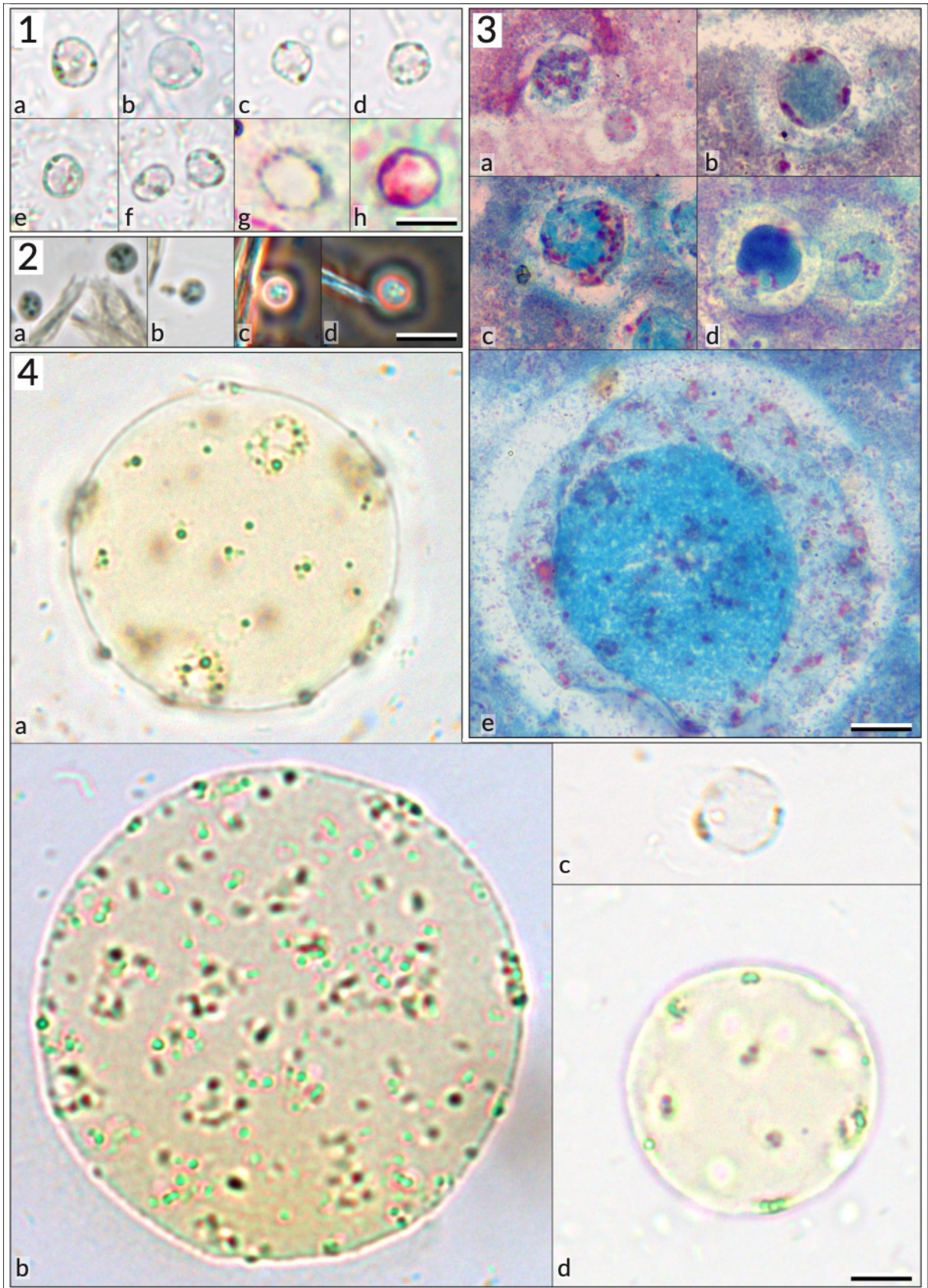


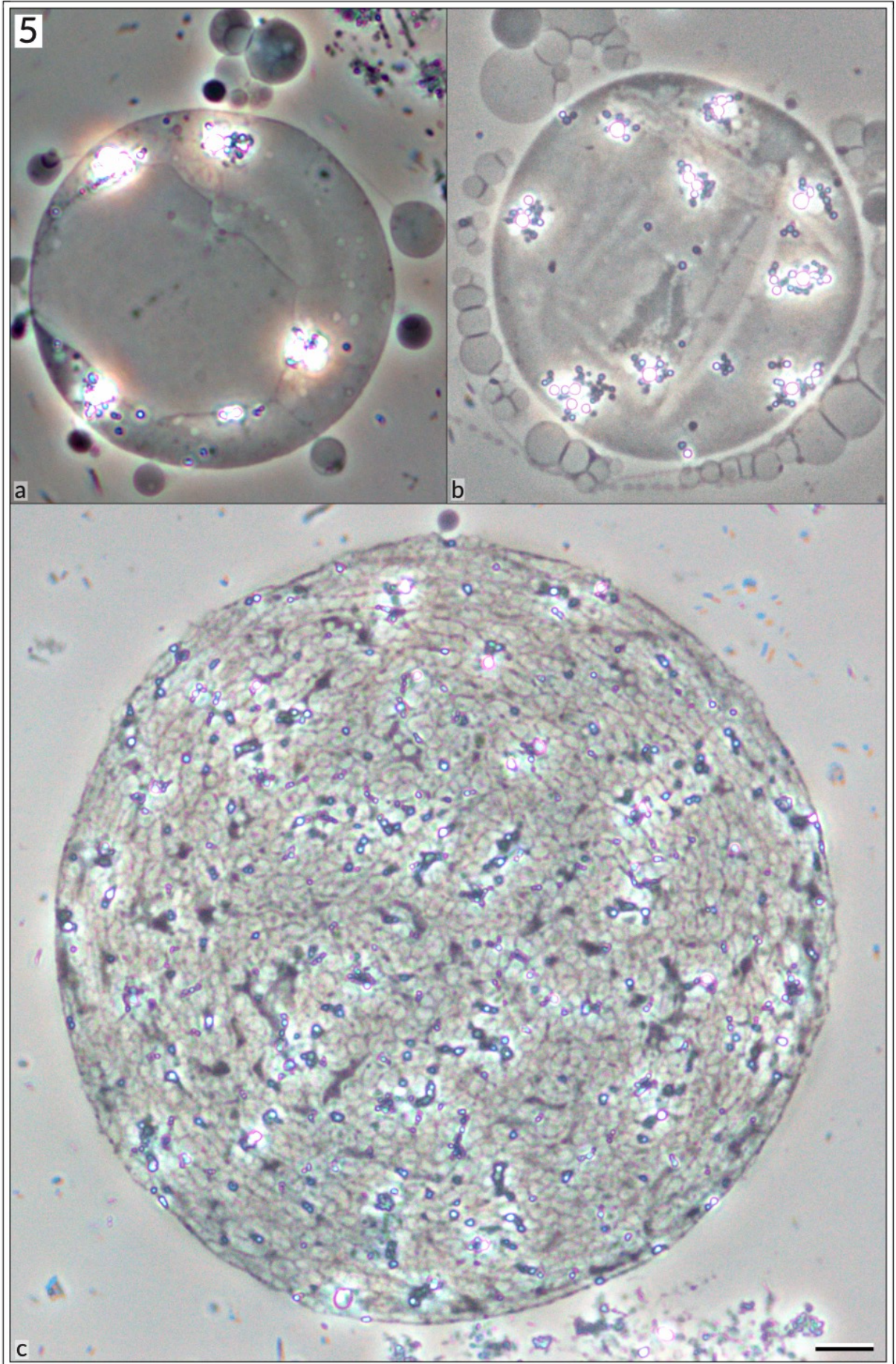
**Zdjęcie 3. Forma ameboidalna w hodowli ksenicznej**

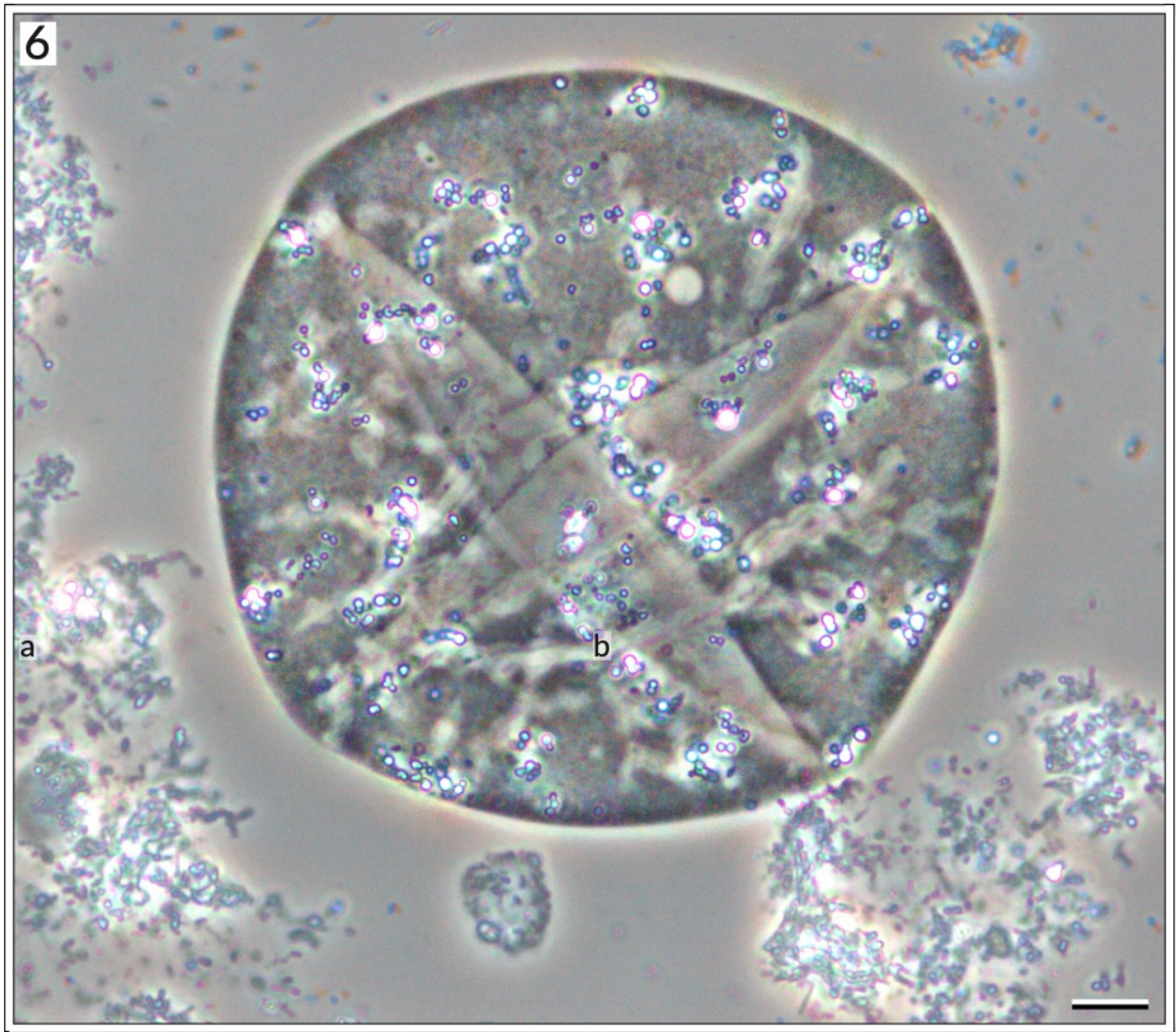
Źródło: opracowanie własne.

#### 1.2.1.4. CYSTY

Forma cysty *Blastocystis* została opisana dopiero pod koniec XX wieku [91]. Cysty o kształcie owalnym bądź okrągłym są najmniejsze ze wszystkich postaci pierwotniaka, ich średnica mieści się w przedziale 3–6  $\mu\text{m}$  [89]. Wykazano, że u zwierząt cysty mają nieco większe rozmiary [92]. Cysty posiadają cienką, wielowarstwową ścianę pokrytą wyraźną błoną lub pozostałościami błony (membrane trace) [88]. Wnętrze zawiera skondensowaną cytoplazmę, kilka wakuoli oraz od jednego do czterech jąder. Cysty są odporne na niekorzystne warunki – w temperaturze 25°C mogą zachować żywotność i inwazyjność do jednego miesiąca [93].









**Zdjęcie 4. Komórki *Blastocystis* obrazowane różnymi metodami**

1 – formy wakuolarne w rozmazie kału (a-f – płyn Lugola, g-h – barwnik trichromowy wg Massona);  
2 – cysty *Blastocystis* (a-b – płyn Lugola, c-d – kontrast fazowy); 3 – formy wakuolarne z hodowli (a-e –  
barwnik trichromowy wg Massona); 4 – różnorodność form wakuolarne z hodowli (a-d – płyn Lugola);  
5 – formy wakuolarne z hodowli (a-d – kontrast fazowy); 6 – komórka *Blastocystis* w stanie degeneracji  
(?) (kontrast fazowy); 7 – olbrzymia komórka *Blastocystis* z hodowli (płyn Lugola).

Wszystkie zdjęcia są w tej samej skali. Skala na zdjęciach – 10  $\mu\text{m}$ .

Źródło: opracowanie własne.



### 1.2.2. CYKL ŻYCIOWY

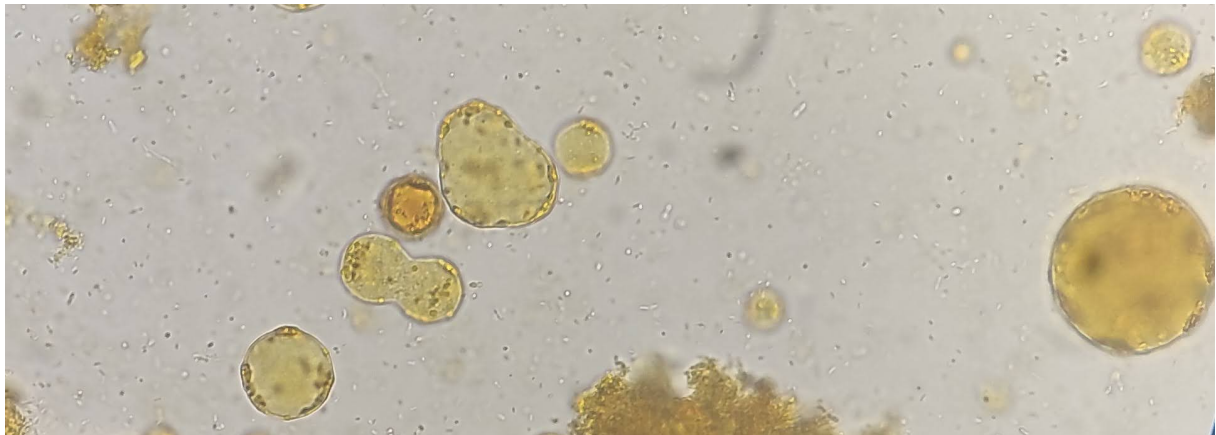
Ze względu na brak odpowiedniego modelu zwierzęcego cykl życiowy *Blastocystis* nie został do tej pory jednoznacznie wyjaśniony, a dotychczasowe założenia poczynione na obserwacjach nie zostały właściwie udokumentowane.

Badania nad zakaźnością przeprowadzone na myszach BALB/c oraz szczurach Wistar wykazały, że jedyną formą morfologiczną zdolną do zarażenia są cysty przenoszone drogą fekalno-oralną [94,95]. Badania wykazały, że odpowiedni żywicieli mogą zarazić się *Blastocystis* pijąc nieoczyszczoną wodę, bądź spożywając rośliny wodne z cystami [96,97].

Badania pokazują również występowanie drogi zarażenia człowieka *Blastocystis* poprzez „brudne ręce” – bezpośrednio od osobnika zarażonego (zwierzę, bądź człowiek) lub z gleby zanieczyszczonej fekaliami [98]. Po spożyciu cysty mogą rozwinąć się do form wegetatywnych tylko w przewodzie pokarmowym właściwego żywiciela. Cysta ulega ekcystacji w jelicie grubym, uwalniając formy wakuolarne, które mogą się przekształcić w każdą inną formę morfologiczną [95]. Formy ameboidalne, bezwakuolarne i wielowakuolarne są często obserwowane w biegunkach, co może sugerować ich rolę w patogenezie [99]. Formy wakuolarne w świetle jelita otaczają się ścianą tworząc cysty, które tuż po wydaleniu z kałem są zdolne do zarażenia kolejnych żywicieli [77].

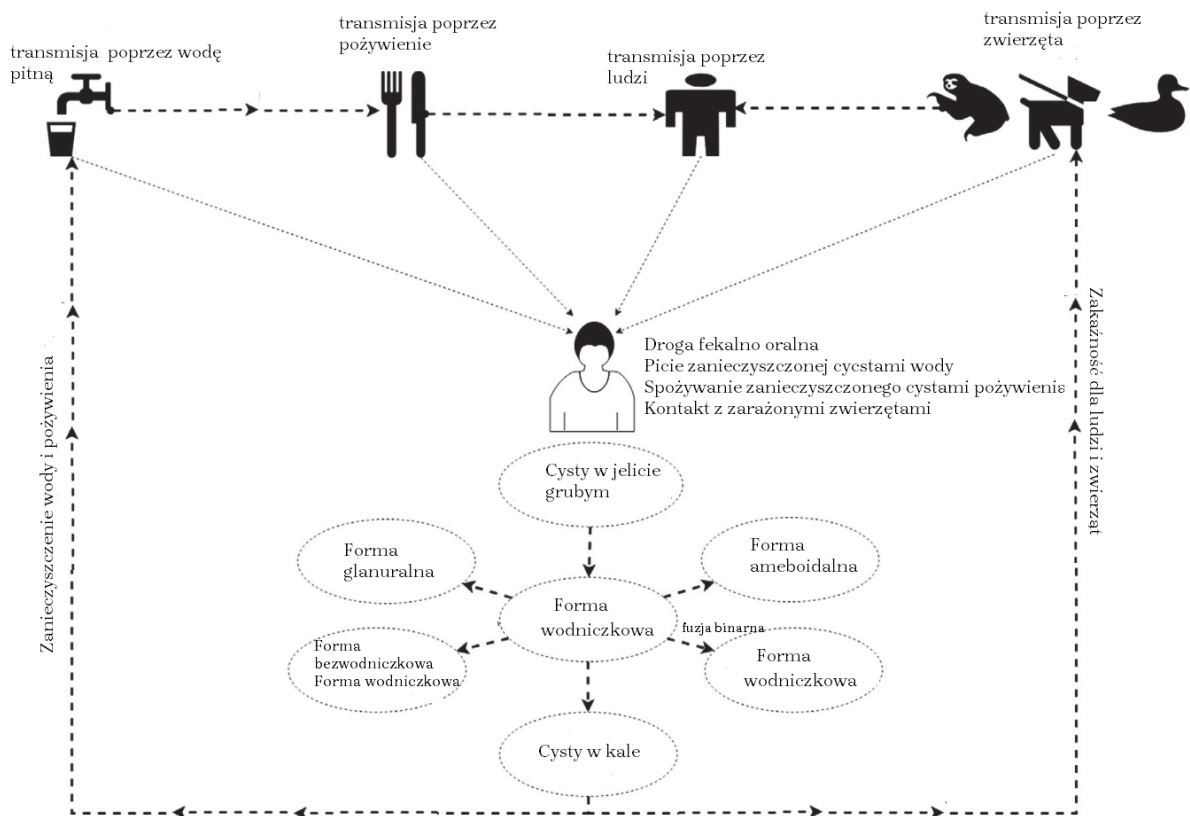
Autorzy opisują obserwacje różnych typów rozmnażania *Blastocystis*, takich jak: podział binarny, podział wielokrotny, endodiogenia, plazmotomia, pączkowanie czy schizogonia [100][101].

Podział binarny jest często obserwowanym i dobrze opisanym mechanizmem rozmnażania u *Blastocystis* [102]. Liczne badania potwierdziły, że pączkowanie i plazmotomia są jeszcze innymi mechanizmami reprodukcji tego organizmu [99]. Nie potwierdzono natomiast występowania wcześniej opisywanych wielokrotnych podziałów cysty z powstawaniem wielu cyst potomnych [93].



Zdjęcie 5. Podział binarny formy wakuolaryjnej, hodowla kseniczna

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 6. Cykl rozwojowy oraz drogi transmisji *Blastocystis* spp.

Człowiek zarażony *Blastocystis* wydala wraz z kałem cysty (1), które trafiają do środowiska zewnętrznego (2). Cysty w środowisku zanieczyszczają wodę pitną (3) lub mogą zanieczyścić produkty spożywane przez ludzi i zwierzęta. Po przedostaniu się do jelita grubego z cysty uwalnia się trofozoit występujący w różnych formach morfologicznych (forma wodniczkowa może przekształcić się w formę granularną, bezwodniczkową, ameboidalną bądź cystę) [77].

Źródło: opracowanie własne na podstawie: [103]

### I.2.3. WODA JAKO NOŚNIK ORAZ REKOMENDACJE WHO

W 2010 roku na Zgromadzeniu Ogólnym Organizacji Narodów Zjednoczonych przyjęto rezolucję A/RES/64/292 w której uznano prawo do bezpiecznej i czystej wody pitnej, oraz dostęp do urządzeń sanitarnych za prawo człowieka niezbędne do pełnego korzystania z życia i wszystkich praw człowieka [104]. Międzynarodowy Program Hydrologiczny (Intergovernmental Hydrological Programme) powołał projekt zajmujący się stanem sanitarnym wody pitnej The Global Water Pathogen Project. W ramach tego projektu opublikowano *Sanitation and Disease in the 21<sup>st</sup> Century* – kluczową rekomendację, na podstawie której opracowywane są wytyczne dotyczące właściwych praktyk sanitarnych. Zaktualizowana wersja tych rekomendacji zawiera również informacje na temat *Blastocystis* jako wskaźnika zanieczyszczenia wody pitnej fekaliami [105]. Opisano badania wód powierzchniowych Nepalu oraz Malezji, w wodach tych wykazano obecność *Blastocystis* i, co ciekawe, są to te same subtypy, które wykrywano u okolicznych mieszkańców oraz ich zwierząt. Mogłoby to wskazywać na istotny wpływ wody w cyrkulacji *Blastocystis* w środowisku.

W innych badaniach też wykazano pozytywną korelacją pomiędzy obecnością bakterii *E. coli* oraz występowania w wodach *Blastocystis spp.* [106]. Powadzono również badania wód gruntowych oraz wód pitnych i również tu wykazano obecność form dyspersyjnych *Blastocystis*. Cysty *Blastocystis* wykrywane w 1% prób wody pobranych w Egipcie i aż w 10% prób wody pobranej na terenach wiejskich Argentyny. Cysty były również wykrywane w wodach morskich oraz ciałach skorupiaków w Polsce [107].

Opisywano również metody redukcji pasożytów poprzez różnego rodzaju postępowania sanitacyjne. Zwrócono uwagę, że oczyszczanie wody ma znaczący wpływ na ograniczenie szerzenia się chorób pasożytniczych, również blastocystozy. Badano wpływ na cysty poprzez chlorowania i ozonowania wody. Wykazano, że ozonowanie inaktywuje cysty *Giardia* oraz oocysty *Cryptosporidium* i mikrosporidia, natomiast część cyst *Blastocystis* przetrwało proces ozonowania.

Stosowanie standardowych stężeń chloru, używanych do dezynfekcji wody, tj. 0,5–1 ppm nie wpłynęło negatywnie na żywotność form *Blastocystis*. Zwiększenie stężenia chloru do 2.2 ppm w dalszym ciągu nie zabijało cyst, co wskazuje na ich wysoką odporność na ten czynnik chemiczny [108].

Również Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) w publikacji *Guidelines for drinking-water quality* opublikowała podobne wnioski na temat wody jako czynnika w szerzeniu się infekcji *Blastocystis* oraz braku skuteczności w stosunku do cyst *Blastocystis* stosowanych aktualnie metod oczyszczania wody [109].

#### 1.2.4. GENOM

Dotychczas poznano sekwencje całego genomu trzech subtypów *Blastocystis* (ST1, ST4 i ST7) [110–112]. Stwierdzono, że pomimo braku różnic morfologicznych, genomy poszczególnych subtypów wykazują znaczną różnorodność [112]. Stwierdzono, że liczba genów kodujących białka *Blastocystis* wynosi 6544, 6020 i 5713 odpowiednio w ST1, ST7 i ST4. Średnie podobieństwo pomiędzy dopasowanymi homologicznymi genami pomiędzy trzema zbadanymi subtypami waha się w granicach 59–61%. Taka odmienność genotypowa potwierdza tezę, iż subtypy te de facto są odrębnymi gatunkami [113–115].

#### 1.2.5. MIKROBIOM JELITA

Mikrobiom jelita składa się z bakterii, wirusów, archeonów i eukariontów. Oszacowano, że łączna liczba komórek wchodzących w skład mikrobiomu człowieka może być dziesięciokrotnie większa niż liczba komórek tworzących ciało człowieka. Ogromna ilość różnych gatunków mikroorganizmów zasiedlających jelito człowieka i zwierząt bierze udział w produkcji składników odżywczych, witamin, neuroprzekaźników, stymuluje układ odpornościowy, oraz stanowi żywą barierę przed patogenami z zewnątrz [116].

Od dawna wiadomo, że dobrze działający mikrobiom to ten, w którym zachowane są odpowiednie stosunki wzajemne składu gatunkowego. Zaburzenia ilościowe, lub brak jednego z gatunków może powodować nadmierne namnażanie się innego gatunku, a to w konsekwencji prowadzi do utraty zdolności mikrobiomu do wspierania organizmu oraz powoduje zaburzenia w jego funkcjonowaniu [117].

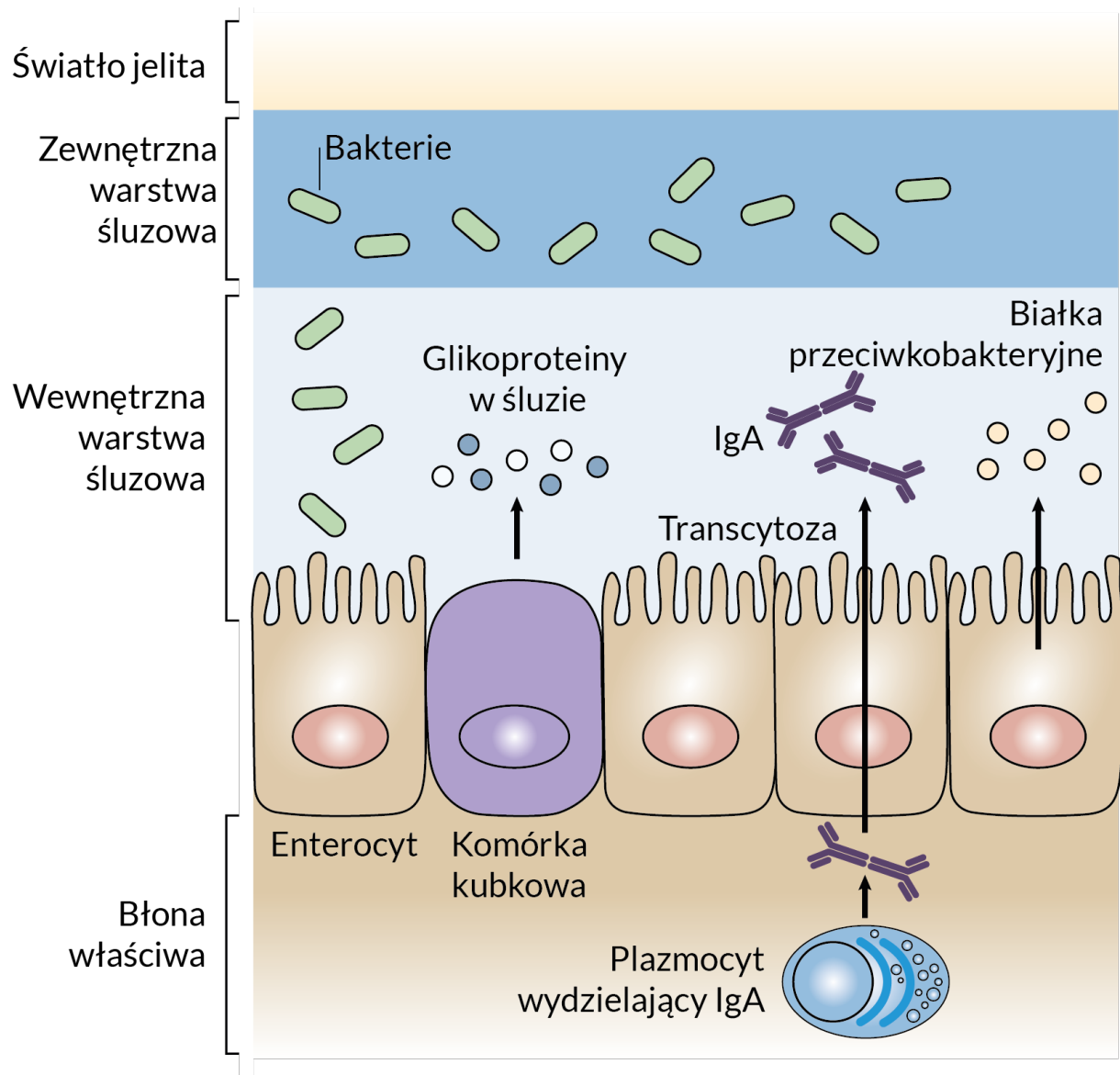
Komórki nabłonkowe jelita są w stałym kontakcie z ksenobiotykami mogącymi aktywować i wyzwać odpowiedź układu odpornościowego gospodarza [118,119]. W trakcie ewolucji wykształciły się różne mechanizmy zapewniające homeostazę jelita, takie jak bariera śluzowa, bariera nabłonkowa oraz prozapalne

szlaki sygnalizacyjne [120]. Wykształcenie takich mechanizmów pozwala na utrzymanie stabilnej populacji gatunków mikroorganizmów korzystnych dla właściwego funkcjonowania jelita i jednocześnie zapobiega nadmiernemu namnażaniu się gatunków patogenicznych [121].

Kolejnym mechanizmem strzegącym homeostazy jelita są wyspecjalizowane komórki wydzielnicze, takie jak komórki plazmatyczne, kubkowe i komórki Panetha. Ich zadaniem jest wydzielanie przeciwciał klasy IgA, śluzu oraz białek przeciwbakteryjnych. Śluz, powlekający nabłonek, zawierający taki arsenał, stanowi doskonałą linię obrony przed niepożądanym przedostawaniem się mikroorganizmów poza światło jelita (Ryc. 7) [122].

Za trzeci mechanizm wpływający na stałość składu gatunkowego mikrobiomu uznawane są szlaki biotyczne pomiędzy gatunkami drobnoustrojów, w których wykorzystywane są własne metabolity i produkowane przez organizm substancje w celu ograniczenia rozwoju innego gatunku. W ten sposób mikroorganizmy wytwarzają substancje bakteriobójcze lub bakteriostatyczne, ograniczające rozwój populacji innych gatunków [123].

Czwartym poznany zjawiskiem jest stan, w którym bakterie komensalne przenikając przez barierę nabłonkową aktywują układ odpornościowy, mogący wyeliminować mikroflorę. Indukowany przez mikroflorę komensalną układ immunologiczny może redukować mikroflorę, utrzymując dynamiczną równowagę pomiędzy mikrobiomem a układem odpornościowym [124].



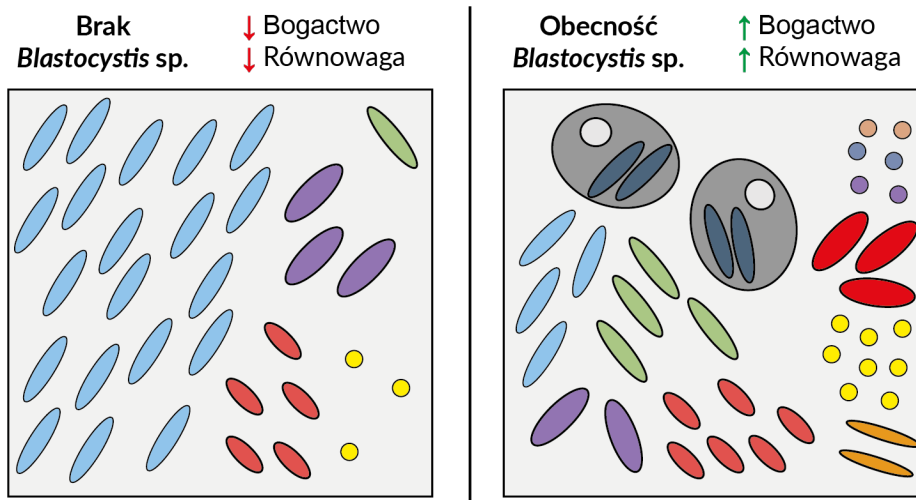
Rysunek 7. Immunomechanizm bariery jelitowej

Źródło: opracowanie własne na podstawie [125]

#### 1.2.5.1. BLASTOCYSTIS A MIKROBIOM

Protista są naturalnym składnikiem ekosystemu jelit ssaków, żyjąc obok mikroflory bakteryjnej i wchodząc z nią w interakcje [126]. Rola *Blastocystis* w mikrobiomie człowieka i zwierząt nie jest wyjaśniona, jak również nie jest wyjaśniony jego potencjał chorobotwórczy. Pierwotniak ten występuje zarówno u osób z dolegliwościami jelitowymi, jak i u osób nie wykazujących zaburzeń ze strony układu pokarmowego [127].

Pojawiły się doniesienia, mówiące o tym, że u osób będących żywicielami dla *Blastocystis* występuje wyższa różnorodność gatunkowa bakterii występujących w jelitach [128] (Ryc. 8).



**Rysunek 8. Proponowany model ekologiczny mikrobiomu u osób niebędących i będących nosicielami *Blastocystis* spp.**

Źródło: opracowanie własne na podstawie [127].

W jelicie, jak i w każdym innym ekosystemie, zależności międzygatunkowe mają istotne znaczenie i są kontrolowane poprzez liczebność mikroorganizmów, oraz dostępność pożywienia i pojemność środowiska. Komórki *Blastocystis* pobierają na drodze endocytozy komórki bakterii, znajdują się one w wakuolach i służą jako materiał odżywczy pierwotniaka [77]. Na tej podstawie można wnioskować, że *Blastocystis* bierze udział w kontrolowaniu liczebności poszczególnych gatunków bakterii. Aktualne dane wskazują na to, że *Blastocystis* może pełnić zarówno rolę inżyniera modulującego skład mikrobiomu, jak również brać udział w stymulacji układu odpornościowego gospodarza [127].

W ostatnich latach zaczęto przyglądać się związkowi pomiędzy obecnością *Blastocystis* a zmianami metabolicznymi w jelicie u osób zakażonych i niezakażonych. Wykorzystując spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) w widmie  $^1\text{H}$  wykazano znaczne różnice w metabolizmie mikroorganizmów stolca u osób będących i niebędących nosicielami *Blastocystis*.

Ciekawy jest fakt, iż u osób będących nosicielami wykazano znaczący spadek ilości metabolitów, wskazujących na niewłaściwe wchłanianie (m. in., kwasów żółciowych, aminokwasów i sfingolipidów oraz krótkołańcuchowych kwasów

tłuszczowych). We wszystkich badanych grupach, niezależnie od kraju i stosowanej diety, u osób zarażonych *Blastocystis* stwierdzono stały spadek stężenia aminokwasów (alanina, glicyna, histydyna, izoleucyna, metionina, treonina, tryptofan i walina) w odniesieniu do osób niezarażonych *Blastocystis*.

Te wyniki porównano z wynikami osób zarażonych *Cryptosporidium sp.*, gdzie te same aminokwasy miały wyższe stężenia, co wskazuje na niewłaściwe ich wchłanianie. Spadek stężenia aminokwasów u osób zarażonych *Blastocystis* może wskazywać na ochronną/przeciwzapalną rolę *Blastocystis* w jelitach, ponieważ wzrost tych metabolitów jest uważany za biomarker zapalenia [129].

Badania metagenomiczne po raz pierwszy wykazały, że obecność *Blastocystis* była pozytywnie skorelowana z enerotypami typu *Prevotella* oraz *Ruminococcus*, jak również z większą bioróżnorodnością bakterii. Jednocześnie wykazano, że u osób, u których flora zdominowana jest przez *Bacteroides* podatność na zarażenie się *Blastocystis* była znacznie niższa [130].

Ta sama grupa badaczy zweryfikowała otrzymane wyniki na innych próbach kału, i okazało się, że osoby skolonizowane przez *Blastocystis* i *Dientamoeba fragilis* wykazywały stosunkowo niską liczebność *Bacteroides* i *Clostridium* (klaster XIVa), oraz wysoki poziom *Prevotella* [130].

W badaniach, przeprowadzanych, głównie, *in vitro*, udało się ustalić też ograniczony negatywny wpływ *Blastocystis* na organizm żywiciela. Patogeniczność niektórych subtypów *Blastocystis* w stosunku do żywiciela wykazano również w modelach zwierzęcych [131].

Na podstawie dotychczasowych danych nie jest możliwe jednoznaczne ustalenie czy *Blastocystis* jest komensalem czy patogenem i jaki jest jego faktyczny wpływ na mikrobiom i metabolizm stolca.

#### 1.2.5.2. BLASTOCYSTIS A WPLYW NA BEHAVIOR

W badaniach na szczurach zarażonych *Blastocystis* francuski badacz M. Defaye z zespołem opisali zmianę behawioru zwierząt. Na podstawie wykonanych testów behawioralnych (Behavior recognition system PhenoTyper, Elevated-Plus-Maze (EPM) test, Forced Swimming Test (FST)) wykazało, że szczury zarażone *Blastocystis* reagowały lękiem przed otwartą przestrzenią i wykazywały zachowania depresyjne [132].



### I.3. CHOROBOTWÓRCZOŚĆ *BLASTOCYSTITIS*, LECZENIE BLASTOCYSTOZY

Kwestia patogeniczności *Blastocystis* stanowi kontrowersyjny problem i do tej pory nie została jednoznacznie udowodniona. Już w roku 1916 blastocystoza została opisana jako „infekcja, której ciężko się pozbyć”, chociaż wtedy istniały dostępne terapie [133]. Wielu autorów opisuje pierwotniaka jako chorobotwórczego lub potencjalnie chorobotwórczego [134], podczas gdy w wielu innych badaniach nie znaleziono korelacji między występowaniem *Blastocystis* a objawami chorobowymi [135].

Badanie kliniczno-kontrolne przeprowadzone w Holandii wśród 1374 osób z objawami żołądkowo-jelitowymi i 1026 osób z grupy kontrolnej wykazało, że osoby z objawami występowały częściej wśród osób niezarażonych *Blastocystis* niż wśród osób zarażonych [136]. W badaniu obejmującym 105 zdrowych dorosłych osób, metodą PCR wykryto *Blastocystis* u 56% osób, stwierdzono też, że w niektórych przypadkach zarażenie utrzymywało się przez okres od 6 do 10 lat, co sugerowało, że *Blastocystis* być może jest komponentą normalnego zdrowego mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka [137].

Wiele danych wskazuje, że nie zawsze mamy do czynienia z bezobjawową kolonizacją ludzkiego jelita i w niektórych sytuacjach ma ona klinicznie istotne znaczenie [138]. Pomimo niewyjaśnionych mechanizmów patogenicznych, kolonizacja jelita przez *Blastocystis* spp. w niektórych przypadkach wydaje się być jedynym wyjaśnieniem dolegliwości skórnych i jelitowych pacjentów [138–140].

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że działanie patogene pojawia się podczas intensywnej inwazji. Wówczas w obrazie mikroskopowym rozmazu kału przy powiększeniu 400× obserwuje się co najmniej 5 komórek *Blastocystis* w polu widzenia [12]. El-Shazly i zespół stwierdzili, że u pacjentów zgłaszających dolegliwości liczba komórek *Blastocystis* w kale była znacząco wyższa niż u bezobjawowych nosicieli, a do najczęściej zgłaszanych dolegliwości należały: biegunka (30,4%), bóle brzucha (26,1%), wzdęcia (21,7%), wymioty (13,1%) i zmęczenie (8,7%) [141].

W wyniku innych badań zauważono, że laboratoryjnym wyznacznikiem chorobotwórczego działania *Blastocystis* jest nie tylko liczba komórek pierwotniaka, ale też liczba leukocytów w badanej próbce kału [134].

Poniższe aspekty wskazują główne powody kontrowersji dotyczącej chorobowości *Blastocystis* [135].

(1) Wiele doniesień, które sugerowały patogenną rolę *Blastocystis* spp, to są opisy przypadków oraz badania bez grupy kontrolnej lub retrospektywne. Jednocześnie brakuje prawidłowych przeprowadzonych kliniczno-kontrolny badań prospektywnych dotyczących patogeniczności *Blastocystis* lub skuteczności terapii.

(2) Brakuje kryteriów uznania badanej próbki za „pozytywną” dla *Blastocystis* spp; różnorodność metod diagnostycznych i coraz częstsze stosowanie PCR przy badaniu próbek kału przyczynia się do wzrostu ilości pozytywnych wyników również wśród osób bezobjawowych.

(3) Różnorodność subtypów *Blastocystis* spp. w połączeniu ze zróżnicowaną wirulencją mogłaby wyjaśnić różnice w patogenności. Jednak dowody na ten temat pozostają niejednoznaczne; w większości badań nie wykazano wyraźnej korelacji pomiędzy subtypem a jego patogennością [136,141–150].

(4) Może zdarzyć się nieregularne wydalanie *Blastocystis* z kałem. W jednym z badań wykazano, że ilość pierwotniaków obecnych w polu widzenia (obiektyw 40×) w poszczególnych dniach wahała się 0 do 17 [151]. Niektóre doniesień o obecności *Blastocystis* spp. w jelicie człowieka mogą w rzeczywistości odnosić się do wygasającej inwazji.

(5) Z niektórych badań wynika, że *Blastocystis* spp. jest stabilnym składnikiem mikrobioty jelitowej i może występować częściej u osób zdrowych niż u pacjentów ze stanem chorobowym [152]. Niestety nie mamy narzędzi pozwalających odróżnić bezobjawową kolonizację od zarażenia.

### I.3.1. KOPATOGENNOŚĆ

*Blastocystis* często wykrywany jest jednocześnie z innymi potencjalnymi patogenami. Z badań wynika, że u większości pacjentów u których stwierdzono obecność *Blastocystis* w stolcu w dalszych badaniach wykrywało się inne potencjalne patogeny [153].

Przypuszcza się, że wykrycie *Blastocystis* spp. w próbce kału sugeruje obecność też innego niezidentyfikowanego patogenu. Zbadano do 6 próbek kału od 32 nosicieli *Blastocystis* spp.; u 84% wykryto inny patogen [154]. Przeprowadzenie

leczenia przeciwko innym patogenom doprowadziło do ustąpienia objawów, pomimo utrzymywania się inwazji *Blastocystis*. Jednak inne badanie pacjentów z biegunką w Nepalu wykazało, że obecność *Blastocystis* nie sugeruje obecności innych patogenów jelitowych, ponieważ wykryto je u 68% pacjentów z *Blastocystis* i 71% pacjentów bez *Blastocystis* [154].

Innym wyjaśnieniem związku między *Blastocystis* a innymi patogenami jest to, że pasożyta jest łatwiej zidentyfikować w nieuformowanych, wodnistych stolcach, niż w uformowanych [153,155,156].

### I.3.2. BLASTOCYSTIS W NIEDOBORACH ODPORNOŚCI.

Wielu pacjentów z niedoborami odporności spowodowanej pierwotnymi niedoborami, leczeniem immunosupresyjnym czy będącej następstwem infekcji HIV boryka się z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego.

Zasadniczo, zarażenia *Blastocystis* u osób zakażonych HIV nie różnią się istotnie od obrazu klinicznego w populacji ogólnej, natomiast częstość występowania u pacjentów zakażonych HIV może być wyższa niż u niezakażonych [157].

Niebezpieczne dla zdrowia i zagrażające życiu osób z tej grupy są nawracające biegunki powodowane przez pierwotniaki przewodu pokarmowego. Dlatego istotnym jest aby u osób z obniżoną odpornością jak najszybciej diagnozować i eliminować patogeny mogące im zagrażać [158,159].

### I.3.3. NAJCZĘSTSZE TERAPIE FARMAKOLOGICZNE.

Obecnie, wobec braku jednoznacznie udokumentowanej chorobotwórczości *Blastocystis*, zdania dotyczące leczenia są podzielone. Sytuacja komplikuje się, ponieważ dość często odnotowuje się samoistne ustąpienie infekcji [160]. W literaturze podkreśla się brak wskazań do leczenia u pacjentów bezobjawowych [160–162]. Jednocześnie rozważana jest strategia leczenia wszystkich nosicieli, uzasadniając to głównie względami epidemiologicznymi [138].

Poniżej wytyczne opublikowane przez serwis UpToDate [135].

1. Pacjenci bez objawów nie wymagają leczenia.

2. Leczenie pacjentów objawowych powinno być rozważone dopiero po wykluczeniu możliwych innych przyczyn występowania dolegliwości.

3. Przy obserwacji odpowiedzi klinicznej należy brać pod uwagę, że odpowiedź kliniczna może być spowodowana eradykacją zarówno *Blastocystis* jak i innych niezidentyfikowanych patogenów.

Krajowe wytyczne [163] są następujące: „Zarażenie zwykle nie wymaga swobodnego leczenia. Zalec je w przypadku zarażenia u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego lub chorobę Leśniowskiego i Crohna, u chorych w stanie immunosupresji oraz w razie bardzo masywnego zarażenia”.

W przypadku podjęcia terapii za skuteczną uważa się taką, po której pacjent nie zgłasza już dolegliwości oraz nie stwierdza się obecności pierwotniaka w badaniach kału [93,164,165].

Skuteczna terapia przeciw *Blastocystis* powinna być oparta na lekach, które osiągają terapeutyczne stężenie w świetle jelita, ponieważ, do tej pory nie stwierdzono interakcji pierwotniaka z błoną śluzową jelita grubego człowieka, a jest on obecny w jego świetle. Jednocześnie lek nie powinien być dezaktywowany przez florę jelitową oraz mieć krótki czas przejścia przez jelito cienkie [166].

W leczeniu blastocystozy metronidazol jest lekiem pierwszego wyboru, podobnie jak w przypadku leczenia innych infekcji powodowanych przez pierwotniaki. Mechanizm działania metronidazolu związany jest z redukcją grup nitrowych co powoduje powstawanie wolnych rodników. Przy udziale ferodoksyny, czyli białka transportującego elektrony, występującego wyłącznie u organizmów beztlenowych, wewnątrzkomórkowo powstają formy zredukowane, powodujące rozerwanie łańcucha DNA i śmierć komórki [167]. Do tej pory nie został jednoznacznie wyjaśniony wpływ metronidazolu na *Blastocystis*, według niektórych badaczy powoduje on mechanizm apoptozy [168], według innych nie wykazuje on bezpośrednio wpływu na komórki pierwotniaka, a efekt jest pośredni poprzez wpływ na mikroorganizmy od których *Blastocystis* jest zależny [166,169].

Pomimo teoretycznej skuteczności w leczeniu blastocystozy pojawia się coraz więcej doniesień o niepowodzeniach terapii z wykorzystaniem tego leku. Nie wykazano, czy wynika to z wykształcenia mechanizmów opornościowych, czy też

z braku możliwości wytworzenia reaktywnych rodników, spowodowane brakiem odpowiednich genów, występujących między innymi u gatunków *Entamoeba* i *Giardia* [166,170]. Możliwe, że brak skuteczności wynika z nieosiągnięcia właściwego stężenia metronidazolu w świetle jelita [171].

Dostępne w terapii przeciw *Blastocystis* sp. farmaceutyki, ich dawkowanie i skutki uboczne przedstawiono w Tabeli 1 [138].

Tabela 1. Lista chemioterapeutyków stosowanych w zwalczaniu *Blastocystis* sp.<sup>5</sup>

Nazwa leku	Sugerowane dawkowanie	Skutki uboczne	Stosowane dawkowanie	Skuteczność %
Metronidazole	<i>Dorośli:</i> 500–750mg 3×/doba, 10 dni <i>Dzieci:</i> 20–30 mg/kg/doba, 10 dni	– metaliczny posmak – nudności	250–750 mg 3×/doba 500 mg 3×/doba 750 mg 3×/doba 800 mg 3×/doba 1500 mg jednorazowo 2000 mg jednorazowo 30 mg/kg/2×doba	33 100 100 0 80–100 0 67
Trimetoprim (TMP) Sulfamethoxazole (SMX)	<i>Dorośli:</i> 320mg TMP+1600mg SMX, 2×/doba, 7 dni <i>Dzieci:</i> 6mg/kg TMP+30mg/kg SMX, 2×/doba, 7 dni	– pokrzywka, – nudności – utrata apetytu – wysypka	6 mg/kg TMP+30 mg/kg SMX, 2×/doba 320 mg TMP+1600mg SMX, 2×/doba	95 93
Nitazoxanide	<i>Dorośli:</i> 500 mg/3×/doba, 3 dni <i>Dzieci:</i> 1–3 lat: 100mg 2×/doba, 3 dni 4–11 lat: 200 mg 2×/doba, 3 dni	– żółtawy mocz – bóle brzucha – bóle głowy – nudności	500 mg 3×/doba 100–200 mg 2×/doba (<12 lat) 500 mg 2×/doba (>12 lat)	100 86
Paramomycine	<i>Dorośli:</i> 500mg 3×/doba, 10 dni <i>Dzieci:</i> 25 mg/kg /3×/doba, 10 dni	– skurcze – biegunka – mdłości – ból brzucha	25 mg/kg/3×/doba 500 mg/3×/doba	100 77–100

<sup>5</sup> Na podstawie danych opublikowanych w 2016 r. w „Parasitology International” (Kurt, Doğruman Al, and Tanyüksel 2016).

**Tabela 1. (kontynuacja)**

Iodoquinol	650 mg 3×/doba, 10-20 dni		650 mg 3×/doba	0
Ketoconazole	200 mg/doba, 14 dni		200 mg/doba	100
Emetine	–	– nudności	100 µg/ml	50
Ornidazole		– nudności	500 mg 3×/doba, 7 days	50
TERAPIE ŁĄCZONE				
Paromomycine (PAR) +metronidazole (MTZ)	500 mg PAR 2×/doba +750 mg MTZ 3×/doba, 10 dni			100
Nitazoxanide +furazolidone +secnidazole)	–			0
Diloxanide furoate +secnidazole + TMP-SMX	500 mg 3×/doba+400 mg 3×/doba+160–800 mg 2×/doba			60

#### I.4. LABORATORYJNE METODY WYKRYWANIA INWAZJI *BLASTOCYSTIS*

Do najczęściej stosowanych metod w diagnostyce laboratoryjnej blastocystozy należą klasyczne techniki parazytologiczne, a wśród nich badania mikroskopowe rozmazów świeżych próbek kału podbarwionych płynem Lugola [172][58], rozmazów kału barwionych trichromem [173], hematoksyliną [12] oraz tuszem indyjskim [174]. Nie zaleca się wykorzystywania technik zagęszczających z uwagi na możliwość zniszczenia delikatnych trofozoitów, co znacząco obniża czułość badania [175,176].

Wysoką czułością cechują się natomiast metody hodowli *in vitro* [177].

W dobie dostępnej i stosunkowo prostej diagnostyki molekularnej w identyfikacji *Blastocystis* wykorzystuje się metody oparte o reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) [178]. Metody biologii molekularnej są godne uwagi ze względu na bardzo wysoką czułość detekcji, jak również możliwość określenia subtypu pierwotniaka.

Badania serologiczne nie znajdują obecnie zastosowania w rozpoznawaniu blastocystozy. Duża różnorodność genetyczna przekłada się na różnorodność antygenową, co w praktyce utrudnia stworzenie odpowiednio czułego i swoistego testu immunoenzymatycznego do badań serologicznych [179].



## II. Założenia i cel pracy

Celem niniejszej pracy było zbadanie różnorodności genetycznej pierwotniaka *Blastocystis* występującego u ludzi i zwierząt stałocieplnych na terenie Polski oraz określenie subtypów *Blastocystis* występujących w Polsce.

Kolejnym celem rozprawy było zbadanie potencjału zoonotycznego *Blastocystis* na podstawie analizy wariantów genetycznych występujących w badanej populacji ludzi i zwierząt, jak również porównanie potencjału zoonotycznego różnych grup zwierząt stałocieplnych. Ponadto badania miały na celu sprawdzenie czy istnieją subtypy charakterystyczne dla pewnej grupy nosicieli.

Na moment podjęcia badań (2015 rok) wiedza na temat występowania i różnorodności *Blastocystis* w Polsce była bardzo ograniczona.

Powyższe cele były realizowane poprzez:

- (1) zebranie możliwie najbardziej różnorodnego materiału biologicznego w celu uzyskania materiału genetycznego pierwotniaka;
- (2) analizę molekularną uzyskanych materiałów;
- (3) analizę filogenetyczną i porównawczą otrzymanych wyników;
- (4) porównania fauny *Blastocystis* różnych grup żywicieli („Człowiek”, „Ssaki inne niż człowiek”, „Ptaki”).

### *III. Materiał i metody*

#### III.1. MATERIAŁ

Materiał do badań stanowiły próbki kału (n=1400) zebrane na terenie całej Polski (Mapa 1) pochodzące od ludzi (n=784) i zwierząt stałocieplnych (n=616).

##### III.1.1. MATERIAŁ POCHODZĄCY OD ZWIERZĄT

Materiał pochodzenia zwierzęcego stanowiły próbki zebrane od zwierząt dzikich, zwierząt ogrodów zoologicznych, zwierząt hodowlanych oraz zwierząt towarzyszących.

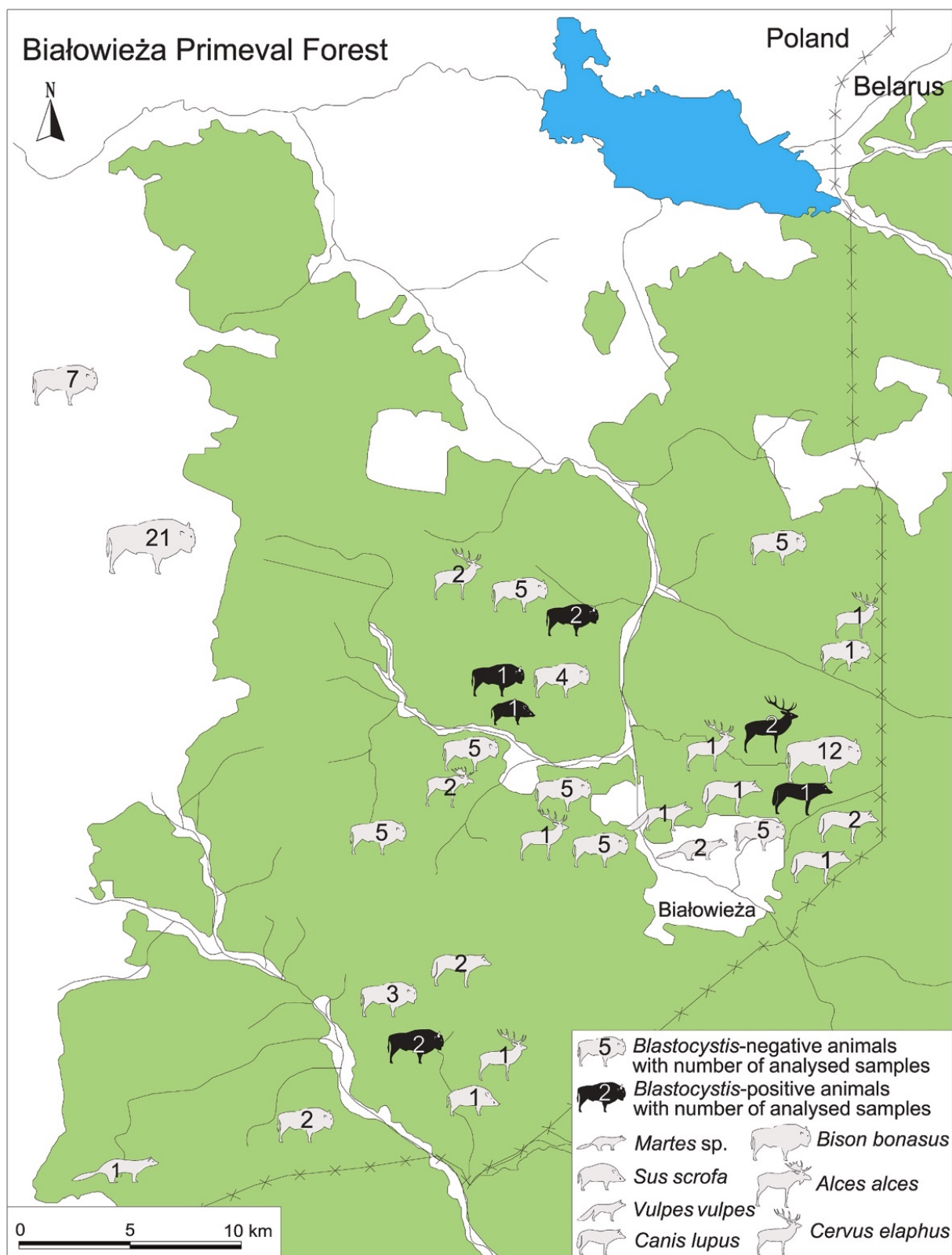
Materiał pochodzący od zwierząt dzikich był pozyskiwany w miejscach ich naturalnego występowania i w ośrodkach rehabilitacji dzikich zwierząt. W większości przypadków od jednego osobnika zwierzęcia pobierana była jedna próbka.

W przypadku zwierząt hodowlanych (kury, kaczki, indyki, gęsi, owce i krowy) oraz zwierząt pochodzących z ogrodów zoologicznych pobierano po kilka próbek z jednego miejsca (obory, klatki etc).

##### III.1.1.1. PUSZCZA BIAŁOWIESKA

W latach 2018–2020 na terenie polskiej części Puszczy Białowieskiej i w okolicy łącznie zebrano 113 próbek kału, pochodzących od 7 gatunków dzikich zwierząt (Mapa 1).

Materiał zebrany przez Wojciecha Sobocińskiego (Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku) i Martę Kołodziej-Sobocińską (Instytut Biologii Ssaków Polskiej Akademii Nauk, Białowieża).



Mapa 1. Obszar badań z zaznaczeniem lokalizacji oraz ilości zbadanych zwierząt

Źródło: [180]

### III.1.1.2. PSY

Łącznie w roku 2017 przebadano próbki kału od 31 psów (jeden pies z Gdyni oraz 30 psów z podwarszawskiego hotelu dla zwierząt).

### III.1.1.3. JEŻE

Zbadano próbki kału pochodzące od 61 jeży zachodnich pochodzących z ośrodków rehabilitacji dla jeży z terenów województw dolnośląskiego i opolskiego.

### III.1.2. MATERIAŁ POCHODZĄCY OD LUDZI

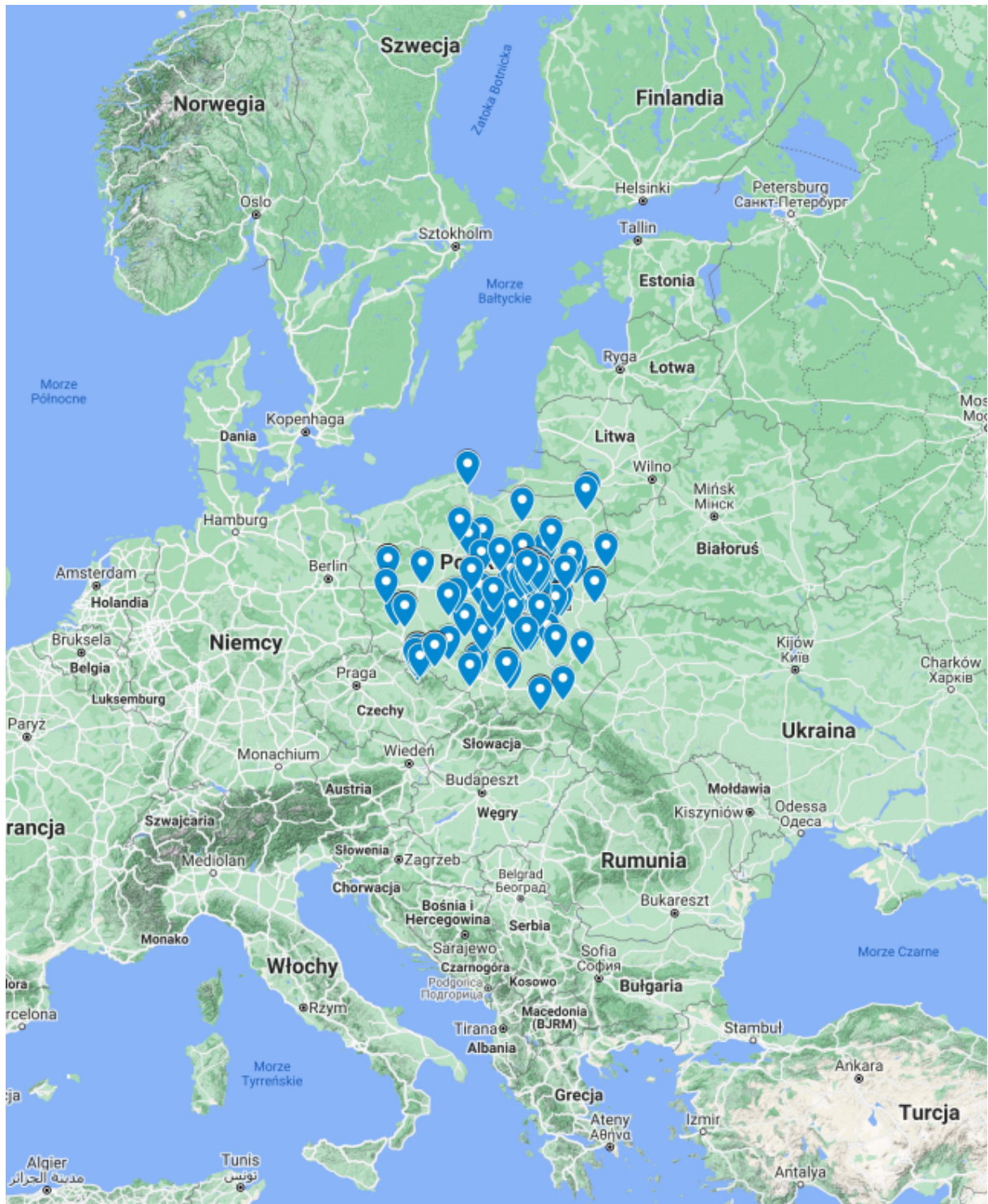
Materiał pochodzenia ludzkiego pochodził od osób zlecających badania koprologiczne w Laboratorium Zakładu Parazytologii i Chorób Przenoszonych Przez Wektory Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie. Do naszych badań włączone były wyłącznie próbki osób, które dobrowolnie wyraziły zgodę na przekazanie materiału do celów badawczych. Wyrażenie zgody odbywało się poprzez udzielenie odpowiedzi „TAK” na oba następujące pytania z formularza zlecenia badania nr PO-02/F06:

(1) „Klient wyraża zgodę na wykorzystanie wyników do celów opracowań syntetycznych”;

(2) „Próbki po badaniu do dyspozycji Laboratorium”.

Wszystkie zakwalifikowane próbki przed rozpoczęciem dalszych badań zostały poddane anonimizacji poprzez nadanie próbce unikalnego kodu.

Wyrażenie zgody było jedynym kryterium do kwalifikacji próbek kału do dalszych badań. Nie było brane pod uwagę żadne z poniższych kryteriów: wiek, płeć, rasa, miejsce zamieszkania, pochodzenie etniczne, obywatelstwo, przebyte choroby, ewentualne dolegliwości mogące świadczyć o nosicielstwie *Blastocystis* spp.



Mapa 2. Geograficzne rozmieszczenie punktów zbioru materiału

Źródło: opracowanie własne.

## III.2. METODY

### III.2.1. ZABEZPIECZENIE MATERIAŁU

W przypadku pobierania materiału poza Warszawą (dzikie zwierzęta, zwierzęta z ogrodów zoologicznych, zwierzęta hodowlane) próbki były zabezpieczone w podłożu transportowym Amies z węglem wg opracowanej przez nas metodyki<sup>6</sup>.

Ze świeżych próbek kału pobierano niewielką ilość przy pomocy jednorazowej jałowej wymazówki (Pałeczka polistyrenowa z wacikiem wiskozowym w probówce transportowej jałowa z podłożem Amies z węglem, Eguimed, nr kat. 7.012.211.110). Podłoże transportowe zabezpieczało materiał przed dostępem powietrza, wysychaniem oraz innymi niekorzystnymi warunkami mogącymi wpłynąć na przeżywalność *Blastocystis* do czasu dostarczenia próbek do Laboratorium (Zdjęcie 6A).

### III.2.2. BADANIE METODĄ HODOWLI

Do plastikowej probówki ze szczelnym korkiem o pojemności 7 ml dodawano 3 ml zmodyfikowanej pożywki W. Jonesa [181] o następującym składzie (Zdjęcie 6B):

buforowana fosforanem sól fizjologiczna PBS (pH=7,2) – 45 ml;

jałowa surowica końska – 5 ml;

ekstrakt drożdży – 0,05 g.

Dalsze postępowanie zależało od sposobu dostarczenia materiału. W przypadku dostarczenia kału w odpowiednich pojemnikach niewielką ilość kału (wielkości główki od zapalki) za pomocą bagietki koagulologicznej dodawano do pożywki i szczelnie zamykano probówkę korkiem.

Jeżeli materiał był dostarczony na wymazówce, to patyczek z wymazem umieszczano w probówce, skracało patyczek za pomocą nożyczek i szczelnie zamykano probówkę korkiem (Zdjęcie 6C).

**Szczelność zamknięcia probówki jest ważna, ponieważ przy braku dostępu powietrza w probówce w krótkim czasie powstają warunki beztlenowe.**

---

<sup>6</sup> Walidacje metodyki przedstawiono w rozdziale IV.1 niniejszej rozprawy. Szczegółowa metodyka została opublikowana [72].

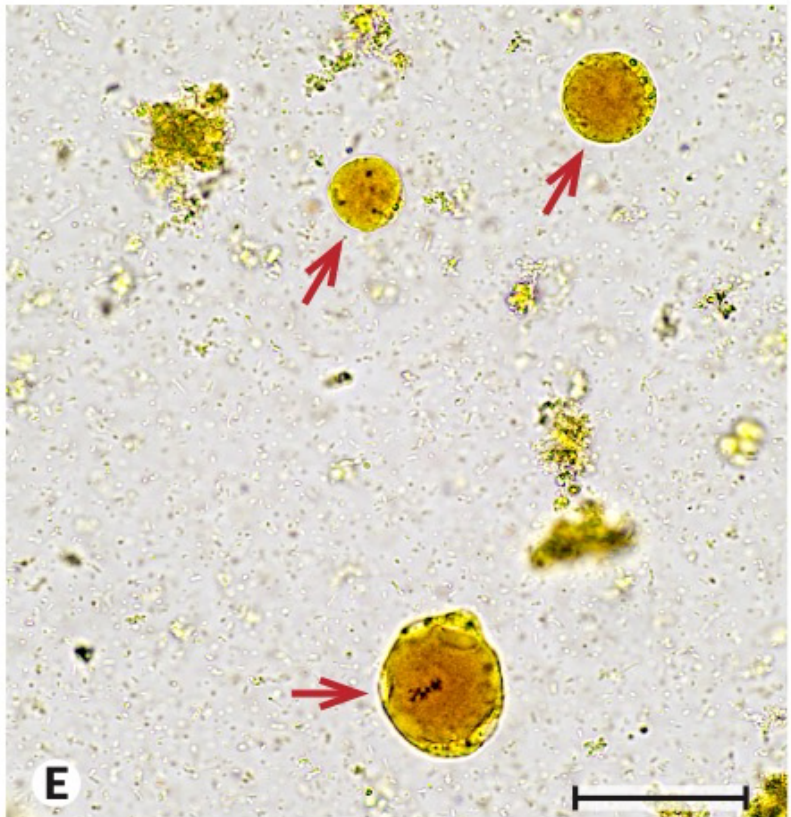
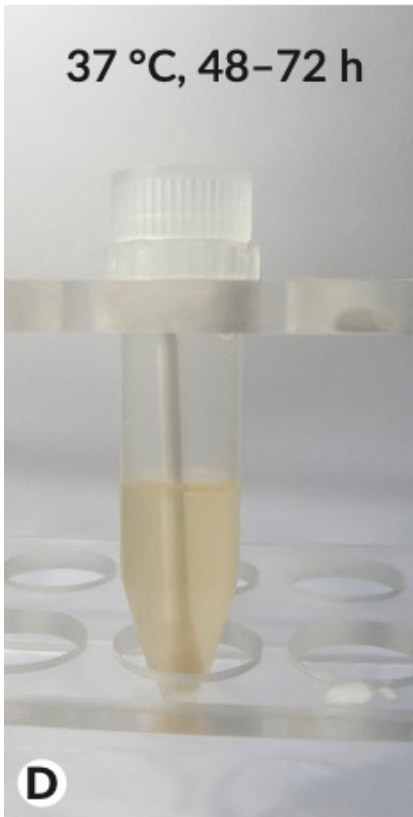
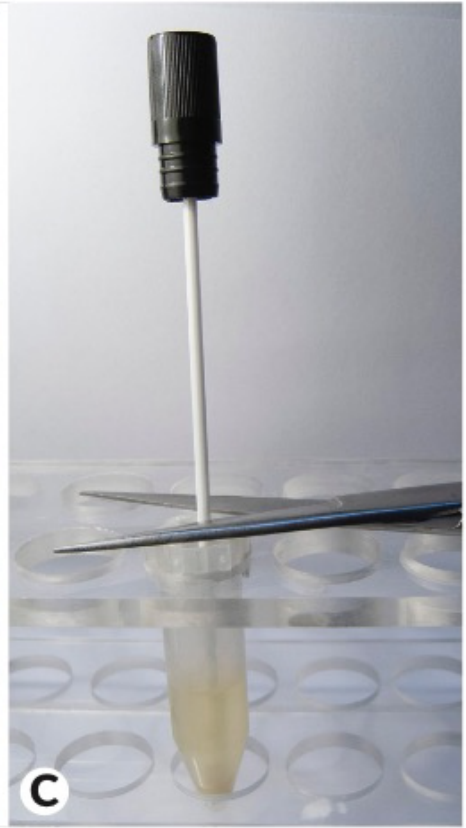
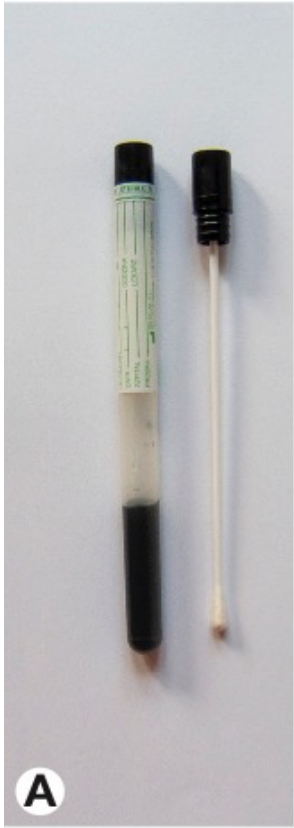
Tak przygotowaną hodowlę umieszczano w inkubatorze w temperaturze 37°C na 48 godz. (Zdjęcie 6D). Po upływie tego czasu hodowlę sprawdzano w badaniu mikroskopowym. Kroplę osadu podbarwionego płynem Lugola badano przy użyciu mikroskopu świetlnego przy powiększeniu do 400×. Komórki *Blastocystis* dobrze barwią się płynem Lugola i są łatwe do rozpoznania (Zdjęcie 6E). Ujemne w ocenie mikroskopowej hodowle były inkubowane przez kolejną dobę w tych samych warunkach i ponownie oceniane mikroskopowo.

Dodatkowo hodowle pasażowano na nowe podłoże i inkubowano 48 godz. W tym celu krople hodowli po uprzednim wymieszaniu przy pomocy pipety dodawano do nowej probówki z 3 ml pożywki (j. w.). Zabieg ten miał podwójne znaczenie: (1) otrzymanie możliwie jak najczystszej hodowli zawierającej głównie komórki *Blastocystis* i bakterii oraz (2) rozcieńczenie ewentualnych inhibitorów PCR, które mogły być w kale.

### **Zdjęcie 6. Badania kału w kierunku *Blastocystis* metodą hodowli**

*A – próbka z podłożem transportowym Amies z węglem oraz wymazówka. B – probówka z korkiem zawierająca podłoże hodowlane. C – skrócenie pałeczki za pomocą nożyczek. D – szczelnie zamknięta probówka inkubacja. E – Blastocystis w badaniu mikroskopowym osadu, strzałki wskazują na pojedyncze komórki Blastocystis – formy wakuolarne (preparat bezpośredni, płyn Lugola, skala 50 μm).*

Źródło: opracowanie własne: [72].





### III.2.3. BADANIE MOLEKULARNE

Osad komórkowy przenoszono przy pomocy pipety do próbek o pojemności 2 ml, starając się, żeby wraz z osadem przenieść jak najmniejszą ilość pożywki. Dodawano jałowy 0,9% roztwór NaCl i dokładnie mieszano i wirowano

Tak przygotowaną zawiesinę odwirowywano przy 80 g przez 1 min. Po odwirowaniu usuwano całość supernatantu, pozostawiając jedynie zbity na dnie pelet komórek, który był dalej przechowywany do czasu dalszej analizy przy  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### III.2.3.1. IZOLACJA DNA

Izolację DNA przeprowadzono za pomocą komercyjnych zestawów QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH) lub Genomic Mini (A&A Biotechnology) zgodnie z zaleceniami producentów.

#### III.2.3.2. PCR

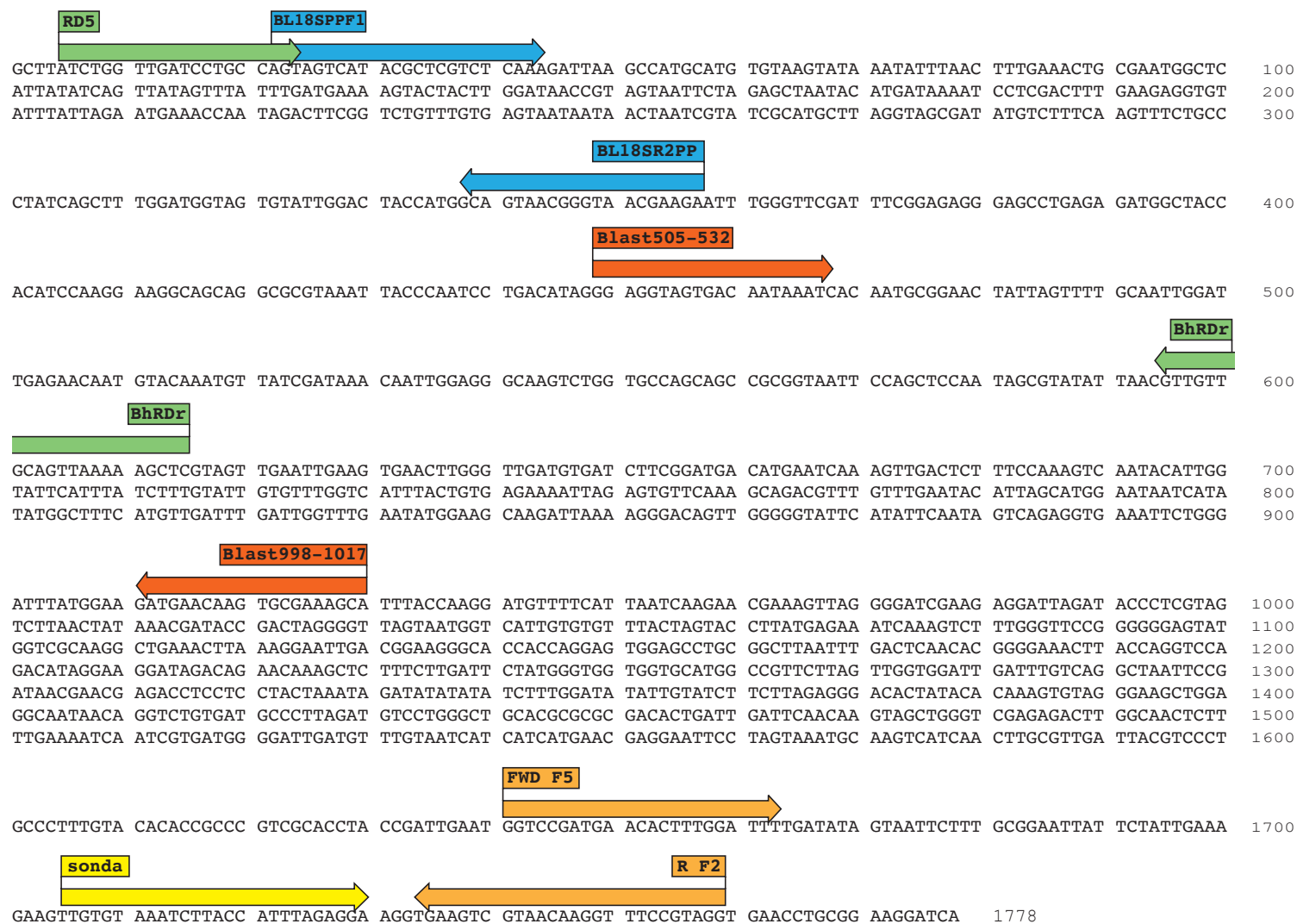
Przy użyciu metody PCR amplifikowano różne fragmenty genu rRNA małej podjednostki rybosomu (18S rRNA, SSU-rRNA). Wykaz zastosowanych starterów oraz wielkości uzyskiwanych produktów PCR przedstawiono w tabeli 2. Miejsca przyłączenia starterów zaznaczone na Rys. 9.

#### III.2.3.3. SEKWENCJONOWANIE

Uzyskane produkty rozdzielano przy pomocy elektroforezy na 2% żelu agarozowym. Produkty właściwej wielkości wycinano z żelu i oczyszczono przy użyciu komercyjnego zestawu Gel-Out (A&A Biotechnology, Gdańsk). Sekwencjonowanie metodą Sanger z użyciem starterów stosowanych do wykonania reakcji PCR wykonywano w pracowni sekwencjonowania Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN (Warszawa).

**Tabela 2. Wykaz starterów oraz wielkość uzyskiwanych produktów**

<b>Starery</b>	<b>F/R</b>	<b>Sekwencja startera</b>	<b>Wielkość uzyskanych produktów</b>	<b>Literatura</b>
RD5	F	5'-GGA AGC TTA TCT GGT TGA TCC TGC CAG TA-3'	ok. 560 pz.	[144]
BHRDr	R	5'-GAG CTT TTT AAC TGC AAC AAC G-3'		[182]
BL18SPPF1	F	5'-AGT AGT CAT ACG CTC GTC TCA AA-3'	ok. 340 pz.	[183]
BL18SR2PP	R	5'-TCT TCG TTA CCC GTT ACT GC-3'		
Blast505-532	F	5'-GGA GGT AGT GAC AAT AAA TC-3'	ok. 500 pz.	[184]
Blast998-1017	R	5'-TGC TTT CGC ACT TGT TCA TC-3'		[185]
FWDF5	F	5'-GGT CCG GTG AAC ACT TTG GAT TT-3'	ok. 120 pz.	[186]
RF2	R	5'-CCT ACG GAA ACC TTG TTA CGA CTT CA-3'		

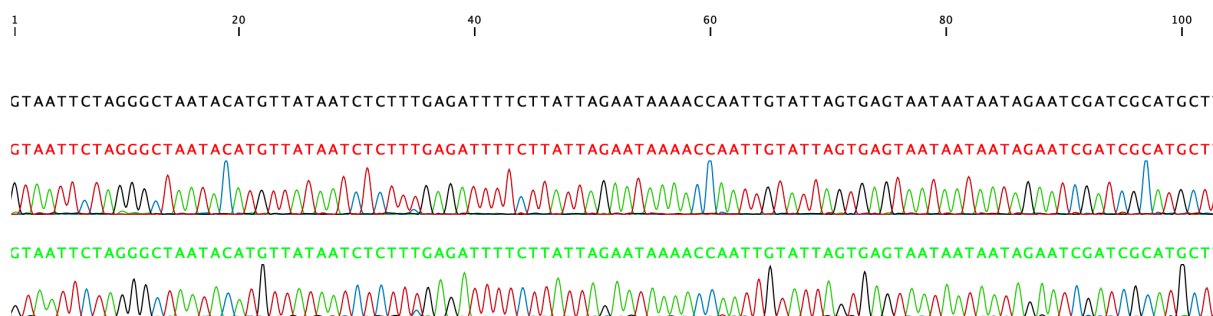


Rysunek 9. Miejsca przyłączenia starterów

Źródło: opracowanie własne.

### III.2.4 ANALIZA WYNIKÓW SEKWENCJONOWANIA

Uzyskane w wyniku sekwencjonowania chromatogramy analizowano przy użyciu oprogramowania CLC Main Workbench v 20.0.1 (QIAGEN Aarhus A/S). Otrzymane sekwencje, po usunięciu sekwencji starterów, porównywano z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank przy użyciu narzędzia BLAST [187].



**Rysunek 10. Przykładowy chromatogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania produktu PCR metodą Sangera**

Źródło: opracowanie własne.

### III.2.5 OKREŚLENIE SUBTYPÓW *BLASTOCYSTIS*

Określenie przynależności do konkretnego subtypu *Blastocystis* wykonywane było poprzez analizę filogenetyczną uzyskanych sekwencji oraz poprzez porównywanie otrzymanych sekwencji z sekwencjami zarejestrowanymi w bazie danych „PubMLST – Public databases for molecular typing and microbial genome diversity” (<https://pubmlst.org/organisms/blastocystis-spp>) [188].

#### III.2.5.1 ANALIZA FILOGENETYCZNA

Analizę filogenetyczną wykonano metodą opierającą się na wnioskowaniu bayesowskim. W tym celu wykorzystane było oprogramowanie „MrBayes on XSEDE” dostępne on-line w serwisie „CIPRES – Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research” [189,190].

Uwzględnionych było 41 sekwencje referencyjne reprezentujące subtypy ST1–ST17 [191–193] (Tabela 3). Jako grupę zewnętrzną (outgroup) użyto sekwencję *Proteromonas lacertae* (GenBank: U37108).

**Tabela 3. Sekwencje referencyjne z bazy GenBank wykorzystane do konstrukcji drzew filogenetycznych**

<b>Subtyp</b>	<b>AB070989 (człowiek), U51151 (człowiek), AB107967 (małpa)</b>
ST1	AB070989 (człowiek), U51151 (człowiek), AB107967 (małpa)
ST2	AB070987 (człowiek), AB070997 (małpa), AB107969 (małpa)
ST3	AB070988 (człowiek), AB107963 (świnia), AB107965 (bydło)
ST4	AB071000 (szczur), AY135408 (szczur), U51152 (guinea kawia domowa)
ST5	AB070999 (świnia), AB107964 (świnia), AB070998 (świnia)
ST6	AB107972 (kuropatwa), AB070995 (przepiórka), AB070990 (człowiek)
ST7	AY135412 (kaczka), AB070991 (człowiek), AF408427 (człowiek)
ST8	AB107970 (lemur wari) AF408425 (człowiek),
ST9	AF408426 (człowiek) PLU37108 (brak informacji)
ST10	KX352006 (próba środowiskowa – woda), KC148207 (wielbłąd jednogarbny), MT898456 (bydło), MT898457 (bydło).
ST11	MT898454 (słoń), MT898455 (słoń)
ST12	EU427515 (walabia bagienna)
ST13	KC148209 (kanczyl jawajski)
ST14	KC148205 (bydło), MT898458 (bydło), MT898459 (bydło)
ST15	KC148210 (wielbłąd jednogarbny), KC148211 (gibbon), MK801387 (świnia)
ST16	EU427512 (kangur rudy), EU427514 (kangur rudy)
ST17	KC148208 (gundia zwyczajna)

### III.2.5.2 SERWIS PUBMLST

Baza danych zawiera sekwencje *Blastocystis* używane do określenia subtypu metodą barkodingu oraz posiada narzędzie pozwalające na szybkie określenie subtypu *Blastocystis*. Dodatkowo jest możliwość badania zmienności wewnątrz subtypu poprzez określenie rozpoznanie poszczególnych alleli.

### III.2.5.3. BADANIA PODOBIENSTWA FAUNISTYCZNEGO SUBTYPÓW *BLASTOCYSTITIS* SPP. CZŁOWIEKA, INNYCH SSAKÓW I PTAKÓW

W celu oceny podobieństwa faunistycznego subtypów *Blastocystis* występujących u ssaków, w tym człowieka i ptaków zastosowaliśmy następujące wskaźniki [194]:

wskaźnik Czekanowskiego-Dice'a-Sørensen:

$$I_{CDS} = 2a / ((a + b) + (a + c));$$

wskaźnik Jaccarda:

$$I_J = a / (a + b + c);$$

wskaźnik Kulczyńskiego:

$$I_K = a / (b + c).$$

gdzie  $a$  – liczba wspólnych subtypów dla dwóch grup żywicieli;  $b$  – liczba subtypów pierwszej z porównywanych grup żywicieli,  $c$  – liczba subtypów drugiej z porównywanych grup żywicieli.

### III.2.6. NOMENKLATURA ZWIERZĄT STAŁOCIEPLNYCH I BLASTOCYSTIS

Nomenklaturę subtypów *Blastocystis* przyjęto zgodnie z rekomendacjami Stensvolda i zespołu [195].

Nazwy wykrytych alleli (allele id) stosowane zgodnie z bazą danych „Pub-MLST – Public databases for molecular typing and microbial genome diversity” (<https://pubmlst.org/organisms/blastocystis-spp>) [188]

Polskie nazewnictwo ptaków ustalono zgodnie z zaleceniami Komisji Faunistycznej Sekcji Ornitologicznej Polskiego Towarzystwa Zoologicznego ([www.komisjafaunistyczna.pl](http://www.komisjafaunistyczna.pl)). Polskie nazewnictwo ssaków przyjęto według opracowania „Polskie nazewnictwo ssaków świata” [196].

### III.2.7. SEKWENCJE ZGŁOSZONE DO GENBANK

Wybrane sekwencje zgłoszone do bazy danych GenBank. Numery referencyjne: KU684642–KU684646, MG720855–MG720858, MW173219–MW173229, MW346667–MW346669.

## IV. Wyniki i omówienie

### IV.1 WALIDACJA METODY POBIERANIA, PRZECHOWYWANIA I TRANSPORTOWANIA KAŁU ZA POMOCĄ WYMAZÓWEK NA PODŁOŻU TRANSPORTOWYM.

W celu ustalenia stabilności materiału na podłożu transportowym wykonano hodowle w różnych odstępach czasu od momentu pobrania materiału. Naszym założeniem było rozpoczęcie hodowli w ciągu 10 dni od momentu pobrania materiału. Czas 10 dni wynika z specyfiki przekazywania materiału do laboratorium.

Materiał służący do walidacji metody stanowiły 3 próby kału, w których potwierdzono obecność komórek *Blastocystis*. Z każdej z prób kału wykonano po 10 wymazów i umieszczono je na podłożu transportowym AMIES zawierającym węgiel. Pobrane wymazy przechowywano w temperaturze pokojowej. Każdego kolejnego dnia wykonywano posiew z kolejnej wymazówki na zmodyfikowanym podłożu Jonesa.

Wśród prób kału zawierających *Blastocystis* nie udało się odzyskać hodowli w przypadku dwóch wymazów wysiewanych w dobie dziesiątej od momentu pobrania wymazów.

Uznano, że kał pobrany na podłoże transportowe jest przydatny do naszych badań przez okres 9 dni od dnia wykonania wymazu.

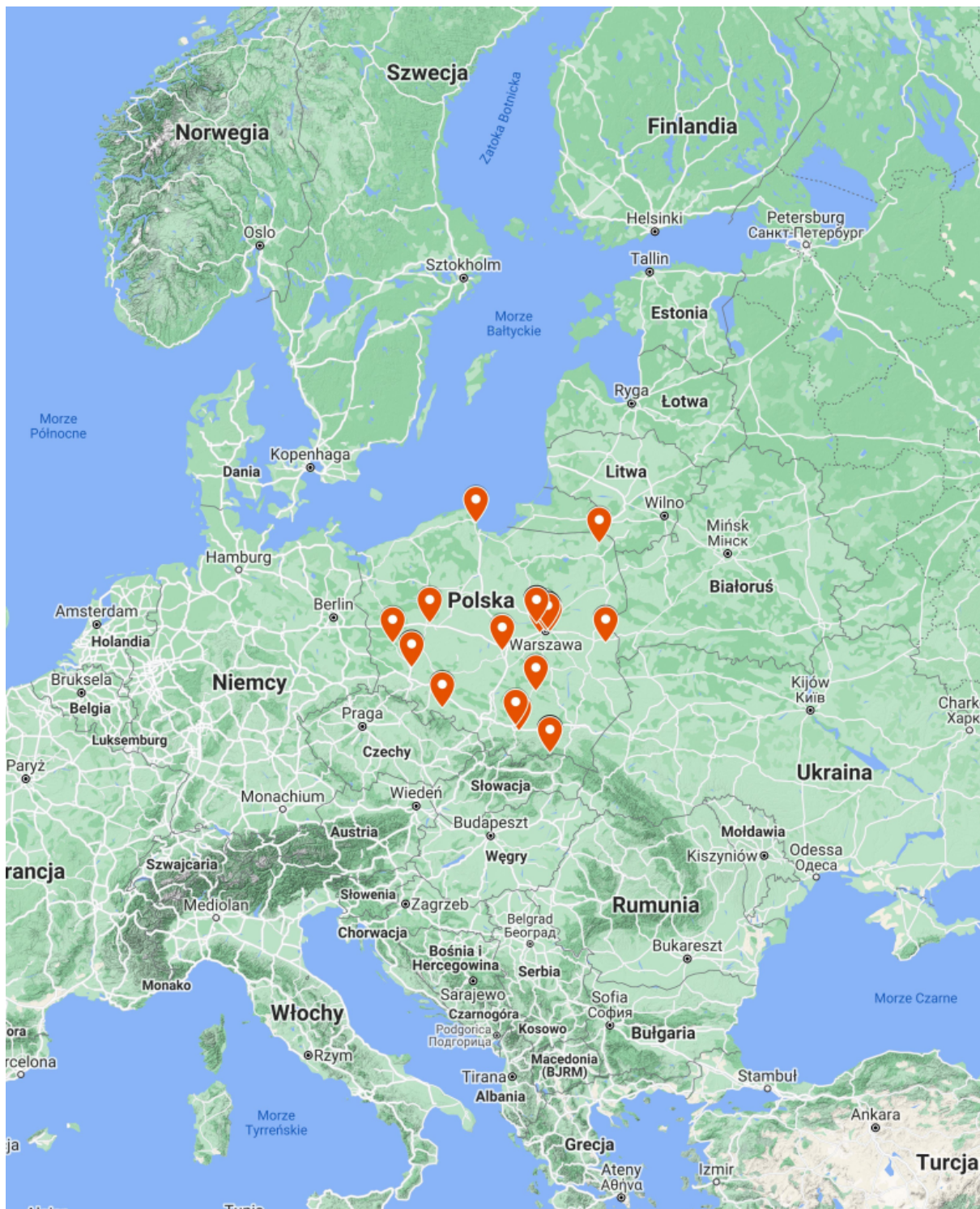
#### IV.2 RÓŻNORODNOŚĆ ŻYWICIELI, U KTÓRYCH WYKRYTO *BLASTOCYSTIS*

Łącznie przebadano materiał pochodzący od człowieka i 73 gatunków zwierząt, w tym 33 gatunków ssaków należących do 7 rzędów i 41 gatunków ptaków należących do 6 rzędów (Mapa 2, Tabela 4–5).

W wyniku przeprowadzonych badań spośród przebadanych 1413 próbek na obecność *Blastocystis*, uzyskano 156 próbek dodatnich.

W grupie 784 badanych ludzi, wyniki dodatnie uzyskaliśmy w przypadku 86 próbek. Spośród 629 prób pochodzących od zwierząt uzyskaliśmy 70 prób dodatnich. 27 prób dodatnich od ptaków i 43 dodanie próby pochodzące od ssaków innych niż człowiek.





Mapa 3. Geograficzne rozmieszczenie punktów zbioru materiału z których użyte były dodatkowe wyniki

Źródło: opracowanie własne.

**Tabela 4. Wyniki badania ptaków na obecność *Blastocystis*.**

Gatunki ptaków w układzie systematycznym	Ilość prób		Wykryty subtyp (subtypy) <i>Blastocystis</i>
	zbadanych	dodatnich	
<b>Rząd Anseriformes (Blaszkodziobe)</b>			
<b>Rodzina Anatidae (Kaczkowate)</b>			
Rodzaj <i>Aix</i>			
<i>Aix galericulata</i> , kaczka mandarynka	2	1	ST7
Rodzaj <i>Anser</i>			
<i>Anser anser</i> , gęś gęgawa	1	0	–
<i>Anser canagicus</i> , gęś śnieżycy cesarska	1	0	–
<i>Anser domesticus</i> , gęś	11	4	ST7
<i>Anser indicus</i> , gęś tybetańska	1	0	–
Rodzaj <i>Branta</i>			
<i>Branta leucopsis</i> , bernikla białolica	1	1	ST7
Rodzaj <i>Cygnus</i>			
<i>Cygnus cygnus</i> , łabędź	1	0	–
<b>Rząd Galliformes (Grzebiące)</b>			
<b>Rodzina Cracidae (Czubacze)</b>			
Rodzaj <i>Pauxi</i>			
<i>Pauxi pauxi</i> , czubacz chełmisty	1	0	–
<b>Rodzina Phasianidae (Kurowate)</b>			
Rodzaj <i>Argusianus</i>			
<i>Argusianus argus</i> , bażant argus malajski	1	0	–
Rodzaj <i>Chrysolophus</i>			
<i>Chrysolophus pictus</i> , bażant złoty	2	2	ST7
Rodzaj <i>Crossoptilon</i>			
<i>Crossoptilon crossoptilon</i> , bażant uszak biały	1	0	–
Rodzaj <i>Gallus</i>			
<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> , kura	111	12	ST5, ST6, ST7
<i>Gallus gallus</i> f. <i>domesticus</i> , kura czubatka miniatura	1	0	–
<i>Gallus gallus</i> f. <i>domesticus</i> , kury serama	1	1	ST7
<i>Gallus gallus</i> f. <i>domesticus</i> , kury zielononóżki	1	0	–
Rodzaj <i>Ithaginis</i>			
<i>Ithaginis cruentus</i> , bażant nepalski	1	0	–

Rodzaj <i>Lophophorus</i>			
<i>Lophophorus impejanus</i> , bażant himalajski	1	0	–
<i>Lophophorus impejanus</i> , bażant olśniak himalajski	1	0	–
Rodzaj <i>Lophura</i>			
<i>Lophura diardi</i> , bażant syjamski	1	0	–
<i>Lophura edwardsi</i> , bażant kiściec annamski	1	0	–
<i>Lophura nycthemera</i> , bażant/kiściec srebrzysty	1	0	–
<i>Lophura swinhoii</i> , bażant/kiściec tajwański	1	1	ST7
Rodzaj <i>Lyrurus</i>			
<i>Lyrurus tetrix</i> , cietrzew	1	1	ST7
Rodzaj <i>Meleagris</i>			
<i>Meleagris gallopavo</i> , indyk	40	1	ST5
Rodzaj <i>Numida</i>			
<i>Numida meleagris</i> , perliczka zwyczajna	1	0	–
Rodzaj <i>Pavo</i>			
<i>Pavo cristatus</i> , paw indyjski	1	1	ST27
Rodzaj <i>Phasianus</i>			
<i>Phasianus colchicus</i> , bażant łowny/zwyczajny	1	1	ST7
Rodzaj <i>Phasianus</i>			
<i>Pternistis leucoscepus</i> , bażant frankolin żółtogardłowy/ szponiastonóg żółtogardły	1	0	–
Rodzaj <i>Syrmaticus</i>			
<i>Syrmaticus ellioti</i> , bażant eliota/bażant kasztanowy	1	0	–
<i>Syrmaticus humiae</i> , bażant birmański	1	1	ST7
<i>Syrmaticus reevesi</i> , bażant królewski	1	0	–
Rodzaj <i>Tetrao</i>			
<i>Tetrao urogallus</i> , głuszec	2	0	–
<b>Rząd Ciconiiformes (Brodzące)</b>			
<b>Rodzina Ciconiidae (Bociany)</b>			
Rodzaj <i>Ciconia</i>			
<i>Ciconia ciconia</i> , bocian biały	2	0	–
<b>Rząd Falconiformes (Szponiaste)</b>			
<b>Rodzina Accipitridae</b>			
Rodzaj <i>Haliaeetus</i>			
<i>Haliaeetus albicilla</i> , orzeł bielik	1	0	–
<b>Rodzina Falconidae</b>			
Rodzaj <i>Falco</i>			
<i>Falco subbuteo</i> , kobuz	1	0	–

Rząd Gruiformes (Żurawiowe)			
<b>Rodzina Gruidae (Żurawie)</b>			
Rodzaj <i>Grus</i>			
<i>Grus grus</i> , żuraw szary	1	0	–
<i>Grus japonensis</i> , żuraw mandżurski	1	0	–
<i>Grus vipio</i> , żuraw białoszyi	1	0	–
Rząd Psittaciformes (Papugowe)			
<b>Rodzina Psittaculidae (Papugowate)</b>			
Rodzaj <i>Agapornis</i>			
<i>Agapornis personatus</i> , papużka nierozłączka czarno-głowa	1	0	–
Rząd Strigiformes (Sowy)			
<b>Rodzina Strigidae (Puszczykowate)</b>			
Rodzaj <i>Bubo</i>			
<i>Bubo bubo</i> , Puchacz zwyczajny	1	0	–
Rodzaj <i>Strix</i>			
<i>Strix aluco</i> , Puszczyk zwyczajny	1	0	–
<i>Strix nebulosa</i> , sowy puszczyk mszarny	1	1	ST7
<i>Strix uralensis</i> , sowy puszczyki uralские	1	0	–
Rodzaj <i>Surnia</i>			
<i>Surnia ulula</i> , sowa jarzębata	1	0	–
<b>Razem</b>	<b>206</b>	<b>26</b>	–

Tabela 5. Wyniki badania ssaków na obecność *Blastocystis*, w tym człowieka i zwierząt hodowlanych

Gatunki ssaków w układzie systematycznym	Ilość prób		Wykryty subtyp (subtypy) <i>Blastocystis</i>
	zbadanych	dotatnich	
<b>Rząd Primates (Naczelne)</b>			
<b>Rodzina Lemurowate (Lemuridae)</b>			
Rodzaj <i>Lemur</i>			
<i>Lemur catta</i> , lemur katta	1	1	ST8
<b>Rodzina Czepiakowate (Atelidae)</b>			
Rodzaj <i>Alouatta</i>			
<i>Alouatta</i> sp., wyjec	1	1	ST8
<b>Rodzina Cercopithecidae (Koczkodanowate)</b>			
Rodzaj <i>Cercopithecus</i>			
<i>Cercocebus torquatus</i> , mangaba obroźna	1	1	ST1
<i>Cercopithecus nictitans</i> , koczkodan białonosy	1	1	ST2
<i>Cercopithecus lhoesti</i> , koczkodan górski	1	1	ST2
Rodzaj <i>Macaca</i>			
<i>Macaca nigra</i> , makak czubaty	1	1	ST1
<b>Rodzina Hominidae (Człowiekowate)</b>			
Rodzaj <i>Homo</i>			
<i>Homo sapiens</i> , człowiek rozumny	784	86	ST1, ST2, ST3, ST4,
Rodzaj <i>Pan</i>			
<i>Pan troglodytes</i> , szympanś zwyczajny	1	1	ST5
<b>Rząd Lagomorpha (Zajęczaki)</b>			
<b>Rodzina Leporidae (Zajęcowate)</b>			
Rodzaj <i>Lepus</i>			
<i>Lepus (Eulagos) europaeus</i> , zając szarak	4	0	–
Rodzaj <i>Oryctolagus</i>			
<i>Oryctolagus cuniculus</i> , królik europejski	1	0	–
<b>Rząd Erinaceomorpha (Jeżokształtne)</b>			
<b>Rodzina Erinaceidae (Jeżowate)</b>			
Rodzaj <i>Erinaceus</i>			
<i>Erinaceus europaeus</i> , jeż zachodni	61	6	ST1, ST7
<b>Rząd Carnivora (Drapieżne)</b>			
<b>Rodzina Felidae (Kotowate)</b>			
Rodzaj <i>Felis</i>			
<i>Felis catus</i> , kot domowy	20	0	–
<b>Rodzina Canidae (Psowate)</b>			
Rodzaj <i>Canis</i>			
<i>Canis lupus</i> , wilk szary	6	3	ST1, ST3, ST5
<i>Canis lupus familiaris</i> , pies domowy	52	1	ST7
Rodzaj <i>Vulpes</i>			
<i>Vulpes vulpes</i> , lis rudy	9	0	–

<b>Rodzina Mustelidae (Łasicowate)</b>			
Rodzaj <i>Martes</i>			
<i>Martes martes</i> , kuna leśna	7	0	–
Rodzaj <i>Mustela</i>			
<i>Mustela nivalis</i> , łośnica pospolita	1	0	–
<i>Mustela putorius</i> , tchórz zwyczajny	1	0	–
<b>Rodzina Procyonidae (Szopowate)</b>			
Rodzaj <i>Procyon</i>			
<i>Procyon lotor</i> , szop praczy	1	0	–
<b>Rząd Perissodactyla (Nieparzystokopytne)</b>			
<b>Rodzina Equidae (Koniowate)</b>			
Rodzaj <i>Equus</i>			
<i>Equus asinus</i> , osioł zwyczajny	2	0	–
<i>Equus caballus caballus</i> , koń domowy	14	0	–
<b>Rząd Artiodactyla (Parzystokopytne)</b>			
<b>Rodzina Suidae (Świnowate)</b>			
Rodzaj <i>Sus</i>			
<i>Sus scrofa</i> , dzik euroazjatycki	6	1	ST5
<i>Sus scrofa</i> , świnia maskowa	3	3	ST5
<i>Sus scrofa</i> , świnia	3	2	ST5
Rodzaj <i>Potamochoerus</i>			
<i>Potamochoerus larvatus</i> , dzikan zaroślowy	4	1	ST5
<b>Rodzina Cervidae (Jeleniowate)</b>			
Rodzaj <i>Alces</i>			
<i>Alces alces</i> , łoś euroazjatycki	2	0	–
Rodzaj <i>Capreolus</i>			
<i>Capreolus capreolus</i> , sarna europejska	10	0	–
Rodzaj <i>Cervus</i>			
<i>Cervus elaphus</i> , jelen szlachetny	21	2	ST1
<b>Rodzina Bovidae (Wołowate)</b>			
Rodzaj <i>Bison</i>			
<i>Bison bonasus</i> , żubr europejski	90	5	ST1, ST3, ST5, ST7
Rodzaj <i>Bos</i>			
<i>Bos taurus taurus</i> , bydło domowe	71	4	ST7
Rodzaj <i>Capra</i>			
<i>Capra hircus</i> , koza domowa	7	3	ST24
Rodzaj <i>Ovis</i>			
<i>Ovis aries</i> , owca domowa	10	2	ST24
<b>Rząd Rodentia (Gryzonie)</b>			
<b>Rodzina Muridae (Myszowate)</b>			
Rodzaj <i>Rattus</i>			
<i>Rattus norvegicus</i> , szczur wędrowny	3	3	ST4
<b>Rodzina Caviidae (Kawiwate)</b>			
Rodzaj <i>Cavia</i>			
<i>Cavia porcellus</i> , kawia domowa	1	0	–
<b>Razem</b>	<b>410</b>	<b>32</b>	



### *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST1

(syn. Clade I; Subtype I; Group/subtype: I/1; Subtype: 1, Riboderme: 1, 8; Subgroup III; Cluster: E; Subtype: 1, 1 variant)<sup>7</sup>

**Allele:** u większość izolatów stwierdzono allel 4; w dwóch izolatach – stwierdzono allel, który dotychczas nie był zarejestrowany w serwisie PubMLST.

**Żywiciele:** człowiek oraz zwierzęta (jeź zachodni, wilk szary, jeleń szlachetny, żubr europejski, mangaba rudoczalna, makak czubaty).

#### **Komentarz**

Subtyp w Polsce wykryty po raz pierwszy u człowieka przez Kotłowskiego [54], a później przez nasz zespół [197–199] oraz badaczy z innych ośrodków [69,200,201]. Ten subtyp ST1 był również odnotowany przez nasz zespół u jeża zachodniego [68] oraz u zwierząt z Ogrodu zoologicznego we Wrocławiu [202]. Nasze wykrycie *Blastocystis* u jeży było pierwszym na świecie opisanym przypadkiem.

### *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST2

(syn. Clade II; Subtype II; Group/subtype: II/5; Subtype: 5, Riboderme: 6; Subgroup V; Cluster: C, D)

**Allele:** allel 9.

**Żywiciele:** człowiek oraz zwierzęta (koczkodan białonosy, koczkodan górski).

#### **Komentarz**

Subtyp w Polsce wykryty po raz pierwszy przez Kotłowskiego [54] u człowieka, później u tego samego żywiciela był odnotowywany przez nasz zespół [197,198,203] oraz badaczy z innych ośrodków [69,158,199–201]. Subtyp ST2 był również odnotowany przez nasz zespół u zwierząt z Wrocławskiego zoo [202].

### *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST3

(syn. Clade III; Subtype III; Group/subtype: III/3; Subtype: 3; Riboderme: 2, 7, 4?, 5?; Subgroup: I, II, Cluster: A; Subtype: 3)

**Allele:** u większość izolatów stwierdzono allel 34; w dwóch izolatach – stwierdzono allel 36.

**Żywiciel:** Człowiek oraz zwierzęta (wilc, szary, żubr europejski)

---

<sup>7</sup> Inne historyczne nazwy subtypu, stosowane, głównie, przed rokiem 2007 (szczegóły: [195]).



### Komentarz

W Polsce wykryty po raz pierwszy przez Kotłowskiego [54] u człowieka, później u tego samego żywiciela był odnotowywany niejednokrotnie przez nasz zespół [62,197,203,204] oraz badaczy z innych ośrodków [69,158,199–201,205,206].

#### *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST4

(syn. Clade IV; Subtype IV; Group/subtype: IV/7; Subtype: 7, Riboderme: 3; Subgoup IV; Cluster: B; *Blastocystis ratti* Chen, Singh, Ho, Tan, Ng, Moe, Yap, 1997)

**Allele:** w izolacie wykrytym u człowieka stwierdzono allel 42, w izolatach od szczurów – allel 92.

**Żywiciel:** człowiek oraz zwierzęta (szczur wędrowny).

### Komentarz

W Polsce wykryty po raz pierwszy przez Kotłowskiego [54] u człowieka, później u tego samego żywiciela wykryty przez nasz zespół [199] oraz kolegów [200]. Po raz pierwszy odnotowujemy u zwierząt.

#### *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST5

(syn. Clade V; Subtype V; Group/subtype: V/6; Subtype: 6)

**Allele:** stwierdzono allel, który dotychczas nie był zarejestrowany w serwisie Pub-MLST, maksymalnie podobny allel to allel 115.

**Żywiciel:** Człowiek oraz zwierzęta (kura domowa, indyk, szympanś zwyczajny, wilk szary, dzik euroazjatycki, żubr europejski, świnia maskowa, dzikan zaroślowy)

### Komentarz

W Polsce wykryty po raz pierwszy przez nasz zespół u kur [204] oraz zwierząt z wrocławskiego zoo (szympanś) [202]. W późniejszych latach opisywany u świń [70] oraz u dzików i pekari z Gdańskiego Ogrodu Zoologicznego [74].

#### *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST6

(syn. Clade VI; Subtype VI; Group/subtype: VI/4; Subtype: 4, Riboderme: 9; Subtype: 4)

**Allele:** u większość izolatów stwierdzono allel 123; w jednym izolacie od człowieka – stwierdzono allel, który dotychczas nie był zarejestrowany w serwisie Pub-MLST.

**Żywiciel:** Człowiek oraz zwierzęta (kura domowa)

#### **Komentarz**

Informacja o wykryciu subtypu ST6 w Polsce po raz pierwszy była przedstawiona przez nasz zespół wiosną 2016 na Europejskim Multikoloquium z Parazytologii w Turku [62] (patrz również: [203]. Również przez nasz zespół subtyp ST6 był wykryty po raz pierwszy u kur w Polsce [63] (patrz również: [204]). Jesienią tego samego roku ukazała się informacja o wykryciu ST6 pacjenta w Olsztynie [200].

#### *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST7

(syn. Clade VII; Subtype VII; Group/subtype: VII/2, VII/2 outliers; Subtype: 2, Riboderme: 10; SubgroupVI; Subtype: 2)

**Allele:** u większość izolatów stwierdzono allel 100; w jednym izolacie od człowieka i kilku izolatach od kur stwierdzono allel 112; u żubra – stwierdzono allel, który do tychczas nie był zarejestrowany w serwisie PubMLST.

**Żywiciel:** Człowiek oraz zwierzęta (bydło domowe, jeź zachodni, kaczka mandarynka, gęgawa, bernikla białolica, bażanta złocisty, kura domowa, kura serama, bażant tajwański, cietrzew, bażant łowny, bażant birmański i puszczyk mszarny, żubr europejski, pies domowy)

#### **Komentarz**

W Polsce wykryty po raz pierwszy u człowieka przez [200]. Odnotowywany u ludzi również przez nasz zespół [198,199,207] oraz kolegów [201,208]. Po raz pierwszy u zwierząt ST7 był wykryty przez nasz zespół u kur [204,209] oraz u jeży [68]. Nasze wykrycie *Blastocystis* u jeży było pierwszym na świecie opisanym przypadkiem.

#### *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST8

(syn. Subtype IVa; Group/subtype: IV/7 outliers)

**Allele:** we wszystkich izolatach stwierdzono allel 21.

**Żywiciele:** lemur kata, wyjec.

#### **Komentarz**

W Polsce subtyp S8 odnotowujemy u **naczelnych** po raz pierwszy. Niedawno subtyp był wykryty u **kangura rudego** w ogrodzie zoologicznym w Gdańsku [74].

*Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST9

(syn. Subtype VIa; Group/subtype: VI/4 outliers)

**Allele:** w badanym izolacie stwierdzono allel, który dotychczas nie był zarejestrowany w serwisie PubMLST; maksymalnie podobny allel to allel 129.

**Żywiciel:** człowiek.

**Komentarz**

Oprócz naszych badań w Polsce wykryty u **człowieka** przez kolegów [210].

*Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST24

**Allele:** w badanych izolatach stwierdzono allel, który dotychczas nie był zarejestrowany w serwisie PubMLST.

**Żywiciele:** Koza, owca domowa

**Komentarz**

Subtyp ST24 odnotowujemy w Polsce po raz pierwszy. U **owiec i kóz** z ogrodu zoologicznego w Gdańsku wcześniej stwierdzono subtyp ST14 [74]. Otrzymane przez nas sekwencje różnią się od sekwencji uzyskanych w badaniach Rudzińskiej.

*Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis*, subtyp ST27

**Allele:** w badanych izolatach stwierdzono allel, który dotychczas nie był zarejestrowany w serwisie PubMLST.

**Żywiciele:** Paw indyjski.

**Komentarz**

Subtyp ST27 odnotowujemy w Polsce po raz pierwszy.

## IV.4 WYSTĘPOWANIE *BLASTOCYSTIS* U PRZEBADANYCH ŻYWICIELI

### IV.4.1. PTAKI

#### *Aix galericulata*, kaczka mandarynka

W jednej z dwóch pulowanych prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

#### *Anser anser*, gęgawa

W badanej populacji stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. u 4 z 12 pulowanych prób. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7. Są to pierwsze genotypy uzyskane u tego gatunku w Polsce.

W Rosji u gęsi stwierdzono występowanie *Blastocystis anseri* Belova, [31,211].

#### *Branta leucopsis*, bernikla białolica

W jednej pulowanej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

#### *Chrysolophus pictus*, bażant złocisty

W dwóch pulowanych próbkach stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

#### *Gallus gallus domesticus*, kura

W trzynastu ze stu czternastu pulowanych prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskane sekwencje odpowiadają subtypom ST5, ST6 i ST7. Jest to pierwsza informacja o genotypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

W Rosji u kur stwierdzono występowanie *Blastocystis galli* Belova et Kostenko, 1990 [32,211].

*Lophura swinhoii*, bażanty tajwańskie/kiściec tajwański

W jednej pulowanej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

*Lyrurus tetrix*, cietrzew

W jednej pulowanej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

*Meleagris gallopavo*, indyk

W jednej z 40 pulowanych prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp.

Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST5.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

*Pavo cristatus*, paw indyjski

W jednej pulowanej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp.

Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST27.

Jest to pierwsza informacja o *Blastocystis* u tego żywiciela w Polsce oraz pierwsze stwierdzenie subtypu ST27 w Polsce.

*Phasianus colchicus*, bażant łowny

W jednej pulowanej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

*Syrmaticus humiae*, bażant birmański

W jednej pulowanej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

*Strix nebulosa*, puszczyk mszarny

W jednej pulowanej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

IV.4.2 SSAKI

*Homo sapiens*, człowiek rozumny

Obecność *Blastocystis* sp stwierdzono w 51 z 74 przebadanych prób (51/774).

Uzyskane sekwencje odpowiadają następującym subtypom ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6, ST 7 i ST 9.

W niniejszych badaniach po raz pierwszy u człowieka w Polsce stwierdzono subtyp ST9.

*Pan troglodytes*, szympanś zwyczajny

W jednej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST5.

Jest to pierwszy genotyp uzyskany u tego gatunku w Polsce.

*Cercocebus torquatus*, mangaba obroźna

W jednej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST1.

Jest to pierwszy genotyp uzyskany u tego gatunku w Polsce.

*Macaca nigra*, makak czubaty

W jednej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST1.

Jest to pierwszy genotyp uzyskany u tego gatunku w Polsce.

*Cercopithecus nictitans*, koczkodan białonosy

W jednej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST2.

Jest to pierwszy genotyp uzyskany u tego gatunku w Polsce.

*Allochrocebus lhoesti*, koczkodan górski

W jednej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST2.

Jest to pierwszy genotyp uzyskany u tego gatunku w Polsce.

*Lemur catta*, lemur kata

W jednej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST8.

Jest to pierwszy genotyp uzyskany u tego gatunku w Polsce.

*Alouatta* sp., wyjec

W jednej próbie stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST8.

Jest to pierwszy genotyp uzyskany u tego gatunku w Polsce.

*Erinaceus europaeus*, jeż zachodni

W 6 z 61 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST1 i ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce i na Świecie.

*Canis lupus*, wilk szary

W 4 z 61 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST1, ST3 i ST5.

Jest to pierwsza informacja o subtypach występujących u tego żywiciela w Polsce.

*Canis lupus familiaris*, pies domowy

W 1 z 52 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

#### *Sus scrofa*, dzik euroazjatycki

W 1 z 6 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST5.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

#### *Sus scrofa*, świnia

W 5 z 6 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST5.

#### *Potamochoerus larvatus*, dzikan zaroślowy

W 3 z 4 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST5.

Jest to pierwsza informacja o subtypach występującym u tego żywiciela w Polsce.

#### *Cervus elaphus*, jeleń szlachetny

W 2 z 21 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST1.

Jest to pierwsza informacja o subtypach występującym u tego żywiciela w Polsce.

#### *Bison bonasus*, żubr europejski

W 5 z 90 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST1, ST3, ST5, ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypach występujących u tego żywiciela w Polsce.

#### *Bos taurus taurus*, bydło domowe

W 4 z 71 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskane sekwencje odpowiadają subtypowi ST7.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.

#### *Capra hircus*, koza domowa

W 3 z 7 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST24.

Jest to pierwsza informacja o subtypie występującym u tego żywiciela w Polsce.



*Ovis aries*, owca domowa

W 2 z 10 pulowanych prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST24. Wcześniej w Polsce u owcy było stwierdzono występowanie subtypu ST14 [74].

*Rattus norvegicus*, szczur wędrowny

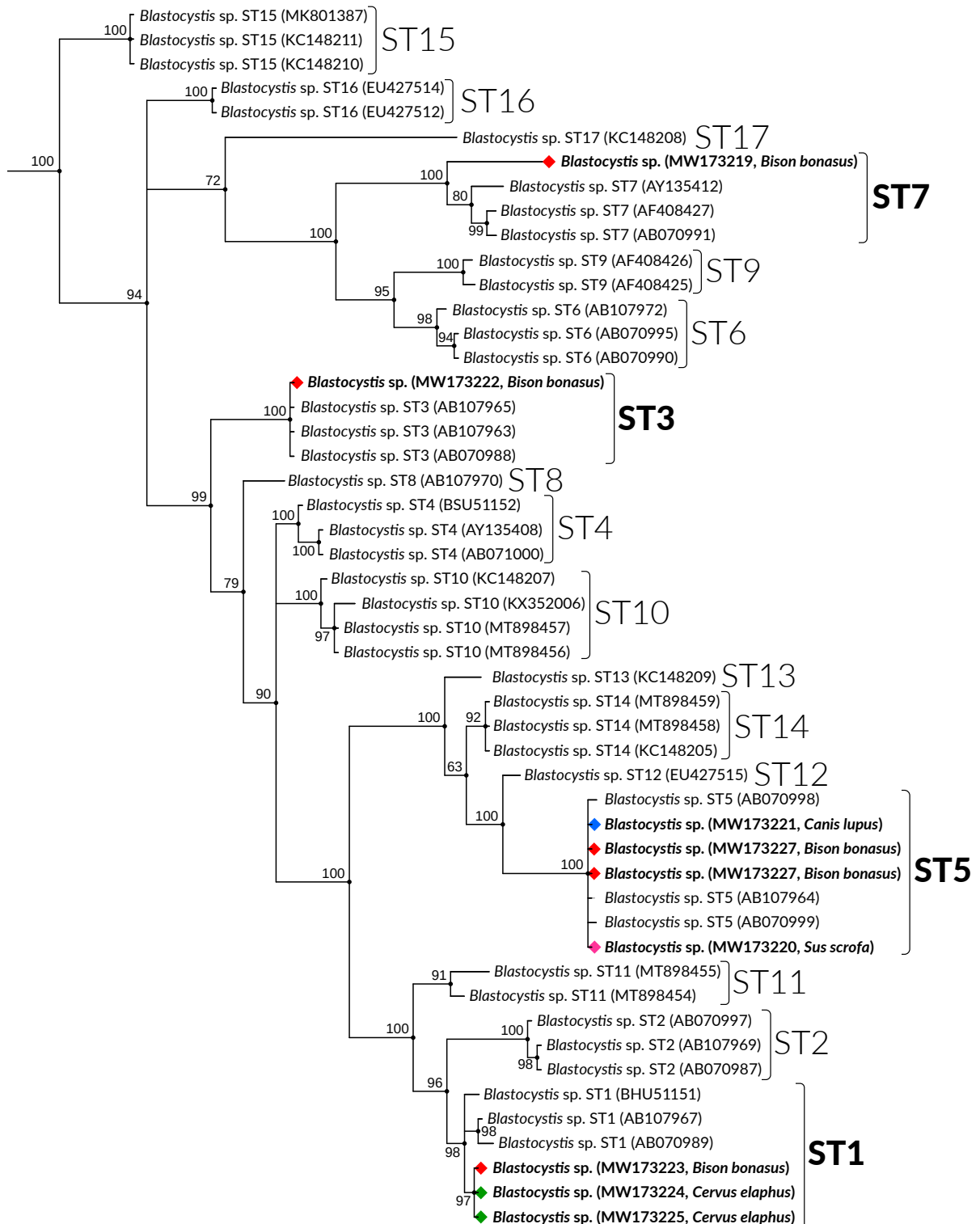
W 3 z 3 prób stwierdzono obecność *Blastocystis* sp. Uzyskana sekwencja odpowiada subtypowi ST4. Jest to pierwszy genotyp uzyskany u tego gatunku w Polsce.

#### IV.4.2.1. WYSTĘPOWANIE I RÓŻNORODNOŚĆ *BLASTOCYSTITIS* U SSAKÓW EUROPEJSKICH

– PRZYKŁAD BIAŁOWIESKIEGO PARKU NARODOWEGO (BPN)

Rozpoznano *Blastocystis* w 9 próbkach kału: wilk szary – 1 próbka (subtyp ST5), dzik – 1 próbka (subtyp ST5), jelen – 2 próbki (subtyp ST1) i 5 próbek u żubra (subtypy ST1, ST3, ST5, ST7) [180].

Ograniczona ilość zbadanych gatunków i pochodzących od nich prób kału nie pozwala na uzyskanie wyczerpujących danych o występowaniu *Blastocystis* u zwierząt BPN. Badania powinny być kontynuowane.



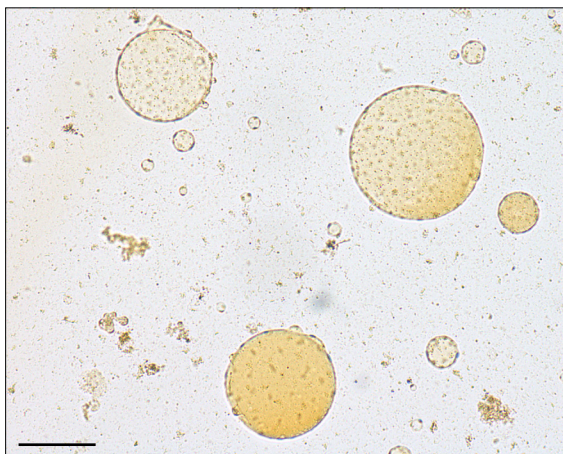
**Rysunek 12. Analiza filogenetyczna *Blastocystis* stwierdzonych u zwierząt z terenu Białowieżskiego Parku Narodowego**

Drzewo zbudowane w oparciu o fragment sekwencji genu rRNA małej podjednostki rybosomu (SSU-rDNA) za pomocą wnioskowania bayesowskiego z użyciem oprogramowania MrBayes. Liczby obok węzłów wskazują prawdopodobieństwo a posteriori.

Źródło: [180].

#### IV.4.2.2. PIES JAKO POTENCJALNY REZERWUAR *BLASTOCYSTIS* – OPIS PRZYPADKU

W próbkach kału pochodzących od jednego psa oraz jego opiekunów, zamieszkałych w Gdyni wykryto formy wakuolarne *Blastocystis* (Zdjęcie 7). Nie wykryto, natomiast, *Blastocystis* u żadnego z psów pochodzących z hotelu dla zwierząt.

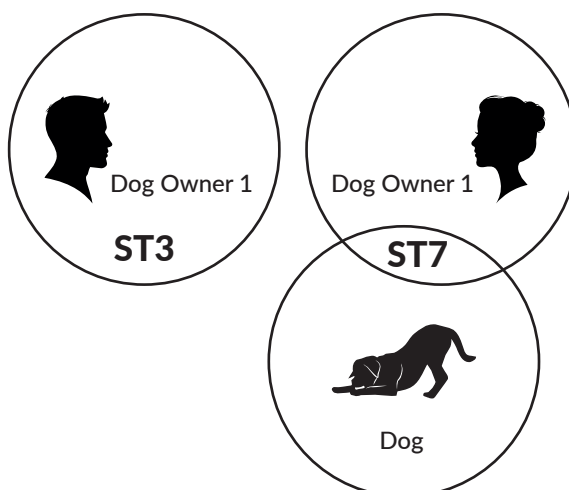


Zdjęcie 7. Formy wakuolarne *Blastocystis* wykryte u Opiekuna 1

Preparat bezpośredni, płyn Lugola. Skala: 100  $\mu\text{m}$ .

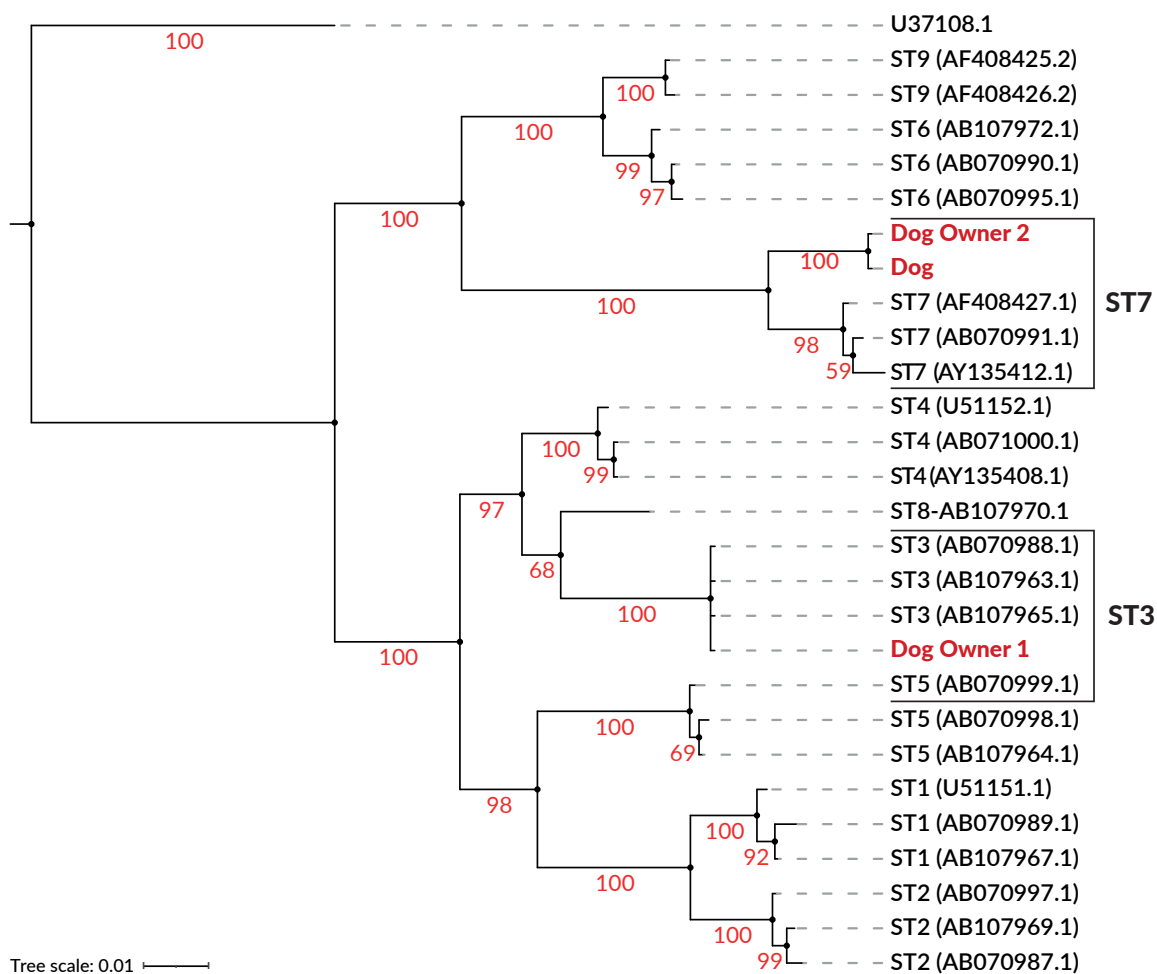
Źródło: [71].

Na podstawie analizy filogenetycznej zidentyfikowano subtyp ST3 u jednego z opiekunów, subtyp ST7 u drugiego opiekuna oraz u psa (Rysunki 12–13).



Rysunek 13. Subtypy *Blastocystis* wykryte u psa i jego właścicieli

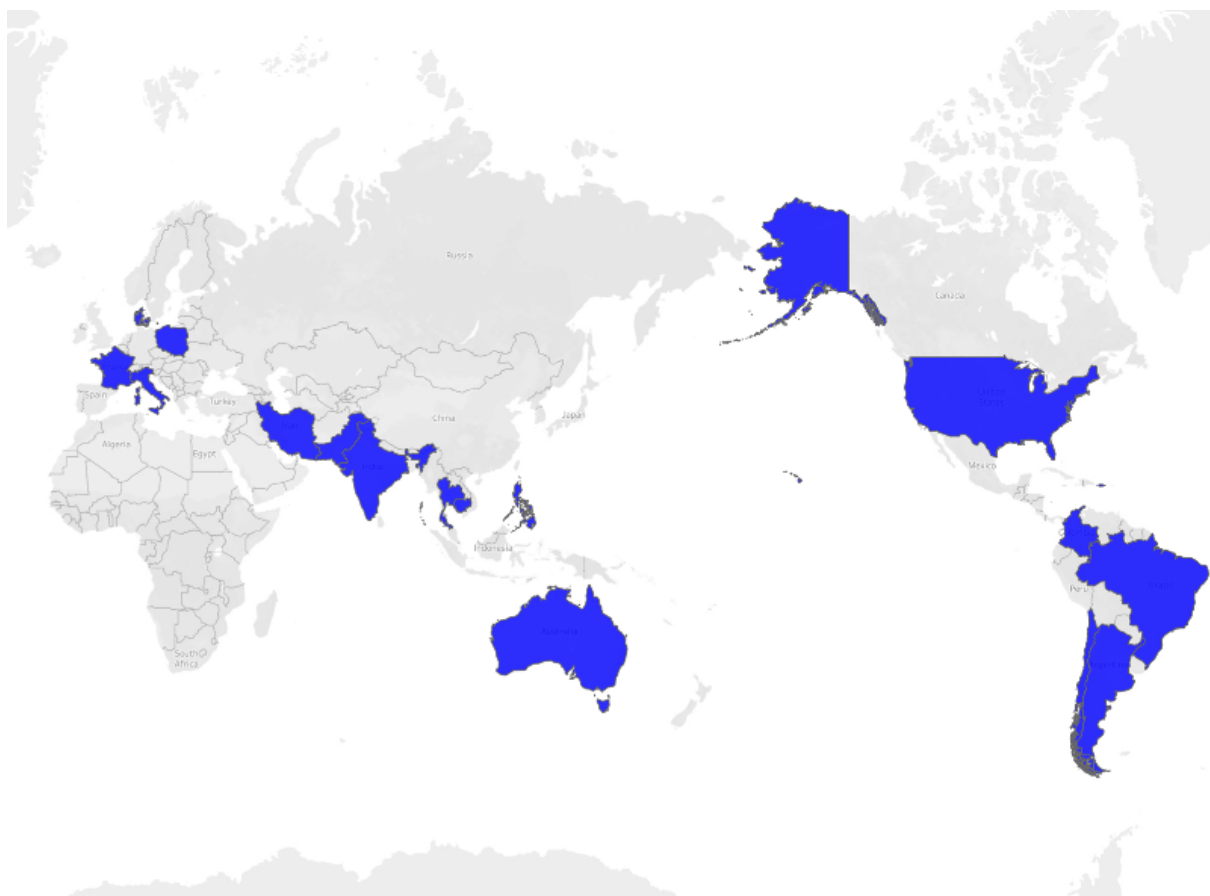
Źródło: [71].



**Rysunek 14. Analiza filogenetyczna *Blastocystis* stwierdzonych u psa i jego opiekunów**

Drzewo zbudowane w oparciu o fragment sekwencji małej podjednostki rRNA (SSU rDNA) za pomocą wnioskowania bayesowskiego z użyciem oprogramowania MrBayes. Liczby obok węzłów wskazują prawdopodobieństwo a posteriori.

Źródło: [71].



Mapa 4. Kraje, w których wykryto *Blastocystis* u psów

Źródło: [71].

#### IV.4.3 PODOBIENSTWO STRUKTURY SUBTYPÓW *BLASTOCYSTIS* CZŁOWIEKA, INNYCH SSAKÓW I PTAKÓW

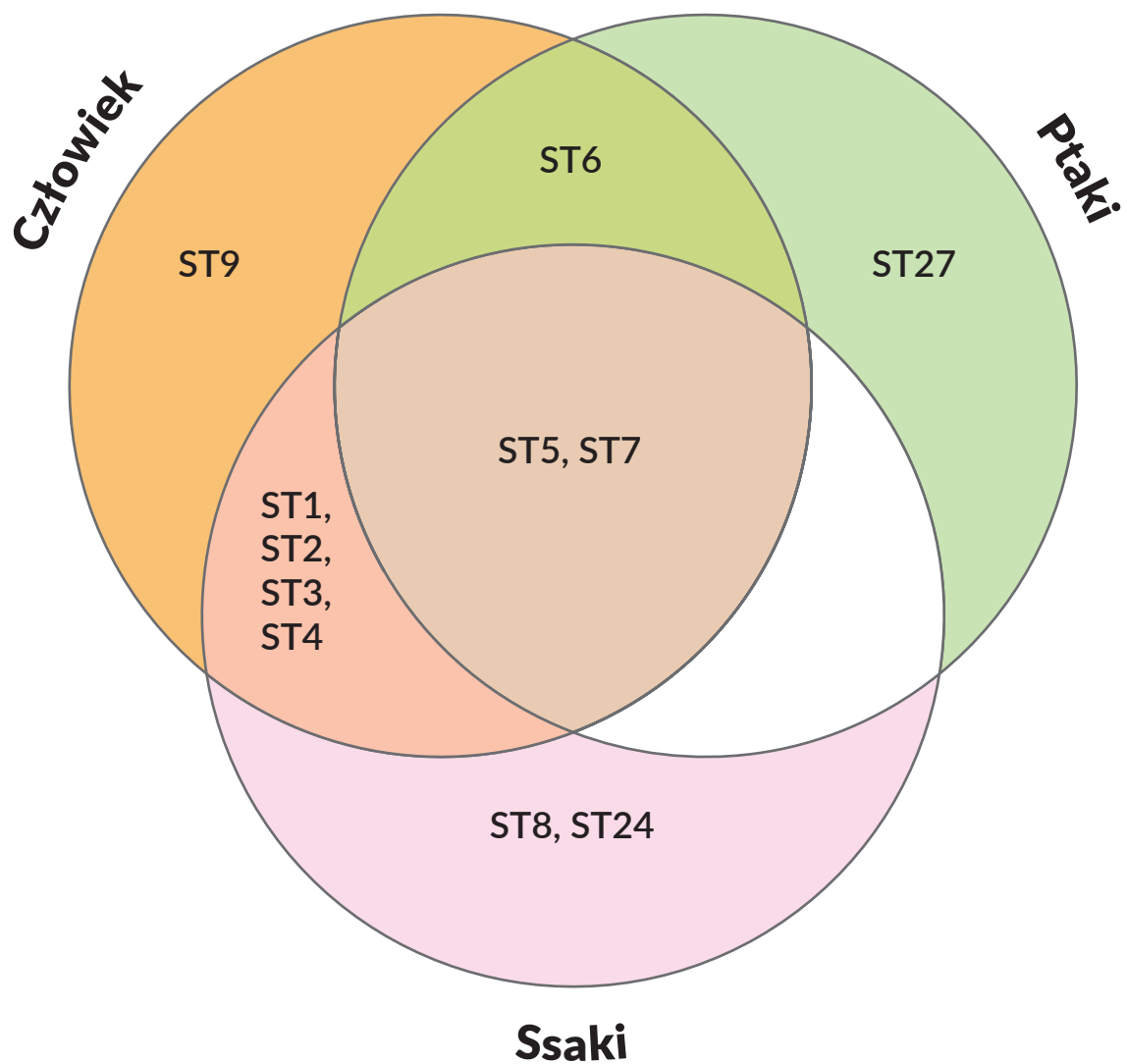
Ze wszystkich 11 subtypów stwierdzonych u człowieka i zwierząt stałocieplnych najczęściej (po 8 subtypów) stwierdzono u człowieka i innych ssaków, a najmniej (4 subtypy) – u ptaków (Rysunek 15). Niezależnie od użytego wskaźnika największe podobieństwo faunistyczne wykazują następujące grupy żywicieli: „Ssaki inne niż człowiek” i „Człowiek”. Najmniejsze podobieństwo faunistyczne wykazują grupy żywicieli „Ssaki inne niż człowiek” i „Ptaki” (Tabela 6).

Możemy przypuścić, że wysokie podobieństwo faunistyczne przekłada się na wysoki potencjał zoonotyczny. Możemy zatem stwierdzić, że zoonotyczny potencjał ssaków jest większy niż zoonotyczny potencjał ptaków.

**Tabela 6. Wskaźniki podobieństwa faunistycznego subtypów *Blastocystis* występujących u różnych grup żywicieli**

	$I_{CDS}$	$I_J$	$I_K$
<b>Ssaki inne niż człowiek / Człowiek</b>	0,75	0,60	1,5
<b>Ptaki / Człowiek</b>	0,50	0,33	0,5
<b>Ssaki inne niż człowiek / Ptaki</b>	0,33	0,20	0,25

$I_{CDS}$  – wskaźnik Czekanowskiego-Dice’a-Sørensen;  $I_J$  – wskaźnik Jaccarda;  $I_K$  – wskaźnik Kulczyńskiego.



Rysunek 15. Koła Eulera ilustrujące podobieństwo struktury subtypów *Blastocystis* człowieka, innych ssaków i ptaków

Źródło: opracowanie własne.



## V. Dyskusja

### V.1. OPISANE SUBTYPY *BLASTOCYSTIS*

W Polsce różne subtypy *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis* wykryliśmy u ssaków (w tym u ludzi) oraz u ptaków. Do tej pory, w literaturze opisano 32 subtypy *Blastocystis* (ST1–ST32) – pasożytów ssaków i ptaków. Według Stensvold i Clark subtypy ST18, ST19, ST20 i ST22 w rzeczywistości nie są odrębnymi subtypami, a tylko artefaktami reakcji PCR wariantami już wcześniej opisanych subtypów [212]. Dlatego rzeczywista liczba znanych subtypów wynosi 28.

Dotychczas w Polsce opisywano *Blastocystis* głównie u ludzi. Do 2012 roku brak jest w polskiej literaturze informacji na temat różnicowania subtypów *Blastocystis*. Pierwotniak ten był wykrywany u ludzi od lat 50 XX wieku [41–44,51,55,65,193,213–220].

### V.2. *BLASTOCYSTIS* U LUDZI

Do tej pory w Polsce, uwzględniając nasze badania, stwierdzono u ludzi obecność ośmiu subtypów: ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6, ST7, ST9.

#### SUBTYPY ST1–ST4

Pierwszym autorem, który opisał subtypy u ludzi w Polsce był Kotłowski, który na podstawie przebadania 1490 próbek wykrył subtypy ST1, ST2, ST3 i ST4 [54]. W 2015 roku Bednarska opisała ST3 u ludzi powracających z Indonezji [205].

#### SUBTYP ST4

Uważa się [221], że subtyp ST4 jest odrębnym gatunkiem *Blastocystis ratti*. Jest to zoonotyczny gatunek, charakterystyczny dla gryzoni. Dotychczas w Polsce subtyp ST4 nie był rejestrowany u zwierząt – nasze odnotowanie jest pierwsze. My wykryliśmy subtyp ST4 u człowieka i u szczurów laboratoryjnych. **Zwraca uwagę fakt, że u ludzi i u szczurów wykryliśmy różne allele tego subtypu. Warto kontynuować badania, żeby zrozumieć czy człowiek i gryzonie są rezerwuarami tego subtypu dla siebie nawzajem.**

#### SUBTYP ST5

Subtyp ST5 u ludzi w Polsce odnotowuje się po raz pierwszy (niniejsza praca).

#### SUBTYPY ST6

Wcześniej w polskiej literaturze nie było informacji o ST6 u ludzi, nasza publikacja [62] jest pierwszym odnotowaniem tego subtypu u ludzi w Polsce.

#### SUBTYP ST7

Subtyp ST7, stwierdzony przez nas u ludzi (niniejsza praca) był wcześniej opisany u ludzi w Polsce przez Lepeczyńska i wsp. [200].

#### SUBTYP ST9

Subtyp ST9 u ludzi w Polsce odnotowuje się po raz pierwszy (niniejsza praca).

### V.3. BLASTOCYSTIS U ZWIERZĄT

Do niedawna nie było żadnej informacji o występowaniu *Blastocystis* u zwierząt w Polsce. Za pierwszą informację możemy uznać doniesienie na temat wykrycia subtypu ST3 u myszarki leśnej *Apodemus flavicollis* [56] oraz o wykryciu *Blastocystis* sp. u kur z południa Polski [57].

Ponieważ pierwsza wymieniona wyżej praca nie była poświęcona badaniom w Polsce, a druga publikacja była opublikowana w mało dostępnych materiałach konferencyjnych, istniało przekonanie o braku jakiegokolwiek informacji o występowaniu *Blastocystis* u zwierząt w Polsce. Słodkowicz-Kowalska i zespół, wprawdzie, wykryli *Blastocystis* u przewodach pokarmowych słodkowodnych małży, ale były to badania środowiskowe<sup>8</sup>, a małże były bioindykatorami zanieczyszczenia wód fekaliami.

Prace naszego zespołu były, w gruncie rzeczy, pierwszymi w Polsce pracami poświęconymi występowaniu i różnorodności *Blastocystis* u zwierząt w Polsce [40,63,68,71,202,204].

*Blastocystis* został przez nas wykryty wtedy u żółwia oraz u kur, jeży, psa, jak również u zwierząt z Wrocławskiego Zoo. W kolejnych latach oprócz naszych prac

---

<sup>8</sup> Warto to wspomnieć też o wykryciu cyst *Blastocystis* w produktach spożywczych w Polsce [279] oraz wodach zbiorników wodnych w województwie zachodniopomorskim [280].

ukazały się też prace zespołu Rudzińskiej [70,74] poświęcone *Blastocystis* u świń (pierwsze stwierdzenie) oraz u zwierząt Gdańskiego Zoo.

U drobiu (kury i indyki) wykryliśmy niecharakterystyczny dla ptaków subtyp ST5. Uważamy, że obecność tego subtypu u drobiu była incydentalna i związana z prowadzeniem w tym samym miejscu hodowli świń. Po usunięciu kontaktu ze świniami subtyp ST5 przestał pojawiać się u drobiu w badanej populacji.

Prowadzone przez nas badania na terenie Białowieskiego Parku Narodowego są pierwszymi tego rodzaju badaniami dzikich zwierząt w ich naturalnym środowisku. Wszystkie subtypy *Blastocystis* wykryte u żubrów, jeleni i wilków należały do subtypów zoonotycznych – występują również u ludzi [180].

### V.3.1. SUBTYPY ZOONOTYCZNE, ENZOTYCZNE I ANTROPONOTYCZNE *BLASTOCYSTIS*

Różne subtypy *Blastocystis* wykazują różną specyficzność względem żywicieli. Subtypy ST1–ST9 i ST12 (subtypy zoonotyczne) wykrywane są u zwierząt i ludzi, z czego najczęstszymi u człowieka są subtypy ST1–ST4. Subtypy ST10–ST11, ST13–ST17, ST21, ST23–ST32 (subtypy enzotyczne) wykrywane są wyłącznie u zwierząt [222,223].

W chwili obecnej nie znamy subtypu antroponotycznego, czyli wykrywanego wyłącznie u ludzi; do niedawna za taki uważało się subtyp ST9. Kilka lat temu wykryto po raz pierwszy subtyp ST9 u żywiciela innego niż człowiek – u lemura katta [224].

W naszych badaniach z pośród 8 subtypów wykrytych u człowieka w Polsce (czyli ST1–ST7, ST9) większość subtypów możemy uznać za subtypy zoonotyczne. Tylko jeden subtyp ST9 do tej pory w Polsce wykryty był tylko u człowieka, możemy umownie postrzegać ten subtyp jako *de facto* subtyp antroponotyczny w Polsce. Dalsze badania zweryfikują nasze przypuszczenie.

Na świecie u bydła wykryto zarówno zoonotyczne subtypy (ST1–ST7, ST12) jak i enzotyczne (ST10, ST14, ST17, ST21, ST23–ST26). Podobnie, u małych przeżuwaczy (owcy i kozy) również wykryto zoonotyczne (ST1, ST3, ST4, ST5, ST7) oraz enzotyczne (ST10, ST12, ST14) subtypy [223]. Pośród przeżuwaczy badanych przez nas zoonotyczne subtypy występowały u żubrów (ST1, ST3, ST5, ST7) i bydła domowego (ST7), natomiast enzotyczny subtyp ST24 był wykryty tylko u kóz i owiec. U świń i dzików wykryliśmy wyłącznie zoonotyczny subtyp ST5, natomiast na

świecie u tych żywicieli odnotowywane zarówno zoonotyczne (ST1–ST5, ST7) jak i enzootyczne (ST10 i ST15) subtypy [223].

#### V.3.2. SUBTYPY *BLASTOCYSTIS* WYKRYWANE U ZWIERZĄT (POLSKA VS ŚWIAT)

Nasze badania wykazały, że na terenie Polski wśród ludzi i zwierząt stałocięplnych występuje duże zróżnicowanie subtypowe *Blastocystis*. W tabeli 7 podsumowane są dane o stwierdzonych subtypach *Blastocystis* u zwierząt na świecie. Pismem pogrubionym zaznaczono subtypy, które występują też w Polsce.

Zatem wydaje się zasadnym stwierdzenie, że zarówno zwierzęta jak i człowiek mogą stanowić rezerwuar tego pierwotniaka w obrębie subtypów ST1–ST8. Jednocześnie potwierdza to zoonotyczny potencjał *Blastocystis* i możliwość transmisji międzygatunkowej.

Tabela 7. Występowanie subtypów *Blastosystis* u różnych gatunków żywicieli na świecie

Subtyp	Kraj	Gatunek żywiciela	Referencje
<b>ST1</b>	Australia	słoń azjatycki, żyrafa, kuok, wombat włochaty, zachodni kangur szarych, świnia, szympan, goryl, langur wietnamski	[225–227]
	Argentyna	człowiek	[227]
	Azja	bydło domowe, konie, kozy, psy, koty, kury i kaczki	[228].
	Brazylia	świnie, człowiek	[229]
	Chiny	makak rhesus, małpa złota, małpade brazza, pawian hymandryas, wielbłąd, człowiek, świnia, owca, koza, jelenń wschodni, pies, lis polarny	[85,230–232]
	Ekwador	człowiek	[227]
	Filipiny	małpa, ludzie, świnia	[191]
	Francja	lemur katta, saki białolica, tamarina cesarski, koczkodan górski, koczkodan sowiogłowi, mandryla barwnolica	[233]
	Ghana	człowiek	[234]
	Hiszpania	czarna świnia iberyjska	[235]
	Indonezja	ludzie	[236]
	Indie	pies	[237]
	Iran	kot, szczur brązowy	[238,239]
	Japonia	ludzie, kury	[185]
	Kolumbia	człowiek, bydło domowe	[227,240,241]
	Libia	wielbłąd	[56].
	Meksyk	człowiek	[242]
	Panama	człowiek	[243]
	Tajlandia	człowiek, świnia, koń	[228,244,245]
	UK	koza karłowata, nornica wodna, goryl nizinny, gibbon jawajski, bydło domowe, człowiek, siamang	[56,246,247]
USA	ludzie, psy	[185,248]	
Włochy	człowiek	[249]	
<b>ST2</b>	Argentyna	człowiek	[227]
	Australia	kura, kazuar, orangutan, goryl	[226]
	Boliwia	człowiek	[227]
	Brazylia	wyjec rudy, czepiak belzebub, człowiek	[227,250]
	Chiny	lemur katta, szympan, makak rebus, człowiek	[85,230–232,251]
	Filipiny	świnia, pies, kura, kaczka, orangutan, małpy	[252–254];
	Francja	goryl nizinny, szympan, gibbon białoreki, diana ghańska, saki białolica, lemur katta, lemur rudy	[233]
	Ghana	człowiek	[234]
	Hiszpania	koczkodan sowiogłowy, goryl,	[185]
	Indonezja	świnia, człowiek	[255]
	Iran	pies	[239]
	Japonia	człowiek	[185]

	Kolumbia	człowiek	[227,241]	
	Kambo- dża	pies	[256]	
	Kolumbia	człowiek	[185,240]	
	Malezja	makak	[228]	
		człowiek	[242]	
	UK	ryś, wiewiórka ruda, goryl nizinny, gibbon jawajski, szympan, siamang wielki, gibbon mullera	[238,247]	
	Tajlandia	człowiek	[245]	
	Włochy	człowiek	[249]	
<b>ST3</b>	Argen- tyna	człowiek	[227]	
	Belgia	szynszyla	[56]	
	Boliwia	człowiek	[227]	
	Brazylia	wyjec rudy, mandryl, pawian płaszczowy, pawian gwinejski, człowiek	[227,232,250]	
	Chiny	makak rezus, mandryl, pawian płaszczowy, człowiek, świnia, bydło domowe, koza, jeleni wschodni, jelenot azjatycki, lis polarny,	[85,230,231]	
	Dania	świnia, pies	[247]	
	Ekwador	człowiek	[227]	
	Filipiny	pies, kura, małpy, człowiek	[191,252,257]	
	Francja	siamang, makak orientalny, kocz- kodan górski, koczokodan nadobny, tamaryna cesarska, wilk szary, nie- dźwiedź polarny, oryks szablrogi	[233]	
	Ghana	człowiek	[234]	
	Hiszpania	czarna świnia iberyjska	[235]	
	Indonezja	człowiek	[236]	
	Japonia	człowiek, świnia	[21,258]	
	Kolumbia	człowiek	[227,241]	
	Malezja	koza, karaluch, pies, kaczka, łabędź, kura	[259,260]	
	Meksyk	człowiek	[242]	
	Iran	szczur brązowy, kot, pies	[239]	
	Kolumbia	człowiek, dydelf czarnouchy	[240]	
	Libia	wielbłąd, koza	[56]	
	Panama	człowiek	[243]	
	Peru	człowiek	[227]	
	Tajlandia	świnie, pies, makak, orangutan, człowiek, świnia	[191,228,244,245,261,262]	
	UK	goryl nizinny, gibbon jawajski, mysz leśna, żyrafa, człowiek, szympan, orangutan, goryl, gibbon żółtolicy, wełniak, koczokodan diany, makak berberyjski, makak niedźwiedzi, uistiti białoucha	[56,238,247]	
	USA	kot, bydło domowe	[81,248]	
	Włochy	człowiek	[249]	
	<b>ST4</b>	Australia	człowiek, szczur, struś czerwono- skóry, jeleni, szympan, kangur ol- brzymi, kangur rudy	[225,226,231]
		Chiny	mara patagońska, człowiek, lis po- larny, pies, jeleni wschodni, koza, bydło domowe,	[85,231,232,251]
Dania		lemur katta	[247]	

	Filipiny	pies, człowiek	[191,254]	
	Francja	lemur rudy, wari czarno-biały, lemur niebieskooki,	[233]	
	Indonezja	szczur	[236]	
	Iran	Szczur brązowy, kot, pies	[239]	
	Kolumbia	wyjec	[240]	
	Malezja	Szczur, pies, koza	[228,263]	
	UK	kuna leśna, żbik szkocki, łoś euroazjatycki, jelen szlachetny, wieńwiorka ruda, nornica wodna, człowiek, wełniak,	[238,247,264]	
	USA	człowiek, bydło domowe	[81,185]	
	Włochy	człowiek	[249]	
<b>ST5</b>	Australia	świnia	[225,226]	
	Boliwia	człowiek	[227]	
	Brazylia	ocelot tygrysi, mazama szara, struś czerwonoskóry	[84,250]	
	Chiny	sasebi przylądkowy, oryx południowy, struś, czerwonoskóry, surykatka szara, langur wietnamski, człowiek, świnia, bydło domowe, owca, koza, jelen wschodni	[85,230–232,251]	
	Dania	szympan, gibbon, owca, bydło domowe	[247]	
	Filipiny	świnia, pies	[252,254]	
	Francja	szympan, goryl nizinny, orangutan, lemur rudy	[233]	
	Hiszpania	czarna świnia iberyjska, dzik euroazjatycki	[235]	
	Indonezja	świnia	[228,236]	
	Indie	pies	[237]	
	Kambodża	świnia	[265]	
	Libia	wielbłąd, bydło domowe	[56]	
	Malezja	szczur	[266]	
	Słowacja	świnia	[267]	
	Tajlandia	świnia, pies	[244,261,268,269]	
	Wietnam	świnia	[56]	
	UK	dzik, dzikan rzeczny, goryl nizinny, gibbon jawajski, sarna europejska, bydło domowe, świnia, szympan	[56,246,247,264]	
	USA	świnia, bydło domowe	[81,185]	
	<b>ST6</b>	Argentyna	człowiek	[227]
		Brazylia	perlica zwyczajna, przepiórka zwyczajna, bażant zwyczajny	[84]
Chiny		człowiek	[85,231,232]	
Filipiny		kura	[228]	
Indie		pies	[237]	
Kolumbia		wróbel zwyczajny, tangarka niebieska, ziarnojadek wielkodzioby, szfranka krasnoczuba, jaskółka krasnoszyja, człowiek	[227,240]	
Malezja		koza, struś czerwonoskóry, kura	[228,259]	
USA		kura	[185]	
<b>ST7</b>	Angola	człowiek	[270]	

	Australia	człowiek	[226]
	Brazylia	cyranka zwyczajna, gęś łabędzionaśosa, kaczka krzyżówka, perlica zwyczajna, piźmówka, przepiórka zwyczajna, bażant zwyczajny człowiek	[84,227]
	Chiny	paw indyjski, lis polarny, człowiek	[231,232,251]
	Francja	lemur rudy, wari czarno-biały,	[233]
	Hiszpania	lis, żeneta zwyczajna	[270]
	Iran	pies	[239]
	Indonezja	kura, świnia	[228,236]
	Kambo-dża	człowiek	[270]
	Kolumbia	człowiek	[227]
	Libia	koza	[56]
	Malezja	kaczka, kura, koza	[228]
	Turcja	kura	[271]
<b>ST8</b>	Australia	człowiek	[272]
	Brazylia	wyjec czarny, wyjec rudy, czepiak czarny, wełniak, kapibara człowiek	[227,250]
	Dania	lemur katta	[247]
	Ekwador	wyjec	[273]
	Francja	lemur katta	[233]
	Iran	pies	[239]
	Malezja	koza, kura, pies	[228]
	UK	gibon jawajski, człowiek, siamang, gibon białoreki, wełniak	[228,247]
<b>ST9</b>	Chiny	lemur katta	[224]
	Iran	człowiek	[274]
ST10	Brazylia	cyranka zwyczajna, struś czerwonoskóry	[84]
	Chiny	świnia, bydło domowe, owca, koza, renifer, jelen wschodni,	[85,231]
	Turcja	bydło domowe, owce	[271]
	USA	bydło domowe	[81,275]
ST11	Australia	słoń	[225]
	Belgia	słoń	[225]
	Holandia	słoń	[225]
ST12	Australia	żyrafa	[225]
	Belgia	żyrafa	[225]
	Boliwia	człowiek	[227]
	Chiny	człowiek	[232]
	Holandia	żyrafa	[225]
ST13	Australia	kuoka krótkoogonowa	[225]
	Chiny	koza, jelen wschodni, nahur górski	[231,276]
ST14	Brazylia	nierozłączka czarnolica, piźmówka	[84]
	Chiny	bydło domowe, owca, koza, jelen wschodni, leopard	[85,231,276]
	Hiszpania	lis, tchórz zwyczajny,	[270]
	Senegal	człowiek	[277]
	Trcja	wół domowy	[271]
	USA	bydło domowe	[81,275]
ST15	Libia	wielbłąd	[56]
	UK	owce	[56]
ST16	Libia	kangur czerwony	[86]
ST17	Chiny	jak, alpaka, eland zwyczajny, takin, karczoch	[230]



	Libia	gundia	[56]
	USA	bydło domowe	[81]
ST18, ST19, ST20	Nie istnieją [212]		
ST21	Chiny	kob śniady	[81]
	USA	bydło domowe	[81]
ST22	Nie istnieje [212]		
ST23	USA	bydło domowe	[86]
<b>ST24</b>	USA	bydło domowe, struś czerwono- skóry	[81,84,86]
ST25	USA	bydło domowe	[81,86]
ST26	USA	bydło domowe	[81,86]
<b>ST27</b>	Brazylia	cyranka zwyczajna, paw indyjski	[84]
ST28	Brazylia	cyranka zwyczajna, paw indyjski	[84]
ST29	Brazylia	kura	[223]
ST30	USA	mulak białogonowy	[82]
ST31	USA	mulak białogonowy	[82]
ST32	Kolumbia	bydło domowe, koza	[223]

## VI. Podsumowanie

1. Stwierdzono występowanie *Blastocystis* spp. u człowieka, 20 gatunków innych ssaków oraz u 13 gatunków ptaków.
2. Po raz pierwszy w Polsce stwierdzono występowanie *Blastocystis* u 18 gatunków ssaków (subtypy ST1–ST5, ST7, ST8, ST24) i 12 gatunków ptaków (ST5–ST7, ST27) oraz określono ich subtypy.
4. Po raz pierwszy w Polsce stwierdzono występowanie 17 alleli genu kodującego rRNA małej podjednostki rybosomu, w tym 7 nowych alleli. Są to pierwsze w Polsce badania dotyczące różnorodności alleli *Blastocystis*.

## VII. Wnioski

1. W Polsce stwierdzamy dużą różnorodność subtypów *Blastocystis* cf. *Blastocystis hominis* występujących u ludzi (8 subtypów) i zwierząt stałocieplnych (10 subtypów). Na podstawie naszych badań łącznie wykryto 11 subtypów, z uwzględnieniem danych literaturowych liczba znanych w Polsce subtypów *Blasticystis* wynosi 12.
2. Wszystkie stwierdzone w Polsce subtypy wcześniej były opisywane w innych regionach świata.
3. Największe podobieństwo faunistyczne wykazują struktury subtypów człowieka i innych ssaków (wskaźnik Czekanowskiego-Dice'a-Sørensen  $(I_{CDS})$  wynosi 0,75; wskaźnik Jaccarda  $(I_J)$  – 0,60; wskaźnik Kulczyńskiego  $(I_K)$  – 1,5).
4. Najmniejsze podobieństwo faunistyczne wykazują struktury subtypów ptaków i ssaków z wyłączeniem człowieka ( $I_{CDS} = 0,33$ ;  $I_J = 0,20$ ;  $I_K = 0,25$ ).
5. Większość wykrytych subtypów (7 z 11) stanowią subtypy zoonotyczne.
6. Należy spodziewać się w przyszłości wykrycia w Polsce również innych subtypów, niż stwierdzone dotychczas

## VIII. Piśmiennictwo

1. Stensvold C.R., Lewis H.C., Hammerum A.M., Porsbo L.J., Nielsen S.S., Olsen K.E.P., et al. 2009. Blastocystis: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiology and Infection* 137(11): 1655–63. doi: 10.1017/S0950268809002672.
2. Zierdt C.H. 1991. Blastocystis hominis--past and future. *Clinical Microbiology Reviews* 4(1): 61–79. doi: 10.1128/cmr.4.1.61.updated.
3. Alexeieff A. 1911. Sur la nature des formations dites 'kystes de Trichomonas intestinalis'. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie* 2: 296–8.
4. Brumpt E. 1912. Côleite à Tetramitus Mesnili (Wenyon 1910) et Côleite à Trichomonas intestinalis Leuckart 1879. Blastocystis hominis n. sp. et formes voisines. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 5: 725–30.
5. Anonymous. 1999. International code of zoological nomenclature. 4th ed. xxix+306.
6. Micheletti E. 1932. Contribution to the study of 'Blastocystis jalinus' (Perroncito). *Annali di Medicina Navale e Coloniale* 38(fasc.1/2): 9–23.
7. Ciferri R., Redaelli P. 1938. A new hypothesis on the nature of Blastocystis. *Mycopathologia* 1(1): 3–6. doi: 10.1007/bf00440366.
8. Zierdt C.H., Rude W.S., Bull B.S. 1967. Protozoan characteristics of Blastocystis hominis. *American Journal of Clinical Pathology* 48(5): 495–501.
9. Zierdt C.H. 1978. Blastocystis hominis, an intestinal protozoan parasite of man. *Public Health Laboratory* 36: 147–61.
10. Zierdt C.H. 1988. Blastocystis hominis, a long-misunderstood intestinal parasite. *Parasitology Today (Personal ed)* 4(1): 15–7. doi: 10.1016/0169-4758(88)90049-x.
11. Johnson A.M., Thanou A., Boreham P.F.L., Baverstock P.R. 1989. Blastocystis hominis: Phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Experimental Parasitology* 68(3): 283–8. doi: 10.1016/0014-4894(89)90110-0.
12. Stenzel D.J., Boreham P.F.L. 1996. Blastocystis hominis revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 9(4): 563–84.

13. Jiang J.B., He J.G. 1993. Taxonomic status of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Today* 9(1): 2–3. doi: 10.1016/0169-4758(93)90148-9.
14. Boreham P.F., Stenzel D.J. 1993. The current status of *blastocystis hominis*. *Parasitology today (Personal ed)* 9(7): 251. doi: 10.1016/0169-4758(93)90068-q.
15. Corliss J.O. 1994. An interim utilitarian ('user-friendly') hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica* 33: 1–51.
16. Hollebeke N.L., Mayberry L.F. 1994. Taxonomic uncertainty and *Blastocystis* (Protista:Sarcodina). *Parasitology today (Personal ed)* 10(2): 64. doi: 10.1016/0169-4758(94)90395-6.
17. Stenzel D.J., Boreham P.F.L. 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 9(4): 563–84.
18. Nakamura Y., Hashimoto T., Yoshikawa H., Kamaishi T., Nakamura F., Okamoto K.I., et al. 1996. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* that contains cytochrome-free mitochondria, inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1 $\alpha$ . *Molecular and Biochemical Parasitology* 77(2): 241–5. doi: 10.1016/0166-6851(96)02600-x.
19. Ho L.C., Armugam A., Jeyaseelan K., Yap E.H., Singh M. 2000. *Blastocystis* elongation factor-1  $\alpha$ : genomic organization, taxonomy and phylogenetic relationships. *Parasitology* 121: 135–44. doi: 10.1017/s0031182099006113.
20. Silberman J.D., Sogin M.L., Leipe D.D., Clark C.G. 1996. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 380(6573): 398–398. doi: 10.1038/380398a0.
21. Arisue N., Hashimoto T., Yoshikawa H. 2003. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology* 126(1): 1–9. doi: 10.1017/s0031182002002640.
22. Knoll A.H. 1994. Proterozoic and early Cambrian protists: Evidence for accelerating evolutionary tempo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(15): 6743–50. doi: 10.1073/pnas.91.15.6743.
23. Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73(3): 203–66. doi: 10.1111/j.1469-185x.1998.tb00030.x.

24. Cavalier-Smith T. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. Vol. 57, Microbiological Reviews. 953–994 p.
25. Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., et al. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology* 52(5): 399–451. doi: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
26. Adl S.M., Simpson A.G.B., Lane C.E., Lukeš J., Bass D., Bowser S.S., et al. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59(5): 429–93. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.
27. Adl S.M., Bass D., Lane C.E., Lukeš J., Schoch C.L., Smirnov A., et al. 2019. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66(1): 4–119. doi: 10.1111/jeu.12691.
28. Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., et al. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of protozoology* 27(1): 37–58. doi: 10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x.
29. Belova L.M. 1991. Blastocystis anatis sp. nov. (Rhizopoda, Lobosea) from domestic ducks. *Zoologicheskii zhurnal* 70: 5–10.
30. Bayanov M.G., Kniss V.A., Khabibullin V.F. 2015. Catalog of animals of Bashkortostan. 348 p.
31. Belova L.M. 1992. Blastocystis anseri (Protista, Rhizopoda) from domestic goose. *Parazitologiya* 26(1): 80–2.
32. Belova L.M., Kostenko L.A. 1990. Blastocystis galli sp. n. (Protista: Rhizopoda) from the intestine of domestic hens. *Parazitologiya* 24(2): 164–8.
33. Belova L.M. 1992. World fauna and morphofunctional organization of the blastocysts (Protista, Rhizopoda). *Trudy Zoologicheskogo Instituta* 244: 1–56.
34. Kuczynski M.H. 1914. Untersuchungen an Trichomonaden. *Archiv für Protistenkunde* 33(3): 119–204.
35. Krylov M. V., Belova L.M. 1997. Blastocysts of the primates. *Parazitologiya* 31(4): 341–5.
36. Stensvold C.R., Clark C.G. 2016. Current status of Blastocystis: A personal view. *Parasitology International* 65(6): 763–71. doi: 10.1016/j.parint.2016.05.015.

37. Belova L.M. 1997. Blastocysts agrionernidis sp. n. (Rhizopoda: Lobosea) из среднеазиатской черепахи *Agrionemys horsfieldi*. *Паразитология* 31(3): 269–72.
38. Singh M., Ho L.C., Yap a. L.L., Ng G.C., Tan S.W., Moe K.T., et al. 1996. Axenic culture of reptilian Blastocystis isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitology Research* 82(2): 165–9. doi: 10.1007/s004360050088.
39. Teow W.L., Zaman V., Ng G.C., Chan Y.C., Yap E.H., Howe J., et al. 1991. A Blastocystis species from the sea-snake, *Lapemis hardwickii* (Serpentes: Hydrophiidae). *International Journal for Parasitology* 21(6): 723–6.
40. Sałamatin R., Jańczak D., Rożej-Bielicka W. 2015. The isolation of Blastocystis pythoni Singh et al. 1996 (Stramenopiles) from keeled box turtle, *Cuora mouhotii* (Reptilia: Chelonii). In: Ювілейні читання, присвячені 70-річчю заснування Українського наукового товариства паразитологів та 110-річчю з дня народження академіка НАН України О П Маркевича: Тези доповідей р. 55.
41. Stojałowska W., Moniuszko A. 1955. Pasożyty przewodu pokarmowego dzieci w żłobkach i przedszkolach Lublina. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Sectio D* 10(16): 405–22.
42. Wołyńska M., Soroczan W. 1972. [Blastocystis hominis Brumpt, 1912, (Phycomycetes) in the female genital tract]. *Polski tygodnik lekarski (Warsaw, Poland: 1960)* 27(21): 788–91.
43. Sinski E., Socha J., Świątkowska E., Bezubik B. 1990. Cryptosporidium sp. and Blastocystis hominis in children. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 8(Suppl. no. 2): 695.
44. Siński E., Bukowska J., Czarnogrecka M., Oralewska B., Świątkowska E., Socha J. 1991. Zараżenie Cryptosporidium sp. i Blastocystis hominis u dzieci z objawami gastroenterocolitis. *Wiadomości Lekarskie* 4(5/6): 157-160.
45. Prokopowicz D., Wierzbička I., Kramarz P., Wiercińska-Drapało A. 1995. Blastocystis hominis - nowy patogen jelitowy? *Diagnostyka Laboratoryjna* 31: 229–32.
46. Myjak P., Kur J., Pietkiewicz H., Szostakowska B., Kotłowski A., Nahorski W., et al. 1997. Molecular differentiation of Entamoeba histolytica sensu lato

- amoebae obtained from cultures and clinical samples. p. 34.
47. Grzeszczuk A., Rogowska-Szadkowska D. 1998. Opportunistic infections caused by Protozoa. *Wiadomości parazytologiczne* 44(3): 312.
  48. Kotłowski A., Mirosław B., Mayer L., Badowska-Szalewska E., Piatkowska W., Kilinski T. 1998. Estimation of the frequency of the invasion and accompanying clinical symptoms in *Blastocystis hominis* invasion in selected age and environmental groups. *Wiadomości Parazytologiczne* 44(3): 541.
  49. Wysocka J., Sobotko J., Lipska A. 2001. *Blastocystis hominis*. *Diagnostyka Laboratoryjna* 37(2): 183–9.
  50. Grzeszczuk A. 2005. *Blastocystis hominis*. In: Prokopowicz D, editor. *Zagrożenia oportunistyczne* Białystok: Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko; p. 137–8.
  51. Werner A., Majewska A.C., Kowalska-Słodkiewicz A. 2007. Częstość występowania pasożytów przewodu pokarmowego w wybranych populacjach ludzkich Wielkopolski. *Wiadomości parazytologiczne* 53(Suplement): 128.
  52. Nowak P., Jochymek M. 2007. Występowanie pasożytów jelitowych człowieka w wybranych populacjach na terenie Krakowa w latach 2000–2006 na podstawie badań parazytologicznych kału przeprowadzonych w Laboratorium Parazytologii Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej. *Annals of Parasitology* 53(4): 285–93.
  53. Nowak P., Pietrzyk A., Papier B. 2010. *Blastocystis hominis* – enigmatyczny pierwotniak przewodu pokarmowego człowieka. *Farmacja Krakowska* 13(1): 17–22.
  54. Kotłowski A. 2012. Blastocystoza – próba oceny objawów klinicznych i skuteczności leczenia metronidazolem w przypadkach różnych stopni intensywności inwazji pasożytniczej oraz izolowanych genotypów *Blastocystis* sp. u Polaków powracających z tropiku i nieopuszczających kraju. *Annales Academie Medicae Gedanensis* 42(Suplement 3): 1–85.
  55. Kowalewska B., Rudzińska M., Zarudzka D., Kotłowski A. 2013. Ocena częstości zarażeń pasożytami jelitowymi wśród pacjentów przychodni Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni w okresie ostatnich 30

- lat An evaluation of the intensity of intestinal parasitic infections among patients of Out-patient Division. *Diagnostyka Laboratoryjna* 49(1): 9–15.
56. Alfellani M.A., Taner-Mulla D., Jacob A.S., Imeede C.A., Yoshikawa H., Stensvold C.R., et al. 2013. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 164(4): 497–509. doi: 10.1016/j.protis.2013.05.003.
  57. Bobusia K., Gawęł A. 2014. Epizootiologia zarażeń pierwotniaczych *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* i *Blastocystis* spp. w stadach kur reprodukcyjnych mięsnych oraz indyków rzeźnych. In: Wieliczko A, editor. Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem chorób układu oddechowego Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu; p. 80–2.
  58. Duda A., Kosik-Bogacka D., Lanocha N., Szymański S. 2014. [*Blastocystis hominis*- parasites or commensals?]. *Annales Academiae Medicae Stetinensis* 60(1): 23–8.
  59. Lepczyńska M., Dzika E., Kubiak K., Korycińska J. 2015. The role of *Blastocystis* sp. as an etiology of irritable bowel syndrome. *Polish Annals of Medicine* 23(1): 2–5. doi: 10.1016/j.poamed.2015.04.001.
  60. Lepczyńska M., Chen W.C., Dzika E. 2016. Mysterious chronic urticaria caused by *Blastocystis* spp.? *International Journal of Dermatology* 55(3): 259–66. doi: 10.1111/ijd.13064.
  61. Blaszkowska J., Goralska K. 2016. Clinical cases of parasitoses and fungal infections important from medical point of view. *Ann Parasitol* 62(4): 255–65. doi: 10.17420/ap6204.61.
  62. Salamatin R., Kaczmarek A., Rozej-Bielicka W., Wesolowska W., Mlocicki D., Golab E. 2016. Genotypes of *Blastocystis* isolated from Polish patients: a case of *Blastocystis hominis* sensu lato (subtype 6) infection. In: [12th European Multicolloquium of Parasitology EMOP XII Turku, Finland, July 20–24th 2016]: Abstracts p. P17.15.
  63. Lewicki A., Rozej-Bielicka W., Sałamatin R. 2016. *Blastocystis hominis* s. l. ST6 – parasite of chickens – new zoonotic agent in Poland. *Annals of Parasitology* 62(Supplement): 203.
  64. Korzeniewski K. 2016. Choroby pasożytnicze przewodu pokarmowego w Polsce. *Forum Medycyny Rodzinnej* 10(1): 423–31.



65. Korzeniewski K. 2016. Inwazje pasożytami jelitowymi w środowisku dziecięcym Warszawy. *Family Medicine and Primary Care Review* 18(2): 132–7. doi: 10.5114/fmpcr/61213.
66. Lepczyńska M., Białkowska J., Dzika E., Piskorz-Ogórek K., Korycińska J. 2017. Blastocystis: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* (March): 1–10. doi: 10.1007/s10096-017-2965-0.
67. Kaczmarek A., Gołąb E., Żarnowska-Prymek H., Rawska A., Jańczak D., Lewicki A., et al. 2017. Genetic diversity of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland. *Przegląd epidemiologiczny* 71(4): 539–46.
68. Kaczmarek A., Sałamatın R. 2018. First record of *Blastocystis* cf. *hominis* (Eukaryota: Stramenopiles) in European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) from Poland. In: 14th International Congress of Parasitology – ICOPA 2018 At: EXCO, Daegu, Korea p. P.1-027.
69. Rudzińska M., Kowalewska B., Wąż P., Sikorska K., Szostakowska B. 2019. Blastocystis subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland – A single center study. *Infection, Genetics and Evolution* 75(June): 103926. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103926.
70. Rudzińska M., Kowalewska B., Szostakowska B., Grzybek M., Sikorska K., Świątalska A. 2020. First report on the occurrence and subtypes of *Blastocystis* in pigs in Poland using sequence-tagged-site pcr and barcode region sequencing. *Pathogens* 9(7): 595. doi: 10.3390/pathogens9070595.
71. Kaczmarek A., Rocka A., Wesołowska M., Gołąb E., Sałamatın R. 2020. *Blastocystis* isolates from a dog and their owners presenting with chronic diarrhoea. Dogs as reservoirs of *Blastocystis*: research in Poland and worldwide. *Annals of parasitology* 66(4): 573–9. doi: 10.17420/ap6604.300.
72. Kaczmarek A., Gołąb E., Sałamatın R. 2021. Improved *Blastocystis* spp. detection method using swabs with Amies transport medium and charcoal. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. doi: 10.26444/aaem/142705.
73. Kaczmarek A., Sobociński W., Wesołowska M., Gołąb E., Kołodziej-Sobocińska M., Sałamatın R. 2021. Blastocystis occurrence and subtype diversity in wild European terrestrial mammals – The case of Białowieża

- Primeval Forest (NE Poland). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 16(June): 120–5. doi: 10.1016/j.ijppaw.2021.08.010.
74. Rudzińska M., Kowalewska B., Waleron M., Kalicki M., Sikorska K., Szostakowska B. 2021. Molecular Characterization of Blastocystis from Animals and Their Caregivers at the Gdańsk Zoo (Poland) and the Assessment of Zoonotic Transmission. *Biology* 10(10): 984. doi: 10.3390/biology10100984.
  75. Noël C., Dufernez F., Gerbod D., Edgcomb V.P., Delgado-Viscogliosi P., Ho L.-C., et al. 2005. Molecular Phylogenies of Blastocystis Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species, and Zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology* 43(1): 348–55. doi: 10.1128/jcm.43.1.348-355.2005.
  76. Tasić N., Milenković T., Bujčić V., Zdravković D., Tasić A. 2016. Blastocystis Hominis: a Mysterious and Commonly Disregarded Parasite. *Facta Universitatis, Series: Medicine & Biology* 18(2). doi: 10.22190/fumb161027001t.
  77. Parija S.C., Jeremiah S. 2013. Blastocystis: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical parasitology* 3(1): 17–25. doi: 10.4103/2229-5070.113894.
  78. ZIERDT C.H., SWAN J.C. 1981. Generation Time and Growth Rate of the Human Intestinal Parasite Blastocystis hominis. *The Journal of Protozoology* 28(4): 483–5. doi: 10.1111/j.1550-7408.1981.tb05324.x.
  79. Lanuza M.D., Carbajal J. a., Villar J., Borrás R. 1997. Description of an improved method for Blastocystis hominis culture and axenization. *Parasitology Research* 83(1): 60–3. doi: 10.1007/s004360050209.
  80. Dhurga D.B., Suresh K.G., Tan T.C., Chandramathi S. 2012. Apoptosis in Blastocystis spp. is related to subtype. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106(12): 725–30. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.08.005.
  81. Maloney J.G., Lombard J.E., Urie N.J., Shivley C.B., Santin M. 2019. Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitology research* 118(2): 575–82. doi: 10.1007/s00436-018-6149-3.
  82. Maloney J.G., Jang Y., Molokin A., George N.S., Santin M. 2021. Wide genetic diversity of *Blastocystis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from

- Maryland, USA. *Microorganisms* 9(6). doi: 10.3390/microorganisms9061343.
83. Wawrzyniak I., Poirier P., Viscogliosi E., Dionigia M., Texier C., Delbac F.F., et al. 2013. Blastocystis, an unrecognized parasite: An overview of pathogenesis and diagnosis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 1(5): 167–78. doi: 10.1177/2049936113504754.
  84. Maloney J.G., Molokin A., da Cunha M.J.R., Cury M.C., Santin M. 2020. Blastocystis subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using next generation amplicon sequencing. *Parasite Epidemiology and Control* 9. doi: 10.1016/j.parepi.2020.e00138.
  85. Qi M., Wei Z., Zhang Y., Zhang Q., Li J., Zhang L., et al. 2020. Genetic diversity of Blastocystis in kindergarten children in southern Xinjiang, China. *Parasites & Vectors* 13(1): 15. doi: 10.1186/s13071-020-3890-0.
  86. Hublin J.S.Y., Maloney J.G., Santin M. 2021. Blastocystis in domesticated and wild mammals and birds. *Research in Veterinary Science* 135: 260–82. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.09.031.
  87. Yamada M., Yoshikawa H. 2012. Morphology of Human and Animal Blastocystis Isolates with Special Reference to Reproductive Modes Minoru. In: *Blastocystis: Pathogen or Passenger? An Evaluation of 101 Years of Research* p. 9–36. doi: 10.1007/978-3-642-32738-4.
  88. Bergamo do Bomfim T.C., Machado do Couto C.M. 2013. Morphological diagnosis and occurrence of Blastocystis spp. obtained from the stool samples of domestic bird species commercialized in municipal markets. *Journal of Parasitology and Vector Biology* 5(3): 20–6. doi: 10.5897/jpvb12.014.
  89. Sekar U., Dcp ;, Shanthi M. 2015. Recent insights into the genetic diversity, epidemiology and clinical relevance of Blastocystis species. *The Journal of Medical Research JMR* 1(11): 33–9.
  90. Pavlovskij E.N., editor. 1959. *Laboratornyj praktikum medicinskoj parazitologii*. Leningrad; 488 p.
  91. Zaman V. 1994. Morphology of the cyst of Blastocystis hominis. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 25(4): 790–1.
  92. Stenzel D.J., Lee M.G., Boreham P.F. 1997. Morphological differences in Blastocystis cysts-an indication of different species? *Parasitology research* 83(5): 452–7.

93. Tan K.S.W.W. 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 21(4): 639–65. doi: 10.1128/cmr.00022-08.
94. Yoshikawa H., Yoshida K., Nakajima A., Yamanari K., Iwatani S., Kimata I. 2004. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology Research* 94(6): 391–6. doi: 10.1007/s00436-004-1230-5.
95. Moe K.T., Singh M., Howe J., Ho L.C., Tan S.W., Chen X.Q., et al. 1997. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research* 83(4): 319–25. doi: 10.1007/s004360050256.
96. Lee L., Chye T., Karmacharya B., Govind S. 2012. *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites & Vectors* 5(1): 130. doi: 10.1186/1756-3305-5-130.
97. Li L.-H., Zhou X.-N., Du Z.-W., Wang X.-Z., Wang L.-B., Jiang J.-Y., et al. 2007. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitology International* 56(4): 281–6. doi: 10.1016/j.parint.2007.06.001.
98. Anuar T.S., Ghani M.K.A., Azreen S.N., Salleh F.M., Moktar N. 2013. *Blastocystis* infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasites and Vectors* 6(1). doi: 10.1186/1756-3305-6-40.
99. Zhang X., Zhang S., Qiao J., Wu X., Zhao L., Liu Y., et al. 2012. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 110(3): 1165–72. doi: 10.1007/s00436-011-2607-x.
100. Zhang X., Qiao J.Y., Zhou X.J., Yao F.R., Wei Z.C. 2007. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. *Parasitology Research* 101(1): 43–51. doi: 10.1007/s00436-006-0439-x.
101. Ahmed S.A., Karanis P. 2019. *Blastocystis* spp., ubiquitous parasite of human, animals and environment [Internet]. 2nd ed. Encyclopedia of Environmental Health. Elsevier Inc.; 429–435 p. doi: 10.1016/b978-0-12-409548-9.10947-9.
102. Moe K.T., Singh M., Howe J., Ho L.C., Tan S.W., Chen X.Q., et al. 1999. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Research* 85(2): 103–8. doi: 10.1007/s004360050517.

103. Ahmed S.A., Karanis P. 2019. Blastocystis spp., ubiquitous parasite of human, animals and environment. 2nd ed. Encyclopedia of Environmental Health. Elsevier Inc.; 429–435 p. doi: 10.1016/b978-0-12-409548-9.10947-9.
104. Garrido B.B. 2020. The human right to water and sanitation. *Revista Brasileira de Políticas Públicas* 10(3): 41–56. doi: 10.5102/rbpp.v10i3.7271.
105. de la Cruz C., Stensvold R. 2019. Blastocystis. In: Fayer R, Jakubowski W, editors. Global Water Pathogen Project Michigan State University; p. 36. doi: 10.14321/waterpathogens.31.
106. Ithoi I., Jali A., Mak J.W., Wan Sulaiman W.Y., Mahmud R. 2011. Occurrence of *Blastocystis* in water of two rivers from recreational areas in Malaysia. *Journal of Parasitology Research* 2011: Article ID 123916. doi: 10.1155/2011/123916.
107. Słodkiewicz-Kowalska A., Majewska A.C., Rzymiski P., Skrzypczak Ł., Werner A. 2015. Human waterborne protozoan parasites in freshwater bivalves (*Anodonta anatina* and *Unio tumidus*) as potential indicators of fecal pollution in urban reservoir. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 51: 32–6. doi: 10.1016/j.limno.2014.12.001.
108. McManus R. 2016. PART THREE . SPECIFIC EXCRETED PATHOGENS: ENVIRONMENTAL AND EPIDEMIOLOGY ASPECTS Copyright: *Global Water Pathogen Project* : 3–10.
109. WHO. 2017. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. S. l.: World Health Organization; 541 p.
110. Denoeud F., Roussel M., Noel B., Wawrzyniak I., Da Silva C., Diogon M., et al. 2011. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biology* 12(3): R29. doi: 10.1186/gb-2011-12-3-r29.
111. Wawrzyniak I., Courtine D., Osman M., Hubans-Pierlot C., Cian A., Nourrisson C., et al. 2015. Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genomics Data* 4: 22–3. doi: 10.1016/j.gdata.2015.01.009.
112. Gentekaki E., Curtis B.A., Stairs C.W., Klimeš V., Eliáš M., Salas-Leiva D.E., et al. 2017. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.2003769.
113. Alfellani M.A., Stensvold C.R., Vidal-Lapiedra A., Onuoha E.S.U., Fagbenro-

- Beyioku A.F., Clark C.G. 2013. Variable geographic distribution of Blastocystis subtypes and its potential implications. *Acta Tropica* 126(1): 11–8. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.12.011.
114. Jacob A.S., Andersen L.O.B., Bitar P.P., Richards V.P., Shah S., Stanhope M.J., et al. 2016. Blastocystis mitochondrial genomes appear to show multiple independent gains and losses of start and stop codons. *Genome Biology and Evolution* 8(11): 3340–50. doi: 10.1093/gbe/evw255.
115. Yoshikawa H., Koyama Y., Tsuchiya E., Takami K. 2016. Blastocystis phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitology International* 65(6): 750–9. doi: 10.1016/j.parint.2016.04.004.
116. Bonfrate L., Tack J., Grattagliano I., Cuomo R., Portincasa P. 2013. Microbiota in health and irritable bowel syndrome: Current knowledge, perspectives and therapeutic options. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 48(9): 995–1009. doi: 10.3109/00365521.2013.799220.
117. Nagel R.A. 2015. Are Blastocystis species clinically relevant to humans? University of Queensland;
118. Cario E. 2008. Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: A fine line between host protection and destruction. *Current Opinion in Gastroenterology* 24(6): 725–32. doi: 10.1097/mog.0b013e32830c4341.
119. Sansonetti P.J. 2008. Host-bacteria homeostasis in the healthy and inflamed gut. *Current Opinion in Gastroenterology* 24(4): 435–9. doi: 10.1097/mog.0b013e32830007f7.
120. Heazlewood C.K., Cook M.C., Eri R., Price G.R., Tauro S.B., Taupin D., et al. 2008. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Medicine* 5(3): 0440–60. doi: 10.1371/journal.pmed.0050054.
121. Feng T., Elson C.O. 2011. Adaptive immunity in the host-microbiota dialog. *Mucosal Immunology* 4(1): 15–21. doi: 10.1038/mi.2010.60.
122. Hooper L. V., MacPherson A.J. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* 10(3): 159–69. doi: 10.1038/nri2710.
123. Zhang M., Sun K., Wu Y., Yang Y., Tso P., Wu Z. 2017. Interactions between Intestinal Microbiota and Host Immune Response in Inflammatory Bowel

- Disease. *Frontiers in Immunology* 8(AUG): 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2017.00942.
124. Kamada N., Seo S.U., Chen G.Y., Núñez G. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* 13(5): 321–35. doi: 10.1038/nri3430.
125. Hooper L. V., MacPherson A.J. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* 10(3): 159–69. doi: 10.1038/nri2710.
126. Billy V., Lhotská Z., Jirků M., Kadlecová O., Frgelecová L., Parfrey L.W., et al. 2021. Blastocystis Colonization Alters the Gut Microbiome and, in Some Cases, Promotes Faster Recovery From Induced Colitis. *Frontiers in Microbiology* 12(April): 1–20. doi: 10.3389/fmicb.2021.641483.
127. Laforest-Lapointe I., Arrieta M.-C. 2018. Microbial Eukaryotes: a Missing Link in Gut Microbiome Studies. *mSystems* 3(2): 1–5. doi: 10.1128/msystems.00201-17.
128. Audebert C., Even G., Cian A., Blastocystis Investigation Group, Loywick A., Merlin S., et al. 2016. Colonization with the enteric protozoa Blastocystis is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports* 6(May): 1–11. doi: 10.1038/srep25255.
129. Betts E.L., Newton J.M., Thompson G.S., Sarzhanov F., Jinatham V., Kim M.-J., et al. 2021. Metabolic Fluctuations in the Human Stool Obtained from Blastocystis Carriers and Non-Carriers. *Metabolites* 11(12): 883. doi: 10.3390/metabo11120883.
130. Deng L., Id L.W., Id N.R.J.G., Peng G., Tanid K.S.W. 2021. New insights into the interactions between Blastocystis, the gut microbiota, and host immunity. doi: 10.1371/journal.ppat.1009253.
131. Deng L., Id L.W., Id N.R.J.G., Peng G., Tanid K.S.W. 2021. New insights into the interactions between Blastocystis, the gut microbiota, and host immunity. doi: 10.1371/journal.ppat.1009253.
132. Defaye M., Nourrisson C., Baudu E., Lashermes A., Meynier M., Meleine M., et al. 2020. Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically Blastocystis-infected rats. *Scientific Reports* 10(1): 1–13. doi: 10.1038/s41598-020-66156-w.

133. Boorom K.F., Smith H., Nimri L., Viscogliosi E., Spanakos G., Parkar U., et al. 2008. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, Blastocystis, and asymptomatic infection. *Parasites & vectors* 1(1): 40. doi: 10.1186/1756-3305-1-40.
134. Kaya S., ÇetİN E.S., Aridoğan B.Ci., Arikan S., Demİrcİ M. 2007. Pathogenicity of Blastocystis hominis, A Clinical Reevaluation. *Turkiye Parazitoloji Dergisi* 31(3): 184–7.
135. Leder K., Weller P.F. 2021. Blastocystis species [Internet]. UpToDate.
136. de Boer M.D.-, Schuurs T.A., Vermeer M., Ruijs G.J.H.M., van der Zanden A.G.M., Weel J.F., et al. 2020. Distribution and relevance of Dientamoeba fragilis and Blastocystis species in gastroenteritis: results from a case-control study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 39(1): 197–203. doi: 10.1007/s10096-019-03710-z.
137. Scanlan P.D., Stensvold C.R., Rajilić-Stojanović M., Heilig H.G.H.J., De Vos W.M., O'Toole P.W., et al. 2014. The microbial eukaryote Blastocystis is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS microbiology ecology* 90(1): 326–30. doi: 10.1111/1574-6941.12396.
138. Kurt Ö., Doğruman Al F., Tanyüksel M. 2016. Eradication of Blastocystis in humans: Really necessary for all? *Parasitology International* 65(6): 797–801. doi: 10.1016/j.parint.2016.01.010.
139. Pasqui A.L., Savini E., Saletti M., Guzzo C., Puccetti L., Auteri A. 2004. Chronic urticaria and blastocystis hominis infection. A case report. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 8(3): 117–20.
140. Roberts T., Stark D., Harkness J., Ellis J. 2014. Update on the pathogenic potential and treatment options for Blastocystis sp. *Gut Pathogens* 6(1): 17. doi: 10.1186/1757-4749-6-17.
141. El-Shazly A.M., Abdel-Magied A.A., El-Beshbishi S.N., El-Nahas H.A., Fouad M.A.H., Monib M.S.M. 2005. Blastocystis hominis among symptomatic and asymptomatic individuals in Talkha Center, Dakahlia Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 35(2): 653–66.
142. Alinaghizade A., Mirjalali H., Mohebalı M., Stensvold C.R., Rezaeian M., Rune C., et al. 2017. Inter- and intra-subtype variation of Blastocystis subtypes



- isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 50: 77–82. doi: 10.1016/j.meegid.2017.02.016.
143. Scanlan P.D., Stensvold C.R., Rajilić-Stojanović M., Heilig H.G.H.J.H.J., De Vos W.M., O’Toole P.W., et al. 2014. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS microbiology ecology* 90(1): 326–30. doi: 10.1111/1574-6941.12396.
  144. Clark C.G.G. 1997. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and biochemical parasitology* 87(1): 79–83. doi: 10.1016/s0166-6851(97)00046-7.
  145. Yoshikawa H., Nagano I., Wu Z., Yap E.H., Singh M., Takahashi Y. 1998. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Molecular and cellular probes* 12(3): 153–9. doi: 10.1006/mcpr.1998.0161.
  146. Kukoschke K.G., Müller H.E. 1991. SDS-PAGE and immunological analysis of different axenic *Blastocystis hominis* strains. *Journal of medical microbiology* 35(1): 35–9. doi: 10.1099/00222615-35-1-35.
  147. Boreham P.F.L., Upcroft J. a., Dunn L. a. 1992. Protein and DNA evidence for two demes of *Blastocystis hominis* from humans. *International journal for parasitology* 22(1): 49–53. doi: 10.1016/0020-7519(92)90079-z.
  148. Elwakil H.S., Talaat R.M. 2009. Genetic analysis of *Blastocystis hominis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 39(1): 99–109.
  149. Souppart L., Sancier G., Cian A., Wawrzyniak I., Delbac F., Capron M., et al. 2009. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitology research* 105(2): 413–21. doi: 10.1007/s00436-009-1398-9.
  150. El Safadi D., Cian A., Nourrisson C., Pereira B., Morelle C., Bastien P., et al. 2016. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC infectious diseases* 16(1): 451. doi: 10.1186/s12879-016-1776-8.
  151. Vennila G.D., Suresh Kumar G., Khairul Anuar A., Rajah S., Saminathan R., Sivanandan S., et al. 1999. Irregular shedding of *Blastocystis hominis*. *Parasitology research* 85(2): 162–4. doi: 10.1007/s004360050528.

152. Andersen L.O., Stensvold C.R. 2016. *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? *Journal of Clinical Microbiology* 54(3): 524–528. doi: 10.1128/jcm.02520-15.
153. Miller R.A., Minshew B.H. 1988. *Blastocystis hominis*: An Organism in Search of a Disease. *Clinical Infectious Diseases* 10(5): 930–8. doi: 10.1093/clinids/10.5.930.
154. Markell E.K., Udkow M.P. 1986. *Blastocystis hominis*: pathogen or fellow traveler? *The American journal of tropical medicine and hygiene* 35(5): 1023–6. doi: 10.4269/ajtmh.1986.35.1023.
155. Shlim D.R., Hoge C.W., Rajah R., Rabold J.G., Echeverria P. 1995. Is *Blastocystis hominis* a cause of diarrhea in travelers? A prospective controlled study in Nepal. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 21(1): 97–101. doi: 10.1093/clinids/21.1.97.
156. Markell E.K. 1995. Is there any reason to continue treating *Blastocystis* infections? *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 21(1): 104–5. doi: 10.1093/clinids/21.1.104.
157. Wesołowska M., Knysz B., Szymczak A. 2021. Inwazje pasożytnicze u osób zakażonych HIV. In: Parczewski M, Jabłonowska E, Witak-Jędra M, editors. *Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV Zalecenia PTN AIDS 2021* Warszawa; Szczecin: Polskie Towarzystwo Naukowe AIDS; p. 218–26.
158. Bednarska M., Jankowska I., Pawelas A., Piwczyńska K., Bajer A., Wolska-Kuśnierz B., et al. 2018. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Blastocystis*, and other opportunistic infections in patients with primary and acquired immunodeficiency. *Parasitology Research* 117(9): 2869–79. doi: 10.1007/s00436-018-5976-6.
159. Abdel-Hafeez E.H., Ahmad A.K., Abdelgelil N.H., Abdellatif M.Z.M., Kamal A.M., Hassanin K.M.A., et al. 2016. Immunopathological assessments of human *Blastocystis* spp. in experimentally infected immunocompetent and immunosuppressed mice. *Parasitology Research* 115(5): 2061–71. doi: 10.1007/s00436-016-4951-3.
160. Van Hellemond J.J., Molhoek N., Koelewijn R., Wismans P.J., Van Genderen P.J.J. 2013. Is paromomycin the drug of choice for eradication of *Blastocystis* in adults? *Journal of Infection and Chemotherapy* 19(3): 545–8. doi:

10.1007/s10156-012-0496-2.

161. Gockel-Blessing E.A. 2013. *Clinical Parasitology*. St. Louis, Mo.: Elsevier Saunders; 370 p.
162. Suh K.N., Kozarsky P., Keystone J.S. 2015. *Cyclospora cayentanensis*, *Cystoisospora* (*Isospora*) *belli*, *Sarcocystis* Species, *Balantidium coli*, and *Blastocystis* Species. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases Updated 8. Elsevier Inc.; p. 3184–91.
163. Szczeklik A. 2021. *Interna Szczeklika 2021*. Kraków: Medycyna Praktyczna : Polski Instytut Evidence Based Medicine; LIX+ [1]+2762+20.
164. Clark C.G., van der Giezen M., Alfellani M.A., Stensvold C.R. 2013. Recent Developments in Blastocystis Research [Internet]. Vol. 82, *Advances in Parasitology*. Elsevier; 1–32 p. doi: 10.1016/b978-0-12-407706-5.00001-0.
165. Sekar U., Shanthi M. 2013. Blastocystis: Consensus of treatment and controversies. *Tropical parasitology* 3(1): 35–9. doi: 10.4103/2229-5070.113901.
166. Stensvold C.R., Smith H. V., Nagel R., Olsen K.E.P., Traub R.J. 2010. Eradication of blastocystis carriage with antimicrobials: Reality or delusion? *Journal of Clinical Gastroenterology* 44(2): 85–90. doi: 10.1097/mcg.0b013e3181bb86ba.
167. Lamp K.C., Freeman C.D., Klutman N.E., Lacy M.K. 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clinical Pharmacokinetics* 36(5): 353–73. doi: 10.2165/00003088-199936050-00004.
168. Nasirudeen A.M.A., Hian Y.E., Singh M., Tan K.S.W. 2004. Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. *Microbiology* 150(1): 33–43. doi: 10.1099/mic.0.26496-0.
169. Coyle C.M., Varughese J., Weiss L.M., Tanowitz H.B. 2012. Blastocystis: To treat or not to treat. *Clinical Infectious Diseases* 54(1): 105–10. doi: 10.1093/cid/cir810.
170. Pal D., Banerjee S., Cui J., Schwartz A., Ghosh S.K., Samuelson J. 2009. *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* Enzymes Activate Metronidazole (Nitroreductases) and Inactivate Metronidazole (Nitroimidazole Reductases). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(2): 458–64. doi: 10.1128/aac.00909-08.
171. Stensvold C.R., Arendrup M.C., Nielsen H. V., Bada A., Thorsen S. 2008.

- Symptomatic infection with *Blastocystis* sp. subtype 8 successfully treated with trimethoprim–sulfamethoxazole. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 102(3): 271–4. doi: 10.1179/136485908x278847.
172. Stensvold C.R., Arendrup M.C., Jespersgaard C., Mølbak K., Nielsen H. V. 2007. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59(3): 303–307. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003.
  173. Kukoschke K.G., Necker a, Müller H.E. 1990. Detection of *Blastocystis hominis* by direct microscopy and culture. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 9(4): 305–7.
  174. Sohail M.R., Fischer P.R. 2005. *Blastocystis hominis* and travelers. *Travel Medicine and Infectious Disease* 3(1): 33–8. doi: 10.1016/j.tmaid.2004.06.001.
  175. Suresh K., Smith H. 2004. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 23(6): 509–11. doi: 10.1007/s10096-004-1123-7.
  176. Ryan N., Shimizu R.Y. 2018. crossm Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal. 31(1): 1–81.
  177. Barua P., Sultana A. 2015. Comparison of direct microscopy and in-vitro culture for the detection of *Blastocystis hominis* among the slum children of Dhaka city. (September 2017).
  178. Verweij J.J. 2014. Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. *Parasitology* 141(14): 1863–72. doi: 10.1017/s0031182014000419.
  179. Tan K.S.W., Mirza H., Teo J.D.W., Wu B., MacAry P.A. 2010. Current views on the clinical relevance of *blastocystis* spp. *Current Infectious Disease Reports* 12(1): 28–35. doi: 10.1007/s11908-009-0073-8.
  180. Kaczmarek A., Sobociński W., Wesołowska M., Gołąb E., Kołodziej-Sobocińska M., Sałamatın R. 2021. *Blastocystis* occurrence and subtype diversity in wild European terrestrial mammals – The case of Białowieża Primeval Forest (NE Poland). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 16(August): 120–5. doi: 10.1016/j.ijppaw.2021.08.010.

181. Jones W.R. 1946. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 40(2): 130–40. doi: 10.1080/00034983.1946.11685270.
182. Scicluna S.M., Tawari B., Clark C.G. 2006. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 157(1): 77–85. doi: 10.1016/j.protis.2005.12.001.
183. Poirier P., Wawrzyniak I., Albert A., El Alaoui H., Delbac F., Livrelli V. 2011. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology* 49(3): 975–83. doi: 10.1128/jcm.01392-10.
184. Böhm-Gloning B., Knobloch J., Walderich B. 1997. Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Tropical medicine & international health: TM & IH* 2(8): 771–8.
185. Santín M., Gómez-Muñoz M.T., Solano-Aguilar G., Fayer R. 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology Research* 109(1): 205–12. doi: 10.1007/s00436-010-2244-9.
186. Stensvold C.R., Ahmed U.N., Andersen L.O., Nielsen H.V. 2012. Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of clinical microbiology* 50(6): 1847–51. doi: 10.1128/jcm.00007-12.
187. Sayers E.W., Beck J., Brister J.R., Bolton E.E., Canese K., Comeau D.C., et al. 2020. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research* 48(D1): D9–16. doi: 10.1093/nar/gkz899.
188. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. *Wellcome Open Research* 3(0): 1–20. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
189. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2005. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: *Statistical Methods in Molecular Evolution* New York: Springer-Verlag; p. 183–226. doi: 10.1007/0-387-27733-1\_7.

190. Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*. doi: 10.1109/gce.2010.5676129.
191. Rivera W.L. 2008. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Veterinary Parasitology* 156(3–4): 178–82. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.06.001.
192. Mattiucci S., Crisafi B., Gabrielli S., Paoletti M., Cancrini G. 2016. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiology and Infection* 144(3): 635–46. doi: 10.1017/S0950268815001697.
193. Kasprzak J., Szaładzińska B., Smogula M., Ziuziakowski M. 2017. Intestinal parasites found in stool samples and perianal swabs examined by the Voivodeship Sanitary-Epidemiological Station in Bydgoszcz between 2000–2014 = Pasożyty przewodu pokarmowego wykrywane w próbkach kału i wymazów okołodbytniczych badanych w woj. *Przegląd Epidemiologiczny* 71(1): 45–54.
194. Pesenko Ū.A. 1982. Principy i metody količestvennogo analiza v faunističeskikh issledovaniâh. Moskva: Nauka; 288 s.
195. Stensvold C.R., Suresh G.K., Tan K.S.W., Thompson R.C.A., Traub R.J., Viscogliosi E., et al. 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends in Parasitology* 23(3): 93–6. doi: 10.1016/j.pt.2007.01.004.
196. Cichocki W., Ważna A., Cichocki J., Rajska-Jurgiel E., Jasiński A., Bogdanowicz W. 2015. Polskie nazewnictwo ssaków świata. Muzeum i Instytut Zoologii PAN; 362 p.
197. Kaczmarek A., Gołąb E., Żarnowska-Prymek H., Rawska A., Jańczak D., Lewicki A., et al. 2017. Genetic diversity of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland = Zróźnicowanie genetyczne *Blastocystis hominis* sensu lato wyizolowanych od ludzi w Polsce. *Przegląd epidemiologiczny* 71(4): 539–46.
198. Kaczmarek A., Wesołowska M., Gołąb E., Sałamatın R. 2019. *Blastocystis* spp. infection in young people in Poland. *Annals of Parasitology* 65(Supplement 1): s59.
199. Wesołowska M., Frączkowski M., Rymer W., Janicki P., Poniewierka E.,

- Puszyński G., et al. 2019. Molecular subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Lower Silesia, Poland. *Annals of Parasitology* 65(Supplement 1): s72–3.
200. Lepczyńska M., Dzika E., Stensvold C.R. 2016. Genetic diversity of *Blastocystis* spp. in the human population of the Olsztyn area. *Annals of Parasitology* 62(Supplement): s28.
201. Rudzińska M., Kowalewska B., Wąż P. 2019. *Blastocystis* subtypes distribution in patients performing routine coproscopy tests at the Department of Tropical Medicine and Epidemiology ( Medical University of Gdańsk ). *Annals of Parasitology* 65(Supplement 1): s69–70.
202. Wesołowska M., Paszta W., Michrowska A., Piekarska J., Wesołowska M., Gorczykowski M., et al. 2019. Molecular characterization of *Blastocystis* subtypes isolated from various mammalian groups living in Wrocław ZOO, Poland. *Annals of Parasitology* 65(Supplement 1): s47.
203. Sałamatın R., Kaczmarek A., Rożej-bielicka W., Cielecka D., Jańczak D., Lewicki A., et al. 2016. Genotype characterisation of *Blastocystis* isolates from Polish patients – preliminary results. *Annals of Parasitology* 62(Supplement): 93.
204. Kaczmarek A., Lewicki A., Dzedzic K., Sulecki K., Rożej-Bielicka W., Wesołowska M., et al. 2019. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens from Poland and Madagascar. *Annals of Parasitology* 65(Supplement 1): s30.
205. Bednarska M., Bajer A., Welc-Fałęciak R., Pawełas A. 2015. *Cyclospora cayetanensis* infection in transplant traveller: a case report of outbreak. *Parasites & Vectors* 8(1): 411. doi: 10.1186/s13071-015-1026-8.
206. Wesolowska W., Kicia M., Szetela B., Kopacz Z., Sałamatın R., Rymer W., et al. 2016. Prevalence of *Blastocystis hominis* among HIV-positive and HIV-negative patients in Poland. In: [12th European Multicolloquium of Parasitology EMOP XII Turku, Finland, July 20–24th 2016]: Abstracts p. P6.11.
207. Kaczmarek A., Gołąb E., Żarnowska-Prymek H., Rawska A., Jańczak D., Lewicki A., et al. 2017. Genetic diversity of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland = Zróźnicowanie genetyczne *Blastocystis hominis* sensu lato wyizolowanych od ludzi w Polsce. *Przegląd*

- Epidemiologiczny* 71(4): 539–46.
208. Rudzińska M., Kowalewska B., Wąż P., Sikorska K., Szostakowska B. 2019. Blastocystis subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland – A single center study. *Infection, Genetics and Evolution* 75(June): 103926. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103926.
209. Lewicki A., Rozej-Bielicka W., Sałamatın R. 2016. Blastocystis hominis s. l. ST6 – parasite of chickens – new zoonotic agent in Poland. *Annals of Parasitology* 62(Supplement): 203.
210. Kosik-Bogacka D., Lepczyńska M., Kot K., Szkup M., Łanocha-Arendarczyk N., Dzika E., et al. 2021. Prevalence, subtypes and risk factors of Blastocystis spp. infection among pre- and perimenopausal women. *BMC infectious diseases* 21(1): 1125. doi: 10.1186/s12879-021-06815-z.
211. Belova L.M., Krylov M. V. 1998. Распространение бластоцист по различным группам хозяев. *Паразитология* 32(3): 268–76.
212. Stensvold C.R., Clark C.G. 2020. Pre-empting Pandora’s Box: Blastocystis subtypes revisited. *Trends in Parasitology* 36(3): 229–32. doi: 10.1016/j.pt.2019.12.009.
213. Raś-Noryńska M., Białkowska J., Sokół R., Piskorz-Ogórek K. 2012. Badania parazytologiczne kału od dzieci bez typowych objawów chorób pasożytniczych. In: VI Konferencja „Niebezpieczne zoonozy - toksokaroza, toksoplazmoza, echinokokoza” 24 października 2012 r hotel Golden Tulip, ul Towarowa 2, Warszawa p. 8–9.
214. Kicia M., Wesołowska M., Kopacz Ż., Szetela B., Sak B., Rymer W., et al. 2014. Częstość występowania oraz skutki kliniczne infestacji Blastocystis hominis u pacjentów zakażonych HIV i chorych na AIDS - analiza wstępna. In: VIII Zjazd PTN AIDS : Zeszyt streszczeń Kraków; p. 27.
215. Duda A., Kosik-Bogacka D., Lanocha-Arendarczyk N., Lanocha A. 2015. The Prevalence of Blastocystis hominis and Other Protozoan Parasites in Soldiers Returning from Peacekeeping Missions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 92(4): 805–6. doi: 10.4269/ajtmh.14-0344.
216. Pielok Ł.A., Nowak S.P., Kłudkowska M. 2017. Masywne zarażenie Blastocystis hominis u osób powracających z krajów o odmiennym klimacie jako przyczyna biegunek z uwzględnieniem osób immunoniekompetentnych. In:



II Polski Kongres Pokonać Sepsę z międzynarodowym uczestnictwem Wrocław, 25–27 maja 2017 r.

217. Kosik-Bogacka D., Łanocha-Arendarczyk N., Piekara J., Łanocha A., Zdziarska B. 2017. Występowanie *Blastocystis hominis* u pacjentów z obniżonym poziomem odporności. In: *Nauki przyrodnicze we współczesnym świecie* Szczecin: Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego; p. 90.
218. Pielok L., Nowak S.P., Kludkowska M., Stefaniak J. 2018. Symptomatic *Blastocystis* spp. infection among returners from intertropical regions - Is the diagnostics of acquired immunodeficiency necessary? *HIV and AIDS Review* 17(1): 54–7. doi: 10.5114/hivar.2018.73976.
219. Kołowski A., Mirosław B., Mayer L., Badowska-Szalewska E., Piatkowska W., Kilinski T. 1998. Estimation of the frequency of the invasion and accompanying clinical symptoms in *Blastocystis hominis* invasion in selected age and environmental groups. *Wiadomości Parazytologiczne* 44(3): 541.
220. Raś-Noryńska M., Białkowska J., Sokół R., Piskorz-Ogórek K. 2011. Parasitological stool examination from children without the typical symptoms of parasitic disease. *Przegląd epidemiologiczny* 65(4): 599–603.
221. Goe A.M., Heard D.J., Easley J.R., Weeden A.L., Childress A.L., Wellehan J.F.X. 2016. BLASTOCYSTIS SP. and BLASTOCYSTIS RATTI in A BRAZILIAN PORCUPINE (*COENDOU PREHENSILIS*) with DIARRHEA. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 47(2): 640–4. doi: 10.1638/2015-0093.1.
222. Popruk S., Udonsom R., Koompapong K., Mahittikorn A., Kusolsuk T., Ruangsittichai J., et al. 2015. Subtype distribution of blastocystis in Thai-Myanmar border, Thailand. *Korean Journal of Parasitology* 53(1): 13–9. doi: 10.3347/kjp.2015.53.1.13.
223. Higuera A., Herrera G., Jimenez P., García-Corredor D., Pulido-Medellín M., Bulla-Castañeda D.M., et al. 2021. Identification of Multiple *Blastocystis* Subtypes in Domestic Animals From Colombia Using Amplicon-Based Next Generation Sequencing. *Frontiers in Veterinary Science* 8(August): 1–11. doi: 10.3389/fvets.2021.732129.
224. Ma L., Qiao H., Wang H., Li S., Zhai P., Huang J., et al. 2020. Molecular

- prevalence and subtypes of *Blastocystis* sp. in primates in northern China. *Transboundary and Emerging Diseases* 67(6): 2789–96. doi: 10.1111/tbed.13644.
225. Parkar U., Traub R.J., Vitali S., Elliot A., Levecke B., Robertson I., et al. 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology* 169(1–2): 8–17. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.032.
226. Roberts T., Stark D., Harkness J., Ellis J. 2013. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Veterinary Parasitology* 196(1–2): 85–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.01.011.
227. Ramírez J.D., Sánchez A., Hernández C., Flórez C., Bernal M.C., Giraldo J.C., et al. 2016. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection, Genetics and Evolution* 41: 32–5. doi: 10.1016/j.meegid.2016.03.017.
228. Rauff-Adedotun A.A., Mohd Zain S.N., Farah Haziqah M.T. 2020. Current status of *Blastocystis* sp. in animals from Southeast Asia: a review. *Parasitology Research* : 3559–70. doi: 10.1007/s00436-020-06828-8.
229. Moura R.G.F., de Oliveira-Silva M.B., Pedrosa A.L., Nascentes G.A.N., Cabrine-Santos M. 2018. Occurrence of *blastocystis* spp. In domestic animals in triângulo mineiro area of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 51(2): 240–3. doi: 10.1590/0037-8682-0484-2016.
230. Zhao G.H., Hu X.F., Liu T.L., Hu R.S., Yu Z.Q., Yang W.B., et al. 2017. Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qinling Mountains. *Parasitology Research* 116(8): 2327–33. doi: 10.1007/s00436-017-5506-y.
231. Deng L., Chai Y., Zhou Z., Liu H., Zhong Z., Hu Y., et al. 2019. Epidemiology of *Blastocystis* sp. infection in China: a systematic review . *Parasite* 26: 41. doi: 10.1051/parasite/2019042.
232. Gong B., Liu X., Wu Y., Xu N., Xu M., Yang F., et al. 2019. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in ethnic minority groups on both sides of the China–Myanmar border, and assessment of risk factors . *Parasite* 26: 46. doi: 10.1051/parasite/2019046.

233. Cian A., El Safadi D., Osman M., Moriniere R., Gantois N., Benamrouz-Vanneste S., et al. 2017. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. Yurchenko V, editor. *PloS one* 12(1): e0169659. doi: 10.1371/journal.pone.0169659.
234. Cristanziano V. Di, D'Alfonso R., Berrilli F., Sarfo F.S., Santoro M., Fabeni L., et al. 2019. Lower prevalence of *Blastocystis* sp. infections in HIV positive compared to HIV negative adults in Ghana. *PLoS ONE* 14(9): 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0221968.
235. Rivero-Juarez A., Dashti A., López-López P., Muadica A.S., Risalde M.D.L.A., Risalde M.D.L.A., et al. 2020. Protist enteroparasites in wild boar (*Sus scrofa ferus*) and black Iberian pig (*Sus scrofa domesticus*) in southern Spain: A protective effect on hepatitis E acquisition? *Parasites and Vectors* 13(1): 1–9. doi: 10.1186/s13071-020-04152-9.
236. Yoshikawa H., Tokoro M., Nagamoto T., Arayama S., Asih P.B.S., Rozi I.E., et al. 2016. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitology International* 65(6): 780–4. doi: 10.1016/j.parint.2016.03.010.
237. Wang W., Cuttall L., Bielefeldt-Ohmann H., Inpankaew T., Owen H., Traub R.J. 2013. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasites & vectors* 6: 215. doi: 10.1186/1756-3305-6-215.
238. Betts E.L., Gentekaki E., Tsaousis A.D. 2020. Exploring micro-eukaryotic diversity in the gut: co-occurrence of *Blastocystis* subtypes and other protists in zoo animals. *Frontiers in Microbiology* 11(February). doi: 10.3389/fmicb.2020.00288.
239. Mohammadpour I., Bozorg-Ghalati F., Gazzonis A.L., Manfredi M.T., Motazedian M.H., Mohammadpour N. 2020. First molecular subtyping and phylogeny of *Blastocystis* sp. isolated from domestic and synanthropic animals (dogs, cats and brown rats) in southern Iran. *Parasites and Vectors* 13(1): 1–11. doi: 10.1186/s13071-020-04225-9.
240. Ramírez J.D., Sánchez L.V., Bautista D.C., Corredor A.F., Flórez A.C., Stensvold C.R. 2014. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology*

- and evolutionary genetics in infectious diseases* 22: 223–8. doi: 10.1016/j.meegid.2013.07.020.
241. Potes-Morales C., Osorio-Delgado L.A., Carranza J.C., Vallejo G.A. 2020. The first molecular detection of Blastocystis subtypes in human faecal samples from Ibagué, Colombia. *Parasite Epidemiology and Control* 9. doi: 10.1016/j.parepi.2020.e00132.
242. Velázquez L.R., Maloney J.G., Molokin A., Morán P., Vázquez A.S., González E., et al. 2019. Use of next - generation amplicon sequencing to study Blastocystis genetic diversity in a rural human population from Mexico. *Parasites & Vectors* : 1–9. doi: 10.1186/s13071-019-3814-z.
243. Perea M., Vásquez V., Pineda V., Samudio F., Calzada J.E., Saldaña A. 2020. Prevalence and subtype distribution of Blastocystis sp. infecting children from a rural community in Panama. *Parasite Epidemiology and Control* 9.
244. Sanyanusin S., Mori H., Prasertbun R., Pintong A., Komalamisra C., Changbunjong T., et al. 2019. Molecular detection and genotyping of Blastocystis and Enterocytozoon bienersi in humans and pigs in Nakhon Pathom Province, Thailand. : 125–32.
245. Srichaipon N., Nuchprayoon S., Charuchaibovorn S., Sukkapan P., Sanprasert V. 2019. A simple Genotyping method for Rapid Differentiation of Blastocystis Subtypes and Subtype Distribution of Blastocystis spp. In Thailand. *Pathogens* 8(1): 1–15. doi: 10.3390/pathogens8010038.
246. Betts E.L., Gentekaki E., Tsaousis A.D. 2020. Exploring Micro-Eukaryotic Diversity in the Gut: Co-occurrence of Blastocystis Subtypes and Other Protists in Zoo Animals. *Frontiers in microbiology* 11: 288. doi: 10.3389/fmicb.2020.00288.
247. Stensvold C.R., Alfellani M.A., Nørskov-Lauritsen S., Prip K., Victory E.L., Maddox C., et al. 2009. Subtype distribution of Blastocystis isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal for Parasitology* 39(4): 473–9. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.07.006.
248. Ruaux C.G., Stang B. V. 2014. Prevalence of Blastocystis in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PLoS ONE* 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0107496.

249. Piubelli C., Soleymanpoor H., Giorli G., Formenti F., Buonfrate D., Bisoffi Z., et al. 2019. Blastocystis prevalence and subtypes in autochthonous and immigrant patients in a referral centre for parasitic infections in Italy. *PLoS ONE* 14(1): 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0210171.
250. Oliveira-Arbex A.P., David É.B., Tenório M. da S., Cicchi P.J.P., Patti M., Coradi S.T., et al. 2020. Diversity of Blastocystis subtypes in wild mammals from a zoo and two conservation units in southeastern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 78(September 2019): 104053. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104053.
251. Li X.-D., Zou Y., Pan J., Liang Q.-L., Zeng Z., Meng Y.-M., et al. 2020. Prevalence and subtypes of Blastocystis sp. infection in zoo animals in three cities in China. *Parasitology Research* 119(2): 465–71. doi: 10.1007/s00436-019-06571-9.
252. Rivera W.L., Tan M.A. V. 2005. Molecular characterization of Blastocystis isolates in the Philippines by riboprinting. *Parasitology Research* 96(4): 253–7. doi: 10.1007/s00436-005-1344-4.
253. Rivera W.L. 2008. Phylogenetic analysis of Blastocystis isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Veterinary Parasitology* 156(3–4): 178–82. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.06.001.
254. Belleza M.L.B., Reyes J.C.B., Tongol-Rivera P.N., Rivera W.L. 2016. Subtype analysis of Blastocystis sp. isolates from human and canine hosts in an urban community in the Philippines. *Parasitology International* 65(3): 291–4. doi: 10.1016/j.parint.2016.02.009.
255. Yoshikawa H., Tokoro M., Nagamoto T., Arayama S., Asih P.B.S., Rozi I.E., et al. 2016. Molecular survey of Blastocystis sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitology International* 65(6): 780–4. doi: 10.1016/j.parint.2016.03.010.
256. Wang W., Cuttall L., Bielefeldt-Ohmann H., Inpankaew T., Owen H., Traub R.J. 2013. Diversity of Blastocystis subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasites & vectors* 6: 215. doi: 10.1186/1756-3305-6-215.
257. Belleza M.L.B., Reyes J.C.B., Tongol-Rivera P.N., Rivera W.L. 2016. Subtype analysis of Blastocystis sp. isolates from human and canine hosts in an urban community in the Philippines. *Parasitology International* 65(3): 291–4. doi: 10.1016/j.parint.2016.02.009.

258. Abe N. 2004. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Veterinary Parasitology* 120(3): 235–42. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.01.003.
259. Tan T.C., Tan P.C., Sharma R., Sugnaseelan S., Suresh K.G. 2013. Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia. *Parasitology Research* 112(1): 85–9. doi: 10.1007/s00436-012-3107-3.
260. Farah Haziqah M.T., Nur Asyiqin M.N., Mohd Khalid M.K.N., Suresh K., Rajamanikam A., Chandrawathani P., et al. 2017. Current status of *Blastocystis* in cockroaches. *Tropical Biomedicine* 34(3): 741–5.
261. Udonsom R., Prasertbun R., Mahittikorn A., Mori H., Changbunjong T., Komalamisra C., et al. 2018. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infection, Genetics and Evolution* 65(July): 107–11. doi: 10.1016/j.meegid.2018.07.007.
262. Vaisusuk K., Saijuntha W., Sedlak S., Thanchomnang T., Pilap W., Suksavate W., et al. 2018. *Blastocystis* subtypes detected in long-tailed macaques in Thailand – further evidence of cryptic host specificity. *Acta Tropica* 184: 78–82. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.002.
263. Farah Haziqah MT, Mohd Zain SN, Chandrawathani P, Premaalatha B, Mohd Khairul Nizam MK, Arutchelvan R S.K. 2018. Genetic diversity of rodent *Blastocystis* sp. from Peninsular Malaysia [Internet]. *Trop Biomed*; p. 586–92.
264. Betts E.L., Gentekaki E., Thomasz A., Breakell V., Carpenter A.I., Tsoulos A.D. 2018. Genetic diversity of *Blastocystis* in non-primate animals. *Parasitology* (January): 1–7. doi: 10.1017/s0031182017002347.
265. Wang W., Owen H., Traub R.J., Cuttall L., Inpankaew T., Bielefeldt-Ohmann H. 2014. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Veterinary Parasitology* 203(3–4): 264–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.04.006.
266. Farah Haziqah M.T., Mohd Zain S.N., Chandrawathani P., Premaalatha B., Mohd Khairul Nizam M.K., Arutchelvan R., et al. 2018. Genetic diversity of rodent *Blastocystis* sp. From peninsular Malaysia. *Tropical Biomedicine* 35(2): 586–92.
267. Danišová O., Valenčáková A. 2021. First detection of *Blastocystis* sp. in pigs in Slovakia and in Europe. *Parasitology International* 81(November 2020): 26–9.

- doi: 10.1016/j.parint.2020.102235.
268. Pintong A. rada, Sunyanusin S., Prasertbun R., Mahittikorn A., Mori H., Changbunjong T., et al. 2018. Blastocystis subtype 5: Predominant subtype on pig farms, Thailand. *Parasitology International* 67(6): 824–8. doi: 10.1016/j.parint.2018.08.009.
269. Parkar U., Traub R.J., Kumar S., Mungthin M., Vitali S., Leelayoova S., et al. 2007. Direct characterization of Blastocystis from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology* 134(3): 359–67. doi: 10.1017/s0031182006001582.
270. Calero-Bernal R., Santín M., Maloney J.G., Martín-Pérez M., Habela M.A., Fernández-García J.L., et al. 2020. Blastocystis sp. Subtype Diversity in Wild Carnivore Species from Spain. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 67(2): 273–8. doi: 10.1111/jeu.12772.
271. Onder Z., Yildirim A., Pekmezci D., Duzlu O., Pekmezci G.Z., Ciloglu A., et al. 2021. Molecular identification and subtype distribution of Blastocystis sp. in farm and pet animals in Turkey. Vol. 220, *Acta Tropica*. p. 105939. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.105939.
272. Roberts T., Stark D., Harkness J., Ellis J. 2013. Subtype distribution of Blastocystis isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of Blastocystis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 32(3): 335–43. doi: 10.1007/s10096-012-1746-z.
273. Jiménez P.A., Jaimes J.E., Ramírez J.D. 2019. A summary of Blastocystis subtypes in North and South America. *Parasites & Vectors* 12(1): 376. doi: 10.1186/s13071-019-3641-2.
274. Sheikh S., Asghari A., Sadraei J., Pirestani M., Zare M. 2020. Blastocystis sp. Subtype 9: as the First Reported Subtype in Patients with Schizophrenia in Iran. *SN Comprehensive Clinical Medicine* 2(5): 633–9. doi: 10.1007/s42399-020-00285-1.
275. Fayer R., Elsasser T., Gould R., Solano G., Urban J., Santin M. 2014. Blastocystis tropism in the pig intestine. *Parasitology Research* 113(4): 1465–72. doi: 10.1007/s00436-014-3787-y.

276. Chen S. 2021. Genetic characterization of Blastocystis from wild animals in Sichuan Wolong National Natural Reserve, southwestern of China-Zoonotic potential. : 1–19.
277. Khaled S., Gantois N., Ly A.T., Senghor S., Even G., Dautel E., et al. 2020. Prevalence and subtype distribution of blastocystis sp. In senegalese school children. *Microorganisms* 8(9): 1–17. doi: 10.3390/microorganisms8091408.
278. 2019. Protisty [Internet]. Zintegrowana Platforma Edukacyjna.
279. Jędrzejewski S., Majewska A.C. 2007. Contamination of fresh food products with dispersive stages of intestinal parasites. *Wiadomości parazytologiczne* 53(Suplement): 104.
280. Adamska M. 2022. First report of Blastocystis sp. subtypes in natural water bodies in north-western Poland: a one-year monitoring. *International Journal of Environmental Health Research* 32(4): 862–9. doi: 10.1080/09603123.2020.1803804.



## IX. Załączniki

### ZAŁĄCZNIK 1. ORYGINALNE PEŁNOTEKSTOWE PRACE NAUKOWE (WYKAZ)

1. **Kaczmarek A.**, Gołąb E., Żarnowska-Prymek H., Rawska A., Jańczak D., Lewicki A., Wesołowska M., Rożej-Bielicka W., Cielecka D., Sałamatın R. Genetic diversity of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland = Zróźnicowanie genetyczne *Blastocystis hominis* sensu lato wyizolowanych od ludzi w Polsce // Przegląd Epidemiologiczny. – 2017. – 71, N 4. – P. 539–546. – W języku angielskim i polskim; 40 pkt MNiSW.
2. **Kaczmarek A.**, Rocka A., Wesołowska M., Golab E., Sałamatın R. *Blastocystis* isolates from a dog and their owners presenting with chronic diarrhoea. Dogs as reservoirs of *Blastocystis*: research in Poland and worldwide // Annals of Parasitology. – 2020. – 66, N 4. – P. 573–579. – doi:110.17420/ap6604.300. – 40 pkt MNiSW.
3. **Kaczmarek A.**, Sobociński W., Wesołowska M., Gołąb E., Kołodziej-Sobocińska M., Sałamatın R. *Blastocystis* occurrence and subtype diversity in wild European terrestrial mammals – The case of Białowieża Primeval Forest (NE Poland) // International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. – 2021. – 16. – P. 120–125. – doi: 10.1016/j.ijppaw.2021.08.010. – 100 pkt MNiSW.
4. **Kaczmarek A.**, Gołąb E., Sałamatın R. Improved *Blastocystis* spp. detection method using swabs with Amies transport medium and charcoal // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2021. – doi: 10.26444/aaem/142705. – 100 pkt MNiSW.

ZAŁĄCZNIK 2. STRESZCZENIA ZE ZJAZDÓW MIĘDZYNARODOWYCH  
I KRAJOWYCH (WYKAZ)

**Kaczmarek A.**, Sobociński W., Wesołowska M., Gołąb E., Kołodziej-Sobocińska M., Sałamatin R. *Blastocystis* isolated from wild mammals inhabiting Białowieża Primeval Forest // 9<sup>th</sup> Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology "Parasites in a changing world". Vilnius, Lithuania, April 21–23, 2021: Abstract book. – Vilnius: Nature Research Centre, 2021. – P. 93. – ISBN 978-609-8255-05-8.

Wesołowska M., Kmiec M., Szydłowicz M., Szetela B., Knysz B., **Kaczmarek A.**, Sałamatin R. Survival of *Blastocystis* in long-term in vitro culture // 9<sup>th</sup> Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology "Parasites in a changing world". Vilnius, Lithuania, April 21–23, 2021: Abstract book. – Vilnius: Nature Research Centre, 2021. – P. 123. – ISBN 978-609-8255-05-8.

Wesołowska M., Kałwak K., **Kaczmarek A.**, Sałamatin R. *Blastocystis* infection in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation in Poland. Preliminary results // IWOP 2021. Online Conference. 15<sup>th</sup> International Workshops on Opportunistic Protists. 15–17 June, 2021. České Budějovice, Czech Republic: Program and Abstract Book. – České Budějovice, 2021. – P. 48.

**Kaczmarek A.**, Wesołowska M., Sobociński W., Kołodziej-Sobocińska M., Sałamatin R. Badania nad występowaniem *Blastocystis* u ludzi i zwierząt – nowi żywicieli w Polsce // II Konferencja naukowo-szkoleniowa Parazytozy zwierząt – aktualne zagrożenia – nowe rozwiązania terapeutycznie i profilaktyczne. Ciechanowiec. 6–9 września 2021. – [Lublin], 2021. – S. 75–76.

**Kaczmarek A.**, Lewicki A., Dziejdzic K., Sulecki K., Rozej-Bielicka W., Wesołowska M., Gołąb E., Sałamatin R. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens from Poland and Madagascar // Annals of Parasitology. – 2019. – 65, Supplement 1. – P. s30.

Wesołowska M., Paszta W., Michrowska A., Piekarska J., Wesołowska M., Gorkowski M., **Kaczmarek A.**, Sałamatin R. Molecular characterization of *Blastocystis* subtypes isolated from various mammalian groups living in Wrocław ZOO, Poland // Annals of Parasitology. – 2019. – 65, Supplement 1. – P. s47.

**Kaczmarek A.**, Wesołowska W., Gołąb E., Sałamatın R. *Blastocystis* spp. infection in young people in Poland // *Annals of Parasitology*. – 2019. – 65, Supplement 1. – P. s59.

Wesołowska M., Frączkowski M., Rymer W., Janicki P., Poniewierka E., Puszyński G., **Kaczmarek A.**, Sałamatın R. Molecular subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Lower Silesia, Poland // *Annals of Parasitology*. – 2019. – 65, Supplement 1. – P. s72–s73.

[**Kaczmarek A.**] **Качмарек А.**, Весоловська М., Голомб Е., Саламатін Р. В. Бластицистоз у людей в Польщі – деякі епідеміологічні аспекти // Актуальні питання біології та медицини: Збірка наукових праць за матеріалами Всеукраїнської наукової конференції з міжнародною участю. 30–31 травня 2019 року. – Черкаси: ФОРМ Белінська О. Б., 2019. – С. 21.

**Kaczmarek A.**, Gołąb E., Wesołowska M., Sałamatın R. *Blastocystis hominis* – nowy (?) modny (?) pasożyt (?) // III Międzynarodowa Konferencja Przyrodnicza Pogranicza Polsko-Czesko-Słowackiego. 1–2 grudnia 2018 : Materiały konferencyjne / Redakcja: M. Warchałowski. – Zakopane, 2018. – S. 17.

**Kaczmarek A.**, Sałamatın R. First record of *Blastocystis* cf. *hominis* (Eukaryota: Stramenopiles) in European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) from Poland // 14<sup>th</sup> International Congress of Parasitology – ICOPA 2018 At: EXCO, Daegu, Korea. P.1-105.

Jańczak D., **Kaczmarek A.**, Golab E. Molecular evaluation of *Toxoplasma gondii* infection in game animals // *Parasites in the Heart of Europe 2 : XIII<sup>th</sup> Slovak and Czech Parasitological Days = XIII. Slovenské a České Parazitologické Dni* : Košice, Slovakia, Congress Hotel Centrum. May 21 – 25, 2018 : Books of Abstracts / Eds.: Miterpáková M. & Z. Vasilková. – Košice : Slovak Society for Parasitology at SAS, 2018. – P. 57. – ISBN 978-80-968473-9-6.

**Kaczmarek A.**, Golab E., Sałamatın R. Comparative study of different techniques for detection of *Blastocystis* spp. in human faecal samples // *Parasites in the Heart of Europe 2 : XIII<sup>th</sup> Slovak and Czech Parasitological Days = XIII. Slovenské a České Parazitologické Dni* : Košice, Slovakia, Congress Hotel Centrum. May 21 – 25, 2018 : Books of Abstracts / Eds.: Miterpáková M. & Z. Vasilková. – Košice : Slovak Society for Parasitology at SAS, 2018. – P. 88. – ISBN 978-80-968473-9-6.

**Kaczmarek A.**, Żarnowska-Prymek H., Rawska A., Jańczak D., Lewicki A., Wesołowska M., Cielecka D., Rozej-Bielicka W., Golab E., Sałamatin R. Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from humans in Poland // XVI Conference of Ukrainian Scientific Society of Parasitologists (Lviv, 18–21 September 2017) = XVI Конференція Українського наукового товариства паразитологів (Львів, 18–21 вересня 2017 р.): Abstracts. – Kyiv, 2017. – P. 98.– ISBN 978-966-02-8310-7.

Sałamatin R., **Kaczmarek A.**, Rozej-Bielicka W., Cielecka D., Jańczak D., Lewicki L., Wesołowska M., Młocicki D., Gołąb E. Genotype characterisation of *Blastocystis* isolates from Polish patients – the preliminary results // Annals of Parasitology. – 2016. – 62, Suppl.: The XXIV<sup>th</sup> Congress of the Polish Parasitological Society : 5–8 September 2016, Krakow : Abstracts. – P. 93.

Salamatin R., **Kaczmarek A.**, Wioletta Rozej-Bielicka W., Wesolowska W., Mlocicki D., Golab E. Genotypes of *Blastocystis* isolated from Polish patients: a case of *Blastocystis hominis sensu lato* (subtype 6) infection // [12<sup>th</sup> European Multicolloquium of Parasitology. EMOP XII. Turku, Finland, July 20–24<sup>th</sup> 2016]: Abstracts. – P17.15.