

**ЗАКОНОМІРНОСТІ ПЕРВИННОГО РОСТУ
BLASTOCYSTIS SP.
НА П'ЯТИ ТИПАХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ**

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

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.
І.І.Мечникова НАМН України»

²Харківський національний медичний університет
МОЗ України

Blastocystis sp. (раніше *Blastocystis hominis*) – еукаріотичний, одноклітинний, анаеробний, різноманітний за генотипами паразит кишкового тракту багатьох видів тварин, яким колонізовано більше мільярда людей в країнах усього світу, що істотно переважає поширеність інших клінічно актуальних протозойних інтестинальних паразитів (*Entamoeba histolytica/dispar* комплекс, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp.) [1-3]. На теперішній час *Blastocystis* sp. вважається єдиним представником чисельної групи Stramenopiles (також відомих як Heterokonts), віднесеним до нового царства Chromista, який здатен спричинювати захворювання людини – «бластицистоз» (МКХ-11, 1A35) [4-6].

Патогенез бластицистозу зазвичай пов'язують із виникненням і розвитком різних запальних (так званих «неспецифічних») захворювань кишечника (ЗЗК, у тому числі діареї мандрівників) та синдрому подразненого кишечника (СПК), які можуть супроводжуватись алергічними реакціями – еозинофілією та ураженнями шкіри, особливо у формі кропив'янки [4, 5, 7, 8]. Серед неспецифічних симптомів бластицистозу у пацієнтів найбільш поширеними є: біль у животі, діарея, метеоризм, анорексія, нудота, блювання, анальний свербіж, неконтрольоване схуднення. При цьому перебіг хвороби може істотно варіювати як за тяжкістю (від легких і середніх до важких форм), так і за тривалістю (від гострої до стійкої чи хронічної інфекції). Щільність колонізації паразитами кишкового тракту визначає ступінь маніфестації симптомів, що обґрунтовує доцільність виконання спеціальних досліджень не лише з метою якісного виявлення *Blastocystis* sp. у фекаліях, але й для оцінки кількості їх клітин [9-11].

Для виявлення *Blastocystis* sp. у фекаліях застосовують мікроскопічні, культуральні (вирощування паразитів *in vitro*), імунологічні та молекулярно-генетичні методи [5, 8, 10-16]. Мікроскопічні методи вважаються напівкількісними і дозволяють найбільш точно визначати у досліджуваних зразках фекалій (ЗФ) як концентрацію клітин паразитів, так і розрізняти їх форми (переважно – вакуолярну та гранулярну, рідше – амебодіну та інші) [4, 5, 9-11, 14]. Більш точну кількісну оцінку присутності *Blastocystis* sp. у ЗФ забезпечує полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі [5, 14-16]. Крім того, на застосування ПЛР ґрунтуються всі існуючі методи верифікації субтипів представників роду *Blastocystis*,

але без можливості диференціювати більш вірулентні амебодіні форми цих паразитів [3-5, 7, 8]. Імунологічні методи виявлення копроантігенів *Blastocystis* sp. (імуноферментний аналіз, пряма реакція імунофлуоресценції, імунохроматографічний експрес-аналіз) все частіше застосовуються у світовій медичній практиці завдяки наявності відповідних комерційних тест-систем, проте зазначені методи дозволяють отримувати лише дискретні (граничні) значення результатів досліджень ЗФ (позитивні, негативні чи сумнівні) без врахування варіювання концентрації клітин цих найпростіших та рівня вірулентності їх конкретних штамів [3-5, 7, 8]. Культуральні методи виявлення *Blastocystis* sp. характеризуються зіставними із ПЛР високими рівнями чутливості (близько 90 % і вище) та специфічності (100 %), що стоїть на заваді окреслення чіткої кореляції між позитивним результатом вирощування паразитів *in vitro* та концентрацією останніх у ЗФ [5, 7, 10, 15, 17]. Незважаючи на це, у ряді робіт культуральні методи виявлення *Blastocystis* sp. запропоновано використовувати з метою діагностики бластицистозу [14, 17-21]. Крім того, беззаперечна корисність методів вирощування *Blastocystis* sp. *in vitro* продемонстрована при проведенні епідеміологічних досліджень поширеності цих найпростіших, для визначення чутливості їх культур до лікарських препаратів, отримання антигенів паразитів, вивчення патогенезу бластицистозу та вірулентного потенціалу штамів збудника різного походження, у тому числі інтенсивності утворення амебодіних форм, які мікроскопічними методами відносно рідко вдається виявити безпосередньо у ЗФ [4, 5, 10, 19, 22-26].

Для *in vitro* вирощування *Blastocystis* sp. застосовується широкий спектр живильних середовищ [4, 5, 10, 19-29]. У переважній більшості робіт оцінку ефективності середовищ проведено за показником частоти виявлення *Blastocystis* sp. у ЗФ при співставленні з чутливістю та специфічністю детекції цих паразитів іншими методами (мікроскопічними, імунологічними, молекулярно-генетичними) [10-15, 19-21, 29-31]. Такі ж особливості *in vitro* росту культур *Blastocystis* sp. як час їх генерації, пікові дні з найвищою концентрацією клітин паразитів і терміни її зниження, зміна співвідношення основних форм найпростіших впродовж культивування, придатність різних середовищ для тривалого субкультивування *Blastocystis* sp. тощо, зазвичай вивчають з використанням аксенічних або стабілізованих ксенічних культур паразитів, тобто, попередньо вже адаптованих до росту на певному середовищі та частково чи повністю звільнених від залишків фекалій і їх мікрофлори [18, 19, 25, 32, 33]. Зрозуміло, що такий методичний принцип дозволяє лише до певної міри екстраполювати характеристики росту аксенічних і стабілізованих ксенічних культур *Blastocystis* sp. на особливості росту первинних культур цих паразитів, які притаманні умовам посіву у живильні середовища ЗФ. Крім того, до теперішнього часу залишається не з'ясованим питанням впливу різних типів живильних середовищ на інтенсивність утворення вірулентних

амебоїдних форм при вирощуванні *in vitro* одних і тих самих культур *Blastocystis* sp.

Метою роботи було з'ясування закономірностей росту первинних культур *Blastocystis* sp. на п'яти типах живильних середовищ та визначення найбільш ефективного середовища для виявлення амебоїдних морфoформ у короткострокових культурах паразитів.

Матеріали та методи

Базовим посівним матеріалом слугували три свіжі ЗФ від хворих із синдромом подразненого кишківника з переважанням діареї (СПК-Д, Рим IV). Усі ЗФ містили ≥ 5 клітин *Blastocystis* sp. у полі зору в препаратах мокрих мазків, забарвлених 1 % розчином Люголя, при світловій мікроскопії з сумарним збільшенням $\times 400$. Ідентифікацію *Blastocystis* sp. здійснено за результатом мікроскопії мазків фекалій, стійко забарвлених трихромом за модифікацією Вітлі та залізним гематоксилином за Гендейгайном [9]. ЗФ гомогенізували у фосфатно-сольовому буфері з рН=7,4 (ФСБ) при співвідношенні їх об'ємів 1:9, відповідно. Гомогенати фекалій (ГЗФ) фільтрували через два шари стерильної марлі (з розміром сторони квадратної пори близько 800 мкм) для видалення великорозмірних конгломератів. Посівна доза фільтрованого ГЗФ становила 200 мкл на кожну пробірку із 5 мл рідкого середовища або рідкої фази двофазного поживного середовища, що забезпечує достатній рівень розведення фекального матеріалу для підрахунку кількості клітин *Blastocystis* sp. у суспензіях за допомогою гемоцитометру (камери Горяєва).

Закономірності росту первинних культур *Blastocystis* sp. на п'яти типах живильних середовищ (чотирьох монофазних рідких та одного двофазного), які найчастіше застосовуються у наукових дослідженнях і у світовій медичній практиці для вирощування цих кишкових найпростіших. Рідке середовище Джонса (mJones's) виготовлено за основним протоколом 1 [27]. Двофазне середовище із скосом яєць та нашарованим розчином Локка виготовлено за модифікацією Бока і Дрбохлава (mLE) як описано у роботі [28]. Комерційне рідке середовище Меморіального інституту Розуелл-Парк 1640 (RPMI), виробник Biovest International, Inc. (США). Того ж виробника комерційне сухе модифіковане Дульбекко середовище Ігла в модифікації Іскоува (IMDMEM), яке згідно із технічним паспортом розчиняли водою для ін'єкцій, доводили рН середовища до 7,4 шляхом дозованого внесення 7,5 % розчину бікарбонату натрію та стерилізували фільтруванням через мембрану з порами 0,2 мкм. Комбіноване рідке середовище (RPMI/IMDMEM), яке виготовлено шляхом змішування рівних об'ємів середовищ RPMI та IMDMEM, котрі за результатами попередніх досліджень істотно різнилися за показниками росту стабілізованих ксенічних штамів *Blastocystis* sp. [18]. До усіх типів живильних середовищ додано антибіотики (ампіцилін 12 мг/мл і стрептоміцин 4 мг/мл) та 10 % сироватки коня, інактивованої при 56 °C впродовж 30 хвилин. Перед використанням середовища відновлювали (для видалення залишкового O_2) шляхом анаеробного термостатування при 37 °C впродовж трьох діб.

Вирощування культур *Blastocystis* sp. проводили у пробірках (16×100 мм) із гвинтовою кришкою (не повне закривання для забезпечення належного газообміну) в анаеробних умовах (анаеростат АЭ-01, РФ) упродовж десяти діб.

Закономірності первинного росту *Blastocystis* sp. при *in vitro* культивуванні на п'яти типах середовищ охарактеризовано за показниками: часу генерації клітин паразитів (T_g) у годинах (год); максимальної концентрації життєздатних клітин *Blastocystis* sp. (MCVC) у мілілітрі (мл); часу у днях, необхідного для досягнення MCVC у культурах паразитів (PTD); збереження характерних фенотипічних ознак у клітин *Blastocystis* sp. різних морфoформ (CPFC); відносної кількості у відсотках (%) утворення амебоїдних морфoформ у культурах паразитів (PAF); придатності для тривалого субкультивування *Blastocystis* sp. (SLTS).

Визначення показників T_g , MCVC і PTD ґрунтувалось на результатах підрахунку кількості життєздатних клітин *Blastocystis* sp. у мікрооб'ємах суспензії їх культур [18]. Фактичні значення MCVC і PTD є емпіричними даними, а значення T_g вираховували за формулою: $T_g = (T_2 - T_1) / (\log_2(n_2/n_1))$, де n_1 позначає концентрацію клітин на попередньому етапі культивування паразитів (на час T_1), а n_2 - концентрацію клітин на наступному етапі їх культивування (на час T_2). При цьому, $(T_2 - T_1) = 24$ год для кожної культури *Blastocystis* sp. Кількість життєздатних клітин *Blastocystis* sp. в усіх пробірках визначали відразу після висіву ГЗФ та щодобово упродовж десяти днів. Підрахунок клітин *Blastocystis* sp. проводили в гемоцитометрі із застосуванням тесту на виключення барвника трипанового синього, який відтворювали за основним протоколом [34] з тією відмінністю, що відмивання клітин від сироватки середовища здійснювали методом центрифугування при 500g протягом 5 хвилин. Використано такі техніку підрахунку клітин *Blastocystis* sp. та критерії оцінки їх життєздатності: кожну процедуру підрахунку паралельно виконано у двох гемоцитометрах двома різними фахівцями при світловій мікроскопії із сумарним збільшенням $\times 100$; клітини забарвлені у синій колір вважали нежиттєздатним, а незабарвлені (інтактні) – життєздатними; клітин із невизначеним статусом за критерієм забарвлення підлягали мікроскопії при збільшенні $\times 400$ для встановлення ознак деструкції (руйнування стінки клітин та внутрішніх елементів), клітини без ознак деструкції відносили до життєздатних.

Показник CPFC оцінено за результатом фазово-контрастної мікроскопії (із сумарним збільшенням $\times 600$) суспензій *Blastocystis* sp., що перебували на різних етапах культивування. Цим же методом вивчали загальні закономірності динаміки змін питомої частки (%) основних морфoформ паразитів у різні терміни росту їх культур.

Величину показника PAF визначено для кожного типу поживного середовища шляхом розрахунку % амебоїдних морфoформ серед 300 підрахованих клітин паразитів у мазках суспензій,

стійко забарвлених модифікованим методом за Філдом [35].

Значення показника SLTS встановлено за результатом підтримки росту субкультур *Blastocystis* sp. упродовж передбачених десяти послідовних їх пасажів (кожен наступний через 3-4 доби після попереднього) на однотипних поживних середовищах і виражали середньою величиною (для трьох культур *Blastocystis* sp.) максимальної кількості пасажів, після яких було виявлено ознаки росту субкультури паразитів - збільшення концентрації їх клітин наприкінці термостатування.

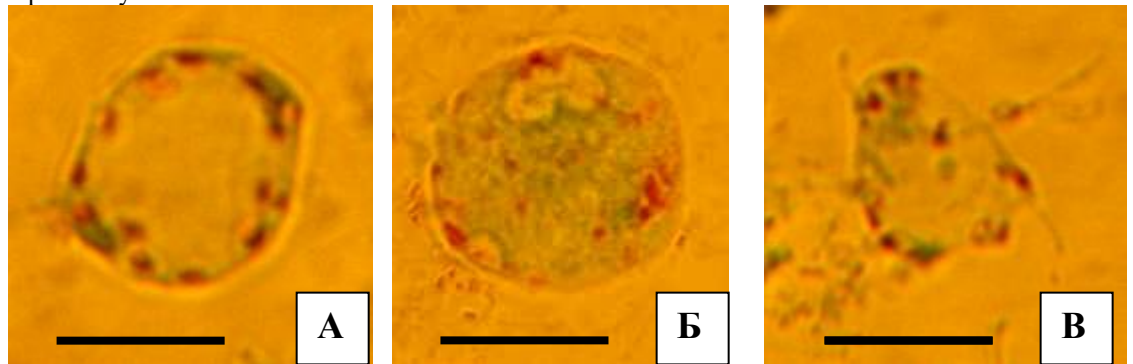


Рисунок 1. Вакуолярна (А), гранулярна (Б) і амебоїдна (В) форми *Blastocystis* sp. у мазках ГЗФ, стійко забарвлених трихромом за модифікацією Вітлі (світлова мікроскопія із сумарним збільшенням $\times 1000$, реперна мітка 10 мкм).

Після висіву ГЗФ у живильні середовища початкова концентрація (ПК) клітин *Blastocystis* sp. у відповідних суспензіях була у межах $(5,5 \pm 1,0) \times 10^3$ /мл (штам 1/12), $(3,0 \pm 1,1) \times 10^4$ /мл (штам 1/3) та $(1,6 \pm 0,8) \times 10^5$ /мл (штам 1/21). Інокуляти з двома останніми концентраціями клітин *Blastocystis* sp. дали первинний ріст на усіх типах живильних середовищ, тоді як висів клітин паразитів у концентрації $(5,5 \pm 1,0) \times 10^3$ /мл не супроводжувався їх ростом на mJones's.

Автори роботи [18] продемонстрували, що кількісний показник інокуляції впливав на ріст культивованих клітин паразитів, а концентрація клітин менше 10^5 /мл не дозволяла деяким штамам *Blastocystis* sp. вижити в середовищах RPMI, 199 і DMEM. Проте, ці ж дослідники вказали на відсутність істотної залежності T_g у короткострокових культурах паразитів від висіяної концентрації їх клітин.

За результати наших досліджень теж встановлено подібну закономірність зміни T_g на різних етапах первинного росту трьох культур *Blastocystis* sp. незалежно від концентрації клітин паразитів у висіяних інокулятах. Так, впродовж першої доби вирощування (фаза адаптації і початку росту) на усіх типах середовищ T_g був відносно найдовшим ($p < 0,05$), його середнє значення становило $(27,9 \pm 5,7)$ год, $(23,5 \pm 3,9)$ год, $(20,4 \pm 4,6)$ год, $(28,3 \pm 6,0)$ год і $(23,2 \pm 4,1)$ год на mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM та RPMI/IMDMEM, відповідно. З другої доби культивування до часу досягнення максимальної концентрації клітин *Blastocystis* sp. у суспензіях (фаза

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

Результати та обговорення

В усіх підготовлених для висіву ГЗФ домінуючими морфотипами клітин *Blastocystis* sp. були вакуолярні (85-95 %) та гранулярні (5-15 %), а поодинокі амебоїдні форми ($< 1\%$) вдалося виявити у одному із трьох ГЗФ (рис. 1).

експоненціального росту) T_g скорочувався до досягнення мінімальних значень на вказаних середовищах відповідно: $(19,5 \pm 3,0)$ год, $(18,9 \pm 4,6)$ год, $(17,8 \pm 2,5)$ год, $(22,3 \pm 4,7)$ год та $(18,5 \pm 3,8)$ год. На подальших етапах культивування *Blastocystis* sp. (фази стаціонарного росту і початку прискореної загибелі клітин) величина показника T_g знову дещо зростала, але до завершення терміну спостереження на десятю добу не досягала значень фази адаптації і початку росту: $(22,9 \pm 5,2)$ год, $(20,9 \pm 3,5)$ год, $(19,7 \pm 2,8)$, $(24,0 \pm 3,1)$ год та $(20,2 \pm 1,9)$ год на mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM і RPMI/IMDMEM відповідно.

Описана динаміка T_g знаходилась у зворотній кореляції із змінами концентрації життєздатних клітин у культурах *Blastocystis* sp. Тобто, поступове скорочення часу генерації паразитів впродовж перших декількох діб культивування супроводжується відповідним зростанням концентрації їх клітин у суспензіях, а наступне збільшення T_g – відносним зменшенням кількості життєздатних клітин у культурах. Крім того, загальними закономірностями первинного росту культур *Blastocystis* sp. є й те, що на усіх досліджених типах середовищ розмноження розпочиналось із тих клітин, які знаходились біля фрагментів фекального матеріалу («зони росту»). У наступну добу на місці окремих клітин зон росту утворюються конгломерати з десятками клітин («гроно росту»), з яких у послідовний період інкубування відділяються клітини, що більш швидко ростуть і розмножуються в усьому об'ємі середовища до досягнення MCVC (рис. 2).

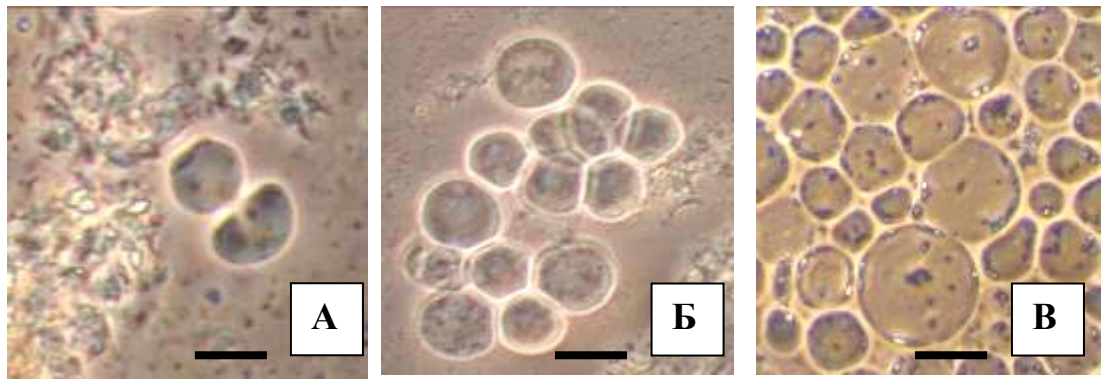


Рисунок 2. Етапи первинного росту культури *Blastocystis* sp. на середовищі RPMI: перша доба культивування, поділ клітини у зоні росту (А); друга доба культивування, утворення конгломерату клітин – грона росту (Б); третя доба культивування, швидкий ріст і розмноження клітин в усьому об'ємі середовища (В) (фазово-контрастна мікроскопія із сумарним збільшенням $\times 600$, реперна мітка 10 мкм).

У цілому після першої доби культивування і до дня досягнення MCVC питома частка життєздатних клітин в усіх суспензіях була у межах від 93,8 % до 98,5%. Величина цього показника поступово знижувалась у фазах стаціонарного росту та початку прискореної загибелі клітин і на десяту добу спостереження становила (59,0 \pm 8,5) % на mJones's, (67,7 \pm 6,0) % на mLE, (75,5 \pm 7,4) % на RPMI, (81,8 \pm 6,5) % на IMDMEM та (79,7 \pm 8,0) % на RPMI/IMDMEM. Встановлено, що при *in vitro* вирощуванні автентичних за походженням із ГЗФ культур *Blastocystis* sp. на різних типах середовищ (mJones's і mLE у порівнянні

із RPMI, IMDMEM та RPMI/IMDMEM) величина показника MCVC може істотно різнитись ($p < 0,05$). Для використаних в експериментах штамів паразитів середнє значення MCVC становило (25,5 \pm 6,7) $\times 10^5$ клітин/мл, (32,0 \pm 7,8) $\times 10^5$ клітин/мл, (56,6 \pm 9,0) $\times 10^5$ клітин/мл, (36,6 \pm 8,4) $\times 10^5$ клітин/мл і (50,1 \pm 9,4) $\times 10^5$ клітин/мл на середовищах mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM та RPMI/IMDMEM відповідно. При цьому, РТД становить 3 дні на середовищах mLE і RPMI, 4 дні на - mJones's та RPMI/IMDMEM і 5 днів – на IMDMEM (рис. 3).

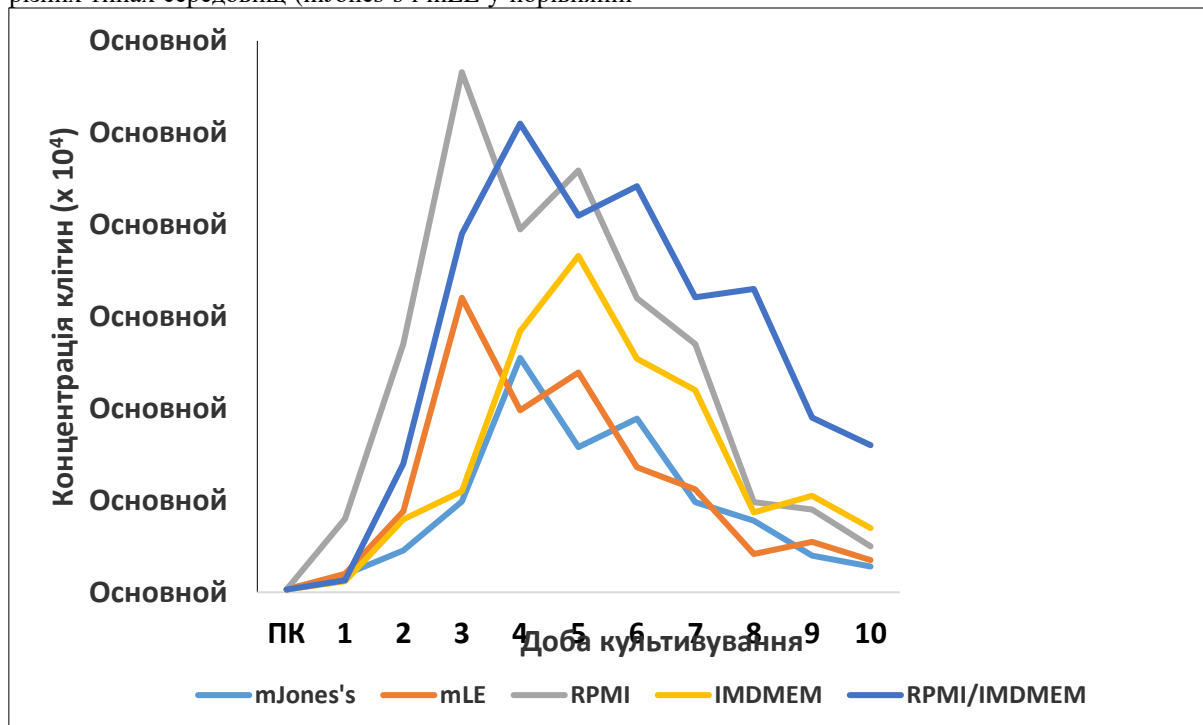


Рисунок 3. Профілі первинного росту штаму *Blastocystis* sp.1/3 на п'яти типах живильних середовищ (mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM та RPMI/IMDMEM).

Під час *in vitro* вирощування на усіх типах живильних середовищ у наших культурах *Blastocystis* sp. виявлено широкий спектр їх морфологічних форм:

вакуолярні, гранулярні, амебоїдні, у стадії поділу, полівакуолярні, авакуолярні, прецисти, цисти та інші (рис. 4). Переважна більшість візуалізованих клітин паразитів у суспензіях характеризувались чітко

вираженими ідентифікаційними ознаками, притаманними певним морфотипам цих протозойних організмів, які детально описані в науковій літературі [4, 8, 10, 19, 26, 29, 33]. Таким чином, за показником СРФС середовища mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM та RPMI/IMDMEM є цілком придатними для

культивування клінічних штамів *Blastocystis* sp. та з'ясування загальних закономірностей динаміки зміни питомої частки (%) морфотипів паразитів у різні терміни росту їх культур.



Рисунок 4. Приклади основних морфотипів *Blastocystis* sp., які візуалізовано у їх первинних культурах: вакуолярна (А), гранулярна (Б), амебоїдна (В), у стадії поділу (Г), прециста (Д) і циста (Е) (фазово-контрастна мікроскопія із сумарним збільшенням $\times 600$, реперна мітка 10 мкм).

Впродовж усього терміну первинного росту культивування *Blastocystis* sp. найбільш поширеними морфотипами клітин паразитів були вакуолярна, гранулярна та амебоїдна, а інші (полівакуолярні, авакуолярні, перехідні форми, прецисти, цисти тощо) виявлялись рідше (рис. 4). У фазах початку та експоненціального росту культур домінуючою була вакуолярна морфотип клітин *Blastocystis* sp. (75-93 %), значна частка яких знаходилась у стадії поділу (6-12 %), а гранулярна форма, прецисти і цисти спостерігались рідко (< 2 %). У фазах стаціонарного росту і початку прискореної загибелі *Blastocystis* sp. відмічена динаміка поступового зменшення питомої частки клітин вакуолярної морфотипи (до 0-3 % на десятий день культивування) та відносно збільшення гранулярних клітин (65-82 % на кінець терміну спостереження). Крім того, у десятидобових культурах *Blastocystis* sp. виявлено клітини з ознаками деградації (8-13 %), збільшення частки прецист і цист паразитів (7-12 %), а клітини у стадії поділу були поодинокими.

Як уже добре відомо, амебоїдні морфотипи є етапом життєвого циклу *Blastocystis* sp. і відіграють патофізіологічну роль у виникненні та перебігу бластоцистозу, тому їх утворення є ознакою вірулентних штамів паразитів, які переважно

виявляють у ЗФ від хворих (ЗЗК, СПК) людей і рідко – від здорових осіб [4, 5, 7, 8, 10, 26, 33]. Через політипність вигляду і відносно невелику кількість амебоїдних клітин *Blastocystis* sp. досить складно ідентифікувати мікроскопічними методами безпосередньо у ЗФ, натомість вони легко виявляються при вирощуванні культур паразитів *in vitro* [4, 5, 10, 19, 22-26]. У роботі [26] доведено існування прямої сильної кореляції між інтенсивністю утворення (%) амебоїдних клітин у культурах *Blastocystis* sp. та рівнем вірулентності відповідних штамів паразитів за підвищеною активністю їх протеаз. Незважаючи на те, що утворення амебоїдних морфотипів спостерігалось багатьма дослідниками при культивуванні *Blastocystis* sp. на різних поживних середовищах, до теперішнього часу залишалось нез'ясованим питання впливу типу середовища на інтенсивність генерації амебоїдних клітин одними і тими ж самими штамми паразитів. Як показали результати наших досліджень такий вплив є істотним.

У всіх культурах *Blastocystis* sp., отриманих після висіву двох ГЗФ на mJones's та трьох ГЗФ на усі інші типи живильних середовищ було виявлено амебоїдні морфотипи паразитів, які вдавалось візуалізувати у суспензіях уже після першої доби вирощування. У наступні дні культивування *Blastocystis* sp. величина показника PAF зростала і

досягала максимально значення на наступну або через добу після дня досягнення в культурах MCVC: четверта доба на RPMI, п'ята – на mJones's, mLE та RPMI/IMDMEM, шоста - на IMDMEM (рис. 5). Хоча у суспензіях штамів *Blastocystis* sp.1/12, 1/3 і 1/21 значення PAF дещо коливалось ($p > 0,05$), найбільшої величини для усіх штамів паразитів цей показник досягав на RPMI/IMDMEM - (19,8±5,4) %, а

найменшого на mJones's – (8,5±4,7) % ($p < 0,05$). Друге рейтингове місце за величиною PAF посідає середовище IMDMEM, (17,8±5,5) %, а наступне – RPMI та mLE, які характеризувались майже однаковими значеннями PAF: (14,9±4,4) % і (14,2±3,8) % відповідно.

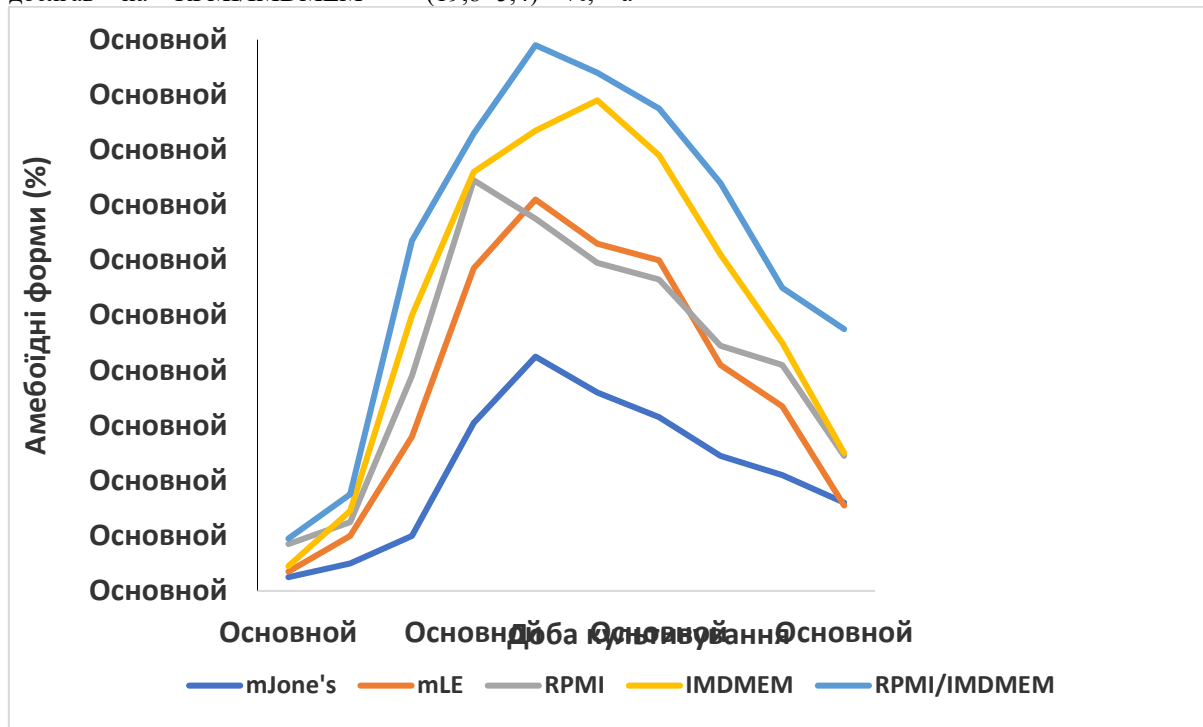


Рисунок 5. Відсоток утворення амебоїдних морфоформ (PAF) при первинному рості штаму *Blastocystis* sp.1/3 на п'яти типах живильних середовищ (mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM та RPMI/IMDMEM).

За результатами наших досліджень живильні середовища mLE, RPMI, IMDMEM та RPMI/IMDMEM виявились придатними для тривалого субкультивування *Blastocystis* sp. На цих середовищах усі три штами *Blastocystis* sp. показали достатню пермісивність і були здатними до росту після десяти послідовних пасажів на однотипних середовищах, SLTS = 30. Середовище mJones's з успіхом використовувалось багатьма іноземними науковцями для виявлення *Blastocystis* sp. у ЗФ людей і тварин, отримання стабілізованих довгострокових культур паразитів та вивчення їх властивостей, у тому числі вірулентного потенціалу, чутливості до лікарських препаратів тощо [10, 21, 23, 25, 26, 27]. Автори окремих публікацій вказували на необхідність модифікації середовища mJones's для підвищення його ростових якостей [20, 21]. У наших умовах для mJones's величину показника SLTS визначено на рівні 16: після висіву ГЗФ не отримано первинного росу штаму *Blastocystis* sp. 1/12, а у штамів паразитів 1/3 та 1/21 втрата здатності до росту зафіксована після сьомого і дев'ятого пасажів відповідно.

Висновки

З'ясовані закономірності *in vitro* росту трьох первинних культур *Blastocystis* sp. на п'яти типах

живильних середовищ (mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM та RPMI/IMDMEM) обґрунтовують доцільність підбору оптимального типу середовища з урахуванням мети і завдань передбачуваного дослідження. Застосування середовищ RPMI і RPMI/IMDMEM дозволяє отримати із ЗФ впродовж трьох та чотирьох діб вирощування короткострокові культури із найвищою концентрацією клітин *Blastocystis* sp. ($56,6 \pm 9,0 \times 10^5$ /мл і $50,1 \pm 9,4 \times 10^5$ /мл, відповідно). У первинних культурах *Blastocystis* sp. на усіх досліджених типах середовищ морфоформи паразитів зберігають специфічні ідентифікаційні ознаки. Амебоїдні морфоформи найбільш інтенсивно утворюються на середовищах RPMI/IMDMEM та IMDMEM, де їх питома частка серед клітин *Blastocystis* sp. сягає (19,8±5,4) % і (17,8±5,5) %, відповідно. Середовища mLE, RPMI, IMDMEM та RPMI/IMDMEM є придатними для тривалого субкультивування штамів *Blastocystis* sp.

References

1. Scanlan P.D, Stensvold C.R. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. Trends Parasitol. 2013 Nov; 29(11): 523-529. DOI: 10.1016/j.pt.2013.08.006
2. Stensvold C.R., Tan, K.S.W., Clark C.G. *Blastocystis*. Trends Parasitol. 2020 Mar; 36(3): 315-316. DOI: 10.1016/j.pt.2019.12.008

3. Stensvold C.R., Lewis H. C., Hammerum A.M., Porsbo L.J., Nielsen S.S., Olsen K.E.P., Arendrup M.C., Nielsen H.V., Mølbak K. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol. Infect.* 2009 Nov; 137(11): 1655-1663. DOI: 10.1017/S0950268809002672.
4. Parija S.C., Jeremiah S.S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop. Parasitol.* 2013 Jan; 3(1):17-25. DOI: 10.4103/2229-5070.113894.
5. Vielma J. R. *Blastocystis*: epidemiological, clinical, pathogenic, diagnostic, and therapeutic aspects. *Invest. Clín.* 2019 Mar; 60(1): 53-78. DOI: 10.22209/IC.v60n1a06.
6. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics (Version : 05/2021).
<https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http://id.who.int/icd/entity/1184241320>
7. Stensvold R.D., Clark C.G. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol. Int.* 2016 Dec; 65(6 Pt B): 763-771. DOI: 10.1016/j.parint.2016.05.015.
8. Sekar U., Shanthi M. Recent insights into the genetic diversity, epidemiology and clinical relevance of *Blastocystis* species. *J. Med. Res.* 2015; 1(1): 33-39. URL: http://www.medicinearticle.com/JMR_201511_10.pdf.
9. Garcia L.S., Campbell J.L., Fritsche T.R. et al. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from Intestinal Tract; Approved Guideline - Second Edition. CLSI document M28-A2. 2005; 25(16): 111 p. URL: https://clsi.org/media/1460/m28a2_sample.pdf.
10. Tan K.S.W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008 Oct; 21 (4): 639-665. DOI: 10.1128/CMR.00022-08.
11. Bart A., Wentink-Bonnema E. M., Gilis H. et al. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13(1): 389. DOI: 10.1186/1471-2334-13-389
12. El-Sayed N.M., Abdel-Wahab M.M. Detection of *Blastocystis* in stool specimens using parasitological methods and commercial antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay: a comparative study. *Egypt. J. Med. Sci.* 2011 June; 32 (1): 327-338.
13. Salman Y.J. Detection of *Blastocystis hominis* among peoples in Kirkuk province using ELISA and direct microscopy. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2015; 4(10): 686-695.
14. Mohammad N.A., Mastuki M.F., Al-Mekhlafi H.M. et al. Comparative study of wheatley's trichrome stain and *in-vitro* culture against PCR assay for the diagnosis of *Blastocystis* sp. in stool samples. *Iran J. Parasitol.* 2018 Jan-Mar; 13(1): 127-136. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6019595/>
15. Poirier P., Wawrzyniak I., Albert A. et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 2011 Mar; 49(3): 975-983. DOI: 10.1128/JCM.01392-10.
16. Nourrisson C., Brunet J., Flori P., Moniot M., Bonnin V., Delbac F., Philippe Poirier P. Comparison of DNA Extraction Methods and Real-Time PCR Assays for the Detection of *Blastocystis* sp. in Stool Specimens. *Microorganisms.* 2020 Nov; 8(11):1768. DOI: 10.3390/microorganisms8111768
17. Stensvold C.R., Arendrup M.C., Jespersgaard C. et al. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007 Nov; 59(3): 303-307. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003.
18. Zhang X., Qiao J., Wu X. et al. In vitro culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *Int. J. Infect. Dis.* 2012 Jan; 16(1): e23-e28. DOI: 10.1016/j.ijid.2011.09.012.
19. Melo G.B., Roldan W., Malta F.M. et al. Culture isolation and molecular identification of *Blastocystis* sp. in Brazilian human isolates: preliminary results. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2020; 62:e51. DOI: 10.1590/s1678-9946202062051.
20. Piekara-Stępińska A., Gorczykowski M., Piekarska J. Suitability of selected culture media for *Blastocystis* spp. *Polish J. Vet. Scien.* 2018; 21(4): 815-817. DOI: 10.24425/pjvs.2018.125593.
21. Hegazy L.A., Salama M.A., Fawzy E.M. et al. Evaluation of Jones' Medium Culture versus Locke Egg Medium in Diagnosis of *Blastocystis Hominis*. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology.* 2021; 25(5): 987-1001.
<https://www.annalsofrscb.ro/index.php/journal/article/view/4451>.
22. Roberts T., Bush S., Ellis J., Harkness J., Stark D.. In Vitro Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Blastocystis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015 Aug; 59(8): 4417-4423. DOI: 10.1128/AAC.04832-14.
23. Chandramathi S., Suresh, K., Kuppusamy U.R. Solubilized antigen of *Blastocystis hominis* facilitates the growth of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitol. Res.* 2010 Feb; 106(4): 941-945. DOI: 10.1007/s00436-010-1764-7.
24. Puthia M.K., Lu J., Tan K.S.W. *Blastocystis ratti* Contains Cysteine Proteases That Mediate Interleukin-8 Response from Human Intestinal Epithelial Cells in an NF- κ B-Dependent Manner. *Eukaryot Cell.* 2008 Mar; 7(3): 435-443. DOI: 10.1128/EC.00371-07.
25. Ragavan N., Govind S., Chye T., Mahadeva S. Phenotypic variation in *Blastocystis* sp. ST3. *Parasit. Vectors.* 2014 Aug; 7(1): 404. DOI: 10.1186/1756-3305-7-404.
26. Rajamanikam A., Govind S. Amoebic forms of *Blastocystis* spp. - evidence for a pathogenic role. *Parasit. Vectors.* 2013 Oct; 6(1): 295. DOI: 10.1186/1756-3305-6-295.
27. Clark C.G., Stensvold C.R. *Blastocystis*: Isolation, Xenic Cultivation, and Cryopreservation. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2016 Nov; 43:20A.1.1-20A.1.8. DOI: 10.1002/cpmc.18.
28. Clark C.G., Diamond L.S. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002 Jul; 15(3): 329-341. DOI: 10.1128/CMR.15.3.329-341.2002.
29. Padukone S., Mandal J., Rajkumari N. et al. Detection of *Blastocystis* in clinical stool specimens using three

different methods and morphological examination in Jones' medium. Trop. Parasitol. 2018 Jan-Jun; 8(1): 33–40. DOI: 10.4103/tp.TP_4_18.

30. Roberts T., Barratt J., Harkness J. et al. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2011 Feb; 84(2): 308–312.

DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0447.

31. Santos H.J., Rivera W.L. Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. Asian Pac. J. Trop. Med. 2013 Oct; 6(10): 780–784. DOI: 10.1016/S1995-7645(13)60138-8.

32. Zierdt C., Swan J. Generation time and growth rate of the human intestinal parasite *Blastocystis hominis*. J. Protozool. 1981 Nov; 28(4):483–485. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1981.tb05324.x

33. Karamati S.A., Mirjalali H., Niyati M. et al. Comprehensive study of phenotypic and growth rate features of *Blastocystis* subtypes 1-3 and 6 in symptomatic and asymptomatic subjects. Iran J. Parasitol. 2019 Apr-Jun; 14(2): 204–213. DOI:10.18502/ijpa.v14i2.1132.

34. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Curr. Protoc. Immunol. 2015 Nov; 111: A3.B.1–A3.B.3. DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs111.

35. Ragavan A.D., Govind S.K. Modified Fields' stain: ideal to differentiate *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* sp. // Parasitol. Res. 2015 Mar; 114(3): 1163–1166. DOI: 10.1007/s00436-014-4296-8.

Regularities of primary growth of *Blastocystis* sp. In five types of nutrient media

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

Introduction. *Blastocystis* sp. is the most prevalent intestinal protozoan parasite in humans and many animals. Unfavorable colonization of *Blastocystis* sp. in human intestine is associated with development of various inflammatory diseases and irritable bowel syndrome (IBS), which may be accompanied by allergic reactions. Currently, microscopic, cultural (*in vitro* parasite cultivation), immunological and molecular genetic methods are used for *Blastocystis* sp. detection in stool samples. Cultural methods are characterized by a high degree of sensitivity and specificity. They are widely used in epidemiological studies to evaluate *Blastocystis* sp. prevalence, to determine their sensitivity to drugs, and to obtain parasite antigens. Cultural methods are also used to study blastocystosis pathogenesis and pathogen strains of various origins and their virulent potential, including the intensity of the amoeboid morphoforms formation, which microscopic methods fail to detect directly in faecal samples. A vast majority of previous studies of *Blastocystis* sp. *in vitro* growth in different media were performed using axenic and stabilized xenic cultures of parasites. The goal of this study was to determine growth regularities of *Blastocystis* sp. primary cultures in five types of nutrient media and to identify the most effective media for amoeboid morphoforms detection in short-term cultures of parasites. Materials and Methods. Three fresh stool specimens of IBS-D (Rome IV) patients were used

as inoculum. The specimens contained ≥ 5 cells of *Blastocystis* sp. observed in the field of view under light microscopy with $\times 400$ magnification. *Blastocystis* sp. identification was carried out by means of microscopy of the faecal smears, which were stained by Wheatley's modification trichrome stain and by Heidenhain's iron-hematoxylin stain. The inoculation dose of faecal samples homogenate (1:10 dilution in PBS pH = 7.4) was 200 μ l per tube with 5 ml of liquid media Jones's (mJones's), RPMI-1640 (RPMI), Iscove's modified DMEM (IMDMEM), RPMI/IMDMEM (mixture of equal volumes of RPMI and IMDMEM media) and a liquid phase of the modified two-phase LE medium (mLE, modification Boeck and Drbohlav's). All types of media contained antibiotics (ampicillin 12 mg/ml and streptomycin 4 mg/ml) and 10% inactivated horse serum. *Blastocystis* sp. culture growth was carried out under anaerobic conditions at 37 °C for 10 days. The specifics of *Blastocystis* sp. primary growth in five types of nutrient media were characterized by the following indicators: parasite cells generation time, (T_g) measured in hours (h); maximum concentration of *Blastocystis* sp. viable cells, (MCVC) measured in milliliter (ml); time, required to achieve MCVC in parasite cultures, measured in days (PTD, peaking time in days); preservation of typical phenotypic traits of the *Blastocystis* sp. cell of various forms (CPFC); percentage of amoeboid forms in the parasite cultures (PAF); suitability for long-term subcultivation *Blastocystis* sp. (SLTS). Determination of T_g , MCVC and PTD was based on the results of counting the number of *Blastocystis* sp. viable cells in microvolumes of their cultures. The number of viable cells of *Blastocystis* sp. in all tubes was determined immediately after inoculation of fecal homogenate and then daily during the cultivation period. Quantification of *Blastocystis* sp. cells was done in a hemocytometer using trypan blue exclusion test. CPFC parameter was evaluated by a phase contrast microscopy of *Blastocystis* sp. suspensions with $\times 600$ magnification. The value of the PAF index for each type of medium was determined by calculating the percentage of amoeboid morphoforms in 300 counted parasite cells in suspensions smears stained by modified Field's stain method. The value of SLTS parameter is determined by sustaining the growth of *Blastocystis* sp. subculture during 10 sequential passages in the same type of media. **Results & Discussion.** T_g was relatively the longest ($p < 0,05$) during the first day of cultivation (phase of adaptation and beginning of the growth) in all types of media. Its average value was (27,9 \pm 5,7) h, (23,5 \pm 3,9) h, (20,4 \pm 4,6) h, (28,3 \pm 6,0) h and (23,2 \pm 4,1) h in mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM and RPMI/IMDMEM, respectively. Since the second day of cultivation till the time of the maximum concentration of *Blastocystis* sp. cells in suspensions was achieved (exponential growth phase), T_g was reduced to the minimum values in these media, respectively: (19,5 \pm 3,0) h, (18,9 \pm 4,6) h, (17,8 \pm 2,5) h, (22,3 \pm 4,7) h and (18,5 \pm 3,8) h. In the subsequent stages of *Blastocystis* sp. cultivation (phase of stationary growth and the beginning of accelerated cell death) the value of T_g slightly increased again, but by the end of the observation period, on Day 10, it did not reach the value of the phase of adaptation and the beginning of the growth. It was

established that MCVC value can differ significantly ($p < 0,05$) during *in vitro* culturing of *Blastocystis* sp. authentic cultures in different types of media. For the parasite strains used in the experiments, the average MCVC value reached: $(25,5 \pm 6,7) \times 10^5$ cells/ml, $(32,0 \pm 7,8) \times 10^5$ cells/ml, $(56,6 \pm 9,0) \times 10^5$ cells/ml, $(36,6 \pm 8,4) \times 10^5$ cells/ml and $(50,1 \pm 9,4) \times 10^5$ cells/ml in the media mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM and RPMI/IMDMEM, respectively. Meanwhile, PTD was 3 days in mLE and RPMI media, 4 days in - mJones's and RPMI/IMDMEM and 5 days in IMDMEM. A wide range of *Blastocystis* sp. morphological forms was revealed in all types of media: vacuolar, granular, amoeboid, in the stage of division, polyvacuolar, avacuolar, precysts, cysts and others. A vast majority of parasites visualized in cell suspensions were characterized by distinct identification features typical for certain morphoforms of these protozoan organisms. Thus, according to CPFC parameter, mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM and RPMI / IMDMEM media are quite suitable for cultivation of *Blastocystis* sp. clinical strains and for establishing specifics in dynamics of parasites morphoforms changes during different stages of culture growth. Amoeboid forms are the stages in the life cycle of *Blastocystis* sp. and play a pathophysiological role in the incidence and course of blastocystosis. It is rather difficult to identify amoeboid cells of *Blastocystis* sp. by microscopic methods directly in stool samples, instead they are easily detected in the cultivation of parasites *in vitro*. The results of our studies showed a significant effect of the type of medium on the intensity of amoeboid cells generation by the same strains of *Blastocystis* sp. ($p < 0,05$). Generally, the PAF measurement reached a maximum value in one day or two days after MCVC was achieved in cultures on: $(8,5 \pm 4,7) \%$, $(14,2 \pm 3,8) \%$, $(14,9 \pm 4,4) \%$, $(17,8 \pm 5,5) \%$ and $(19,8 \pm 5,4) \%$ in mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM and RPMI/IMDMEM, respectively. The former four types of media were the most suitable for long-term subculture of *Blastocystis* sp. strains (SLTS=30). **Conclusion.** Established primary growth regularities of three cultures of *Blastocystis* sp. and their long-term subcultivation in mJones's, mLE, RPMI, IMDMEM and RPMI / IMDMEM media justify the appropriateness of the optimal medium type selection taking into consideration the goal and objectives of the proposed study. **Keywords:** *Blastocystis* sp., primary growth, nutrient media, amoeboid forms