

ДІАГНОСТИЧНА ПЕРСПЕКТИВНІСТЬ ОЦІНКИ ВІРУЛЕНТНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ШТАМІВ *BLASTOCYSTIS* SP. ЗА ПОКАЗНИКАМИ РІВНІВ УТВОРЕННЯ АМЕБОЇДНИХ ФОРМ ТА ПРОТЕАЗНОЇ АКТИВНОСТІ

Похил¹ С.І., Тимченко¹ О.М., Бодня² І.П.

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

²Харківський Національний медичний університет
МОЗ України

Вступ

Бластоцисти (*Blastocystis* sp.) - одноклітинні, анаеробні, еукариотичні найпростіші, які колонізують кишечник багатьох видів тварин, в тому числі і людей, що за певних обставин може привести до патологічних змін із низкою неспецифічних симптомів - біль у животі, діарея, метеоризм, анорексія, нудота, блювання, анальний свербіж, неконтрольоване схуднення тощо [1-4]. Із бластоцистною інвазією пов'язують також, хворобу Крона, синдром подразненого кишківника, алергодерматичні захворювання. До теперішнього часу у світовій медичній практиці діагноз «бластоцистоз» (МКХ-11, 1A35) ставиться за умови поєднання двох лабораторних критеріїв: виявлення в зразках фекалій клітин *Blastocystis* sp. у діагностично-значимій кількості: 5 і більше паразитів в полі зору при світловій мікроскопії мазків нативних фекалій (1% розчин Люголя, ×400); та виключення (за відсутністю) усіх інших відомих патогенів, які можуть спричинювати кишкову хворобу із неспецифічними симптомами.

Очевидно, що вказані лабораторні критерії діагностики бластоцистозу є неадекватними, так як не враховують ймовірність існування кишкових мікст-інфекцій, хибнонегативних результатів або недооцінки фактичного паразитарного навантаження через “непомітність” дрібних морфологічних форм паразитів у мазках. Зазвичай, в зразках фекалій (ЗФ) як нативних, так і збагачених виявляють основні морфологічні форми паразита, що є відображенням життєвого циклу - вакуолярну або форму центрального тіла, гранулярну, рідше - амебоїдну форму та цисти [2, 5]. На сьогодні накопичено достатньо наукових даних про нестійку позитивну кореляцію між кількістю виявлених клітин *Blastocystis* sp. в мокрих мазках та наявністю клінічних симптомів у пацієнтів, що пояснюється відмінностями рівнів вірулентного потенціалу конкретного штаму *Blastocystis* sp. [6-8]. Тому, цілком обґрунтованим є прагнення доповнити критерій кількісної детекції *Blastocystis* sp. додатковими критеріями оцінки вірулентного потенціалу конкретного виявленого штаму паразитів.

За останні два десятиріччя досягнуто значних успіхів у вивченні вірулентного потенціалу цих паразитів [9-14]. Варіювання рівня вірулентності пов'язують з: утворенням клітин амебоїдної форми, які здатні ефективно прилипати до епітелію кишечника, впливати на його імунний гомеостаз і викликати захисну запальну реакцію; продукцією паразитами

протеаз (переважно цистеїнових), що порушують щільні з'єднання епітелію слизової оболонки кишечника з пригніченням її бар'єрної функції і підвищення проникності, стимулюють клітини слизової оболонки виробляти інтерлейкін-8 (який індукуює механізм втрати рідини та запалення кишечника у постраждалих людей) та розщеплюють секреторний IgA, допомагаючи *Blastocystis* sp. ухилитися від захисту імунної системи, виживати в організмі хазяїна та колонізувати його шлунково-кишковий тракт; утворенням білків (цистатину, інгібіторів протеїнази типу 1, ендопептидази), відповідальних за інгібування протеаз хазяїна та зміну гомеостазу кишечника; продукцією супероксиддисмутази, відповідальної за антиоксидантний захист паразитів; антигенами *Blastocystis* sp., які стимулюють Т-хелпери 2-го типу, активують IgE-опосередковану алергічну відповідь, каскад комплементу з вивільненням анафілотоксинів, що, у свою чергу, спричинює суперактивацію опасистих клітин та інше; синтезом ряду вторинних метаболітів (продукованих полікетидсинтазою або нерибосомними пептидними синтазами), спроможних викликати контактну-незалежний апоптоз клітин хазяїна, порушення балансу кишкової мікробіоти (дисбактеріоз), загальну токсичну дію, забезпечувати резистентність найпростіших до лікарських препаратів тощо [2, 9, 15].

З точки зору технічної складності проведення досліджень для оцінки вірулентного потенціалу штамів *Blastocystis* sp. найбільш доступними (і загально визнаними багатьма науковцями) є методи визначення інтенсивності утворення амебоїдних форм та протеазної активності цих паразитів [1, 2, 12, 16-19].

Метою роботи було експериментальне обґрунтування визначення рівня вірулентного потенціалу культур *Blastocystis* sp. за показниками визначення відсотка утворюваних цими паразитами характерних амебоїдних морфологічних форм в культурі *in vitro* та рівня протеазної активності лізатів культур паразитів.

Матеріали та методи

Матеріалом для отримання штамів бластоцист слугували ЗФ від людей (n=12) різного походження, серед яких 3 ЗФ від асимптоматичних, та 9 від симптоматичних осіб. В усіх ЗФ (нативних, без збагачення) визначали паразитарне навантаження - як кількість клітин паразитів в полі зору мікроскопа (середня величина при перегляді 10 полів зору, світлова мікроскопія, загальне збільшення ×400 (мікроскоп “МИКМЕД-2” Ю-33.22.926, ВАТ «ЛОМО», РФ) їх мокрих мазків, забарвлених 1 % Люголя.

Культури *Blastocystis* sp. для визначення показників рівнів утворення амебоїдних форм (percentage of amoeboid forms - PAF) та протеазної активності (protease activity - Pa) отримано на базі Лабораторії нових та маловивчених інфекційних захворювань ДУ «ІМІ НАМН» культуральним методом із ЗФ як описано раніше [5, 20]. Коротко: фільтровані гомогенати свіжих ЗФ (200 мкл) висівали

в пробірці із 5,0 мл відновленого комбінованого рідкого середовища RPMI/IMDMEM із 10 % сироваткою та антибіотиками і вирощували в анаеробних умовах при $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$ [4, 9]. Показник максимальної концентрації життєздатних клітин (maximum concentration of viable cells – MCVC) визначали за допомогою гемоцитометра (камерах Горяєва) із 1 % розчином трипанового синього (“Sigma-Aldrich, Inc.”). Для підтримки росту субкультур штамів робили послідовні 10 пасажів, кожен через 3-4 доби після попереднього і культивували в аналогічних умовах. Посівна доза складала 0,5 мл суспензії *Blastocystis* sp. на 5,0 мл середовища, а виконання багаторазового субкультивування штамів істотно стабілізує їх властивості та мінімізує залишкову кількість компонентів фекалій і супутньої мікрофлори, що сприяє більш якісному очищенню суспензій клітин паразитів для дослідження їх протезної активності.

Метод визначення рівня утворення амебоїдних форм штамами Blastocystis sp.

Рівень утворення амебоїдних форм штамами *Blastocystis* sp. різного походження (3 культури від асимптоматичних людей, 9 від симптоматичних) визначали у період постекспоненційного росту (п’ята доба) їх первинних культур на комбінованому середовищі RPMI/IMDMEM шляхом розрахунку встановлювали відсоток (показник PAF) амебоїдних форм серед 300 підрахованих клітин *Blastocystis* sp. у тонких мазках гомогенізованих суспензій їх культур, стійко забарвлених модифікованим швидким методом за Філдом у модифікації ЛНМІЗ (mFRS) [21]. Величину показника PAF вираховували за формулою: $PAF = (N_{AF}/300) \times 100$, де N_{AF} – абсолютна кількість підрахованих амебоїдних форм. Світлову мікроскопію препаратів проводили на мікроскопі “МИКМЕД-2” Ю-33.22.926 з урахуванням результатів його калібрування і сумарних рівнів збільшення для окуляру С15 \times з лінійною шкалою та об’єктивом 40 \times /0,85 [5, 17, 21, 22]. Мікроскопічні критерії амебоїдних форм у вирощених *in vitro* культурах *Blastocystis* sp.: розмір 2,9-15,0 мкм, нерухома, неправильної форми найчастіше з одною чи двома (рідко з трьома) широкими псевдоподіями та лізосомоподібними відсіками, що можуть містити проковтнуті бактерії [19, 21].

Метод визначення рівня протеазної активності штамів Blastocystis sp.

Рівень протеазної активності (Pa) у штамів *Blastocystis* sp. визначали у лізатах клітин, які отримано у період завершення експоненційного росту (4 доба з найвищим значенням показника MCVC) із стабілізованих ксенічних культур паразитів. Для осадження клітин *Blastocystis* sp. 5,0 мл суспензії субкультур паразитів центрифугували (центрифуга лабораторна СМ-3 «MICROmed», ТОВ “ТОРГІВЕЛЬНИЙ ДІМ МІКРОМЕД”, Україна) при 500 g протягом 5 хв у центрифужних скляних градуйованих (на 10,0 мл) пробірках, супернатант видаляли, а осад тричі відмивали шляхом ресуспендування і осадження (за таких же умов центрифугування) у холодному ($t^{\circ} = (4-8)^{\circ}\text{C}$) стерильному фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) із рН=7,4 при співвідношенні об’ємів осаду і ФСБ 1:10.

Після останнього циклу відмивання осад ретельно ресуспендували у 1,0 мл ФСБ. Високоякісне очищення клітин *Blastocystis* sp. виконано методом швидкісного центрифугування на градієнті щільності, коротко: у круглодонні прозорі скляні пробірки вносили 3,0 мл стерильного холодного розчину гістопаку/Histopaque (далі - HPAQ (“Sigma-Aldrich, Inc.”) із градієнтом щільності (англ. density gradient, далі D) 1,077 г/мл, на який акуратно нашаровували близько 1,2-1,3 мл підготовленої у ФСБ суспензії клітин *Blastocystis* sp.; режим центрифугування 5000 g тривалістю 10 хв.

Суспензію очищених клітин *Blastocystis* sp. відбирали і звільняли від залишків HPAQ (який здатен впливати на активність протеаз) шляхом триразового ресуспендування та осадження (500 g протягом 5 хв) у ФСБ. Осад остаточно очищених клітин *Blastocystis* sp. ресуспендували в 0,5 мл ФСБ і за допомогою гемоцитометра визначали їх вихідну концентрацію, яку процедурою додавання потрібної кількості ФСБ доводили до близько 1×10^6 клітин/мл. Кількісно калібровані суспензії очищених клітин *Blastocystis* sp. переносили у стерильні пробірки типу “Eppendorf” (об’єм 1,5 мл) і до часу використання зберігали у замороженому стані при $t^{\circ} = -(28 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$.

Для звільнення протеаз із клітин *Blastocystis* sp. застосовано метод їх термічного лізису, коротко: проведено 15 послідовних циклів заморожування (при $t^{\circ} = -(28 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$) та швидкого відтаювання (при $t^{\circ} = (37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ на водяній бані) каліброваних суспензій клітин паразитів. Дебрис лізатів клітин *Blastocystis* sp. осаджували центрифугуванням при 500 g 2 хв, а супернатанти переносили у нові стерильні пробірки типу “Eppendorf”.

Рівень протеазної активності лізатів клітин штамів *Blastocystis* sp. визначали біохімічним методом кількісного колориметричного аналізу розщеплення азоказеїну з внесеними деякими змінами до базових протоколів, які його описують [16, 17]. Коротко: для активації протеаз лізати паразитів інкубували із 2 мМ дитіотрейтолу (DTT) (245 мкл лізату + 5 мкл 100 мМ водного розчину DTT) при $t = (37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ впродовж 10 хв (термостат електричному з водяною сорочкою ЗЦ-1125М); до 100 мкл активованого лізату додавали 100 мкл робочого розчину азоказеїну (“Sigma-Aldrich, Inc.”) (5 мг/мл азоказеїну у ФСБ із рН=7,4) та термостатували при $t = (37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ впродовж 1 год.; реакцію розщеплення азоказеїну зупиняли шляхом додавання до проінкубованої суміші лізат/азоказеїн 300 мкл 10 % (об’єм/об’єм) водного розчину трихлороцтової кислоти (ТХК, ТОВ “Хімлаборреактив”, Україна) та витримували на льоду впродовж 30 хв (у рідині утворюється добре видимий згусток); для видалення нерозщепленого азоказеїну та утвореного згустку суміш лізат/азоказеїн/ТХК центрифугували при 5000 g протягом 10 хв і отриманий супернатант переносили у нову пробірку типу “Eppendorf” із 500 мкл робочого (525 мМ) розчину NaOH (ТОВ “Хімлаборреактив”, Україна); 200 мкл розчину (із вивільненими азоолігопептидами внаслідок протезного гідролізу азоказеїну) вносили у плоскодонні лунки полістиролових, стрипованих 96-лункових планшет (ТОВ “ХЕМА”, Україна) та

виміряли на аналізаторі мікропланшетному LisaScan EM («Erba Lachema s.r.o.», Чехія) інтенсивність поглинання (абсорбції) при $\lambda=450$ нм. Експерименти з визначення Ра штамів *Blastocystis* sp. включали відтворення негативного (К-) і позитивного (К+) контрольних вимірювань. Для постановки негативних контролів реакцію розщеплення азоказеїну проводили з 100 мкл термоінактивованих (при $t = 90^\circ\text{C}$ упродовж 20 хв) лізатів клітин *Blastocystis* sp., а позитивних контролів – із 100 мкл робочого розчину трипсину (2,5 мг/мл трипсину у ФСБ із рН=7,4). Різниця інтенсивності абсорбції в експериментальній і лунці К- відображає рівень Ра конкретного штаму *Blastocystis* sp. Вимоги до рівня адсорбції у лунці К+ полягають у тому, що він у цілому повинен бути вищим ніж у всіх вимірних експериментальних лунках. Значення показника Ра подано у одиницях азоказеїну (AU, англ. azocasein unit). Одна AU це кількість ферментів (протеаз), що зумовлює збільшення вимірюваної

оптичної щільності (ОЩ) продуктів гідролізу азоказеїну на 0,01 одиниці ОЩ за годину.

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

Рівень утворення амебоїдних форм штамами *Blastocystis* sp. різного походження

Зведені результати визначення здатності і рівня утворення амебоїдних форм штамами *Blastocystis* sp. різного походження представлено у табл. 1, дані щодо визначення паразитарного навантаження (середні показники) нативних ЗФ зазначено в примітках.

Табл. 1 - Здатність і рівень утворення амебоїдних форм штамами *Blastocystis* sp. різного походження

Джерело походження штамів <i>Blastocystis</i> sp., їх умовні позначки та кількість (n)	Здатність і рівень утворення амебоїдних форм штамами <i>Blastocystis</i> sp.	
	кількість штамів <i>Blastocystis</i> sp., у первинних культурах яких виявлено амебоїдні форми	величина показника PAF у відсотках, ($M\pm m$)
із ЗФ від асимптоматичних осіб, А1-А3 ¹⁾ , n = 3	1	2,3
із ЗФ від симптоматичних осіб, С1-С9, n = 9, у тому числі: С1-С3 ²⁾ , n = 3; С4-С6 ³⁾ , n = 3; С7-С9 ⁴⁾ , n = 3	1 3 3	1,7 17,6±6,2 19,8±5,4

Примітки :¹⁾ – штами *Blastocystis* sp. були виділені від асимптоматичних осіб із низькою концентрацією паразитів у ЗФ (від 0,2 до 0,8 клітин у полі зору);²⁾ – штами *Blastocystis* sp. були виділені від симптоматичних осіб із низькою концентрацією паразитів у ЗФ (від 0,6 до 0,9 клітин у полі зору);³⁾ – штами *Blastocystis* sp. були виділені від симптоматичних осіб із помірною, але нижчою за діагностично-значимий рівень, концентрацією паразитів у ЗФ (від 2,5 до 3,8 клітин у полі зору); ⁴⁾ – штами *Blastocystis* sp. були виділені від симптоматичних осіб із помірною та високою концентрацією паразитів у ЗФ, що досягала її діагностично-значимого показника (≥ 5 клітин у полі зору).

На рис. 1 представлено приклади мікроскопічної картини осаду культур бластоцист після вирощування *in vitro*.

Аналіз даних табл. 1 окреслив наступні положення щодо діагностичної перспективності оцінки вірулентного потенціалу клінічних штамів *Blastocystis* sp. за показником рівня утворення амебоїдних форм. По-перше, при дослідженні ЗФ мікроскопічними методами досить складно виявляти/ідентифікувати амебоїдні форми *Blastocystis* sp., що обумовлює відносно низьку частоту таких знахідок навіть у ЗФ від симптоматичних осіб із помірною чи високою (останню у табл. позначено терміном “багато”) концентрацією *Blastocystis* sp. [1,

2, 4, 19, 22]. Нами поодинокі амебоїдні форми вдалося виявити лише у 2 (16,7 %) ЗФ від симптоматичних осіб із високою концентрацією паразитів (≥ 5 клітин у полі зору). Навпроти, у вирощених *in vitro* первинних культурах *Blastocystis* sp. амебоїдні форми виявляються/ідентифікуються легко навіть за умов застосування швидких і простих способів стійкого забарвлення мазків суспензій паразитів, на кшталт - mFRS (рис. 1). Серед 12 досліджених нами первинних культур *Blastocystis* sp. у 8 (66,7 %) були виявлені амебоїдні форми, що значимо перевищило вище вказану величину аналогічного показника прямої копроскопії ($p \leq 0,05$).

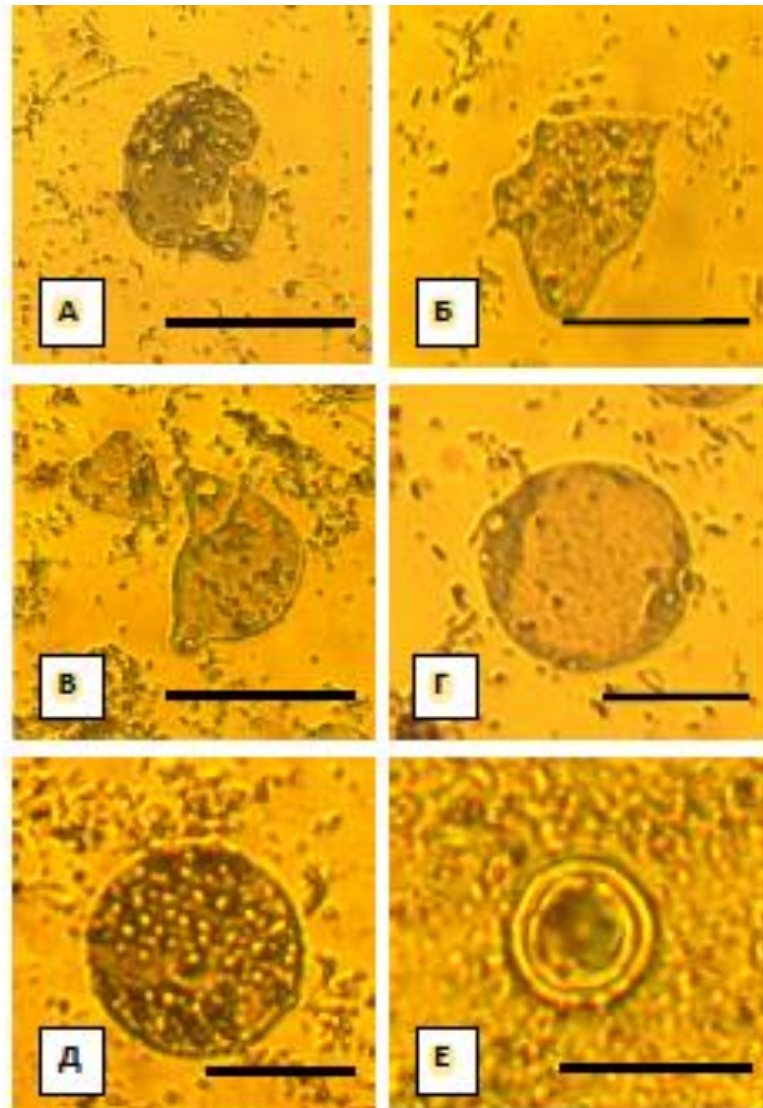


Рис.1. Різноманітні амебоїдні форми *Blastocystis* sp. (А, Б і В), які легко відрізнити від клітини вакуолярної (Г), гранулярної форми (Д) та цист (Е) у мазках первинних культур паразитів, стійко забарвлених mFRS (світлова мікроскопія $\times 600$, суха імерсія, реперна мітка 10 мкм).

Отже, значення r_{ϕ} між сумарними результатами (негативні + позитивні) щодо виявлення амебоїдних форм *Blastocystis* sp. у ЗФ від осіб «Blast+» мікроскопічним та культуральним методами рівне нулю, а – між вибірками лише позитивних результатів становить – 0,5, що додатково підтверджує (відзначену і зарубіжними науковцями) значно вищу ефективність і доцільність застосування культурального методу для виявлення/ідентифікації вірулентних амебоїдних форм паразитів [1, 2, 5, 17, 19, 20].

По-друге, крім підвищення частоти виявлення у ЗФ амебоїдних форм *Blastocystis* sp., використання культурального методу дозволяє визначати й інтенсивність їх утворення конкретними штамами цих паразитів. Із представлених у табл. 1 даних зрозуміло, що амебоїдні форми *Blastocystis* sp. можуть бути присутніми в первинних культурах найпростіших, вирощених із ЗФ як від асимптоматичних осіб (рідко), так і – від симптоматичних пацієнтів (у переважній більшості). При цьому, найнижчі значення показника PAF (у межах від 1,7 % до 2,3 %) встановлено у штамі

Blastocystis sp., які належать до груп С1-С3 та А1-А3 відповідно, і були отримані із ЗФ з низькою вихідною концентрацією клітин паразитів. У штамі *Blastocystis* sp. груп С4-С6 і С7-С9 (від симптоматичних осіб з помірною та високою вихідною концентрацією клітин паразитів) величини показника PAF були найвищими (але істотно не різнилися між собою, $p > 0,05$) та варіювали у певних штамі цих двох груп від 11,4 % до 25,2 %. Тобто, різниця між найвищим фактичним значенням PAF, встановленим для груп штамі *Blastocystis* sp. А1-А3 і С1-С3, та найнижчою фактичною величиною цього показника у групах штамі С4-С6 і С7-С9 сягає близько 5 разів. Таким чином, у первинних культурах *Blastocystis* sp., вирощених із ЗФ від різних груп осіб з низьким рівнем паразитарної колонізації, амебоїдні форми цих найпростіших не спостерігаються (відносно частіше), або виявляються (відносно рідше) у низькому рівні, який за результатами наших досліджень не перевищує 3 %. Натомість, у культурах *Blastocystis* sp., вирощених із ЗФ від симптоматичних осіб із помірною і високою

концентрацією клітин паразитів, амебоїдні форми виявляються завжди, а їх відносна кількість у період постекспоненційного росту (5 доба) в усіх досліджених штамів *Blastocystis* sp. перевищувала 10 %. Висновки переважної більшості закордонних науковців стосовно вірогідності утворення амебоїдних форм в культурах *Blastocystis* sp., отриманих від асимптоматичних і симптоматичних осіб, є ще більш категоричними і їх суть полягає в тому, що штами паразитів від асимптоматичних осіб не утворюють амебоїдні форми, а штами від симптоматичних людей такі морфформи клітин інтенсивно генерують [1, 2, 20, 17, 19]. Лише в окремих роботах іноземних фахівців вказується на можливість утворення амебоїдних форм в культурах *Blastocystis* sp., отриманих після висіву ЗФ від асимптоматичних осіб [20]. Тому, наявність амебоїдних форм запропоновано вважати ознакою (показником) патогенних штамів *Blastocystis* sp., відповідальних за виникнення симптомів у хворих на бластоцистоз. [2, 11, 12, 19].

По-третє, хоча інтенсивність генерації амебоїдних форм конкретними штамми *Blastocystis* sp. у певній мірі прямо корелює з наявністю і рівнем прояву інших факторів патогенності у цих паразитів [17, 23], слід враховувати, що фактичне значення показника PAF у одних і тих самих штамів *Blastocystis*

sp. істотно варіює в залежності від типу живильного середовища, використаного для їх вирощування [5, 20, 24]. Крім того, нами не виявлено значимої різниці величин PAF ($p \geq 0,05$), визначених у груп штамів *Blastocystis* sp., вирощених із ЗФ від симптоматичних осіб із вихідною помірною (C4-C6) і високою (C7-C9) концентрацією клітин паразитів (табл. 1). Це демонструє не завжди виправдану умовність неухильного дотримання такого, ще широко вживаного сьогодні критерію лабораторної діагностики бластоцистозу, як виявлення ≥ 5 клітин *Blastocystis* sp. у полі зору тимчасово забарвлених мокрих мазків незбагачених фекалій при мікроскопічному дослідженні із загальним збільшенням $\times 400$.

Рівень протеазної активності штамів *Blastocystis* sp. різного походження

Зведені результати визначення рівня протеазної активності лізатів клітин штамів *Blastocystis* sp. різного походження представлено на рисунку 2. Аналіз експериментальних даних, відображених на рис. 2 дозволяє сформулювати наступні положення щодо діагностичної перспективності оцінки вірулентного потенціалу клінічних штамів *Blastocystis* sp. за показником Ра лізатів їх клітин.

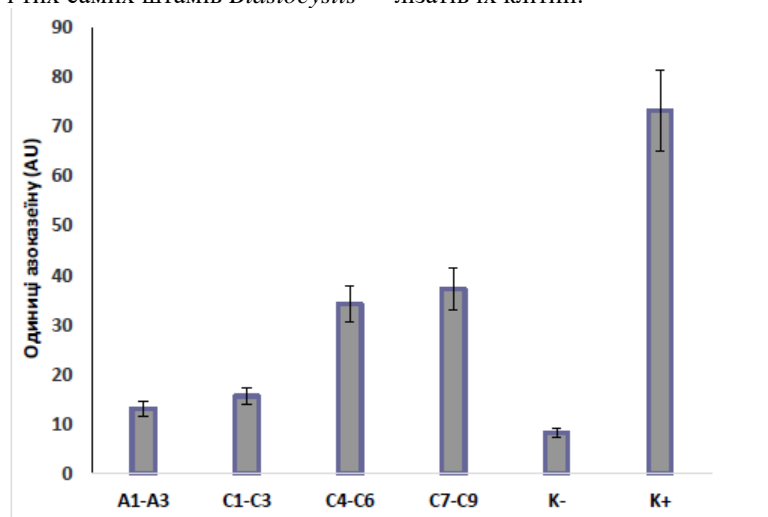


Рис. 2. Рівень протеазної активності лізатів клітин штамів *Blastocystis* sp. різного походження

Одна одиниця азоказеїну (AU) це кількість протеаз із ферментативною активністю, що зумовлює збільшення вимірюваної оптичної щільності (ОЩ) продуктів гідролізу азоказеїну на 0,01 одиниці за годину. A1-A3 – лізати клітин штамів *Blastocystis* sp., які були виділені від асимптоматичних осіб із низькою концентрацією паразитів у ЗФ (від 0,2 до 0,8 клітин у полі зору), C1-C3 – лізати клітин штамів *Blastocystis* sp., які були виділені від симптоматичних осіб із низькою концентрацією паразитів у ЗФ (від 0,6 до 0,9 клітин у полі зору). C4-C6 – лізати клітин штамів *Blastocystis* sp., які були виділені від симптоматичних осіб із помірною, але нижчою за діагностично-значимий рівень, концентрацією паразитів у ЗФ (від 2,5 до 3,8 клітин у полі зору). C7-C9 – лізати клітин штамів *Blastocystis* sp., які були виділені від симптоматичних

осіб із помірною та високою концентрацією паразитів у ЗФ, що досягала її діагностично-значимого показника (≥ 5 клітин у полі зору). K- - негативний контроль, при відтворенні якого реакцію розщеплення азоказеїну проводили з термоінактивованими (при $t = 90^\circ\text{C}$ упродовж 20 хв) лізатами клітин *Blastocystis* sp. K+ - позитивний контроль, при відтворенні якого реакцію розщеплення азоказеїну проводили з робочим розчином трипсину (2,5 мг/мл трипсину у ФСБ із $\text{pH}=7,4$).

По-перше, відтворення методу визначення рівня Ра є більш технологічно складним, праце- і матеріалозатратним, що, в основному, обумовлено необхідністю отримання стабілізованих, очищених ксенічних культур паразитів, поліетапністю проведення самої реакції розщеплення азоказеїну; та потребою спеціального приладу для виміру

інтенсивності поглинання (абсорбції) продуктів реакції при $\lambda = (440-450)$ нм (рис. 3). Крім того, використаний нами і рядом іноземних науковців [16, 17, 23] режим термоінактивації лізатів клітин *Blastocystis* sp. (при $t = 90$ °C упродовж 20 хв) для відтворення негативного контролю (К-) при проведенні реакції розщеплення азоказеїну не забезпечує повне пригнічення активності звільнених протеаз (із залишковою $P_a = (8,3 \pm 0,9)$ AU), що певною мірою зменшує різницю інтенсивності абсорбції в експериментальній і лунці К-, яка відображає рівень показника P_a конкретного штаму *Blastocystis* sp. (рис. 2 і 3).

Зазначене обґрунтовує необхідність проведення додаткових досліджень, спрямованих на

розробку більш адекватного негативного контролю для проведення реакції розщеплення азоказеїну протеазами *Blastocystis* sp. Навпроти, застосований нами і широко вживаний дослідниками інших країн світу при проведенні реакції розщеплення азоказеїну лізатами клітин *Blastocystis* sp., позитивний контроль (К+), який ґрунтується на використанні ферментативної активності розчину трипсину (2,5 мг/мл трипсину у ФСБ із рН=7,4) показав цілковиту придатність і забезпечив значно вищий рівень адсорбції у лунці К+ (із показником $P_a = (73,3 \pm 8,1)$ AU) ніж у всіх вимірних експериментальних лунках (рис. 2, 3).

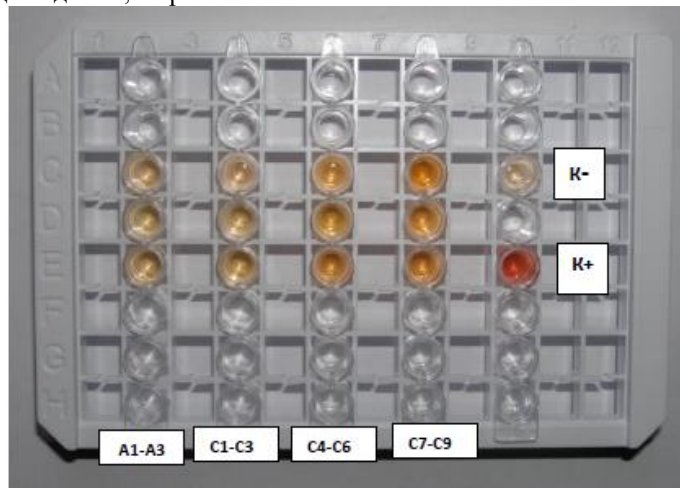


Рис. 3. Зовнішній вигляд планшету полістиролового стрипованого із внесеними у плоскодонні лунки продуктами реакції розщеплення азоказеїну для вимірювання у них інтенсивності абсорбції при $\lambda = 450$ нм.

Лунки із продуктами реакції розщеплення азоказеїну лізатами клітин, отриманих із штамів *Blastocystis* sp. груп: А1-А3, С1-С3, С4-С6 та С7-С9 (дивися пояснювальні дані до рис. 2). К- і К+ - лунки із продуктами реакції розщеплення азоказеїну, що слугують негативним та позитивним контролем відповідно (див. пояснювальні дані до рис. 2).

По-друге, за величиною показника P_a виявлено виразну закономірність подібності та відмінності досліджених лізатів клітин, отриманих із штамів *Blastocystis* sp. різних груп. Значення показника P_a було досить близьким ($p > 0,05$) у лізатів клітин штамів груп А1-А3 і С1-С3 та груп С4-С6 і С7-С9 (рис. 2). При цьому, у лізатів клітин штамів груп А1-А3 і С1-С3 величина P_a відповідно становила $(13,1 \pm 1,5)$ AU і $(15,7 \pm 2,0)$ AU та була істотно нижчою, ніж у лізатів клітин штамів груп С4-С6 і С7-С9, в яких вона сягала значень $(34,3 \pm 3,8)$ AU і $(37,4 \pm 4,1)$ AU відповідно ($p \leq 0,05$). Отже, за результатами наших досліджень встановлено, що штами *Blastocystis* sp. груп А1-А3 і С1-С3, які були отримані із ЗФ від асимптоматичних і симптоматичних осіб із низькою вихідною концентрацією клітин паразитів, характеризуються відносно низькою протеазною активністю, котра не досягає 20 AU. На противагу цьому, штамам *Blastocystis* sp. груп С4-С6 і С7-С9, вирощених, відповідно, із ЗФ від симптоматичних осіб з помірною

та високою вихідною концентрацією клітин паразитів, притаманний значимо вищий (фактично більш ніж у 2 рази) рівень дії протеаз, який перевищує 30 AU, що рекомендовано вважати ознакою вірулентних штамів *Blastocystis* sp.

По-третє, в усіх досліджених групах штамів *Blastocystis* sp. різного походження спостерігається наявність прямої сильної позитивної кореляції між показниками рівнів утворення амeboїдних форм та протезної активності. У штамів *Blastocystis* sp. із рівнем PAF < 3 % величина $P_a < 20$ AU, а у штамів паразитів із значенням PAF > 10 %, рівень $P_a > 30$ AU. Отже, штамам *Blastocystis* sp. груп С4-С6 і С7-С9 (які отримано із ЗФ від симптоматичних осіб з помірною та високою вихідною концентрацією клітин паразитів, відповідно) притаманні обидва рекомендовані критерії вірулентності – показники PAF і P_a , що досягли величини визначеного нами диференційного порогу. Більш того, між фактичними значеннями PAF і P_a у штамів *Blastocystis* sp. С4-С9 ($n = 6$) емпіричний коефіцієнт кореляції (r_{PAF/P_a}) сягає + 0,95.

До аналогічного висновку прийшли і фахівці кафедри паразитології університету Малайї (Малазія) [17]. Вони показали, що підвищена активність протеаз була притаманна ізолятам *Blastocystis* sp., які утворюють більший відсоток амeboїдних форм, а між фактичними величинами показників PAF і P_a у штамів паразитів від

симптоматичних осіб (n = 5) коефіцієнт кореляції становить + 0,964.

Висновки

1. Проведена оцінка рівня вірулентності за інтенсивністю утворення амебоїдних форм (PAF) та протеазною активністю (Pa) 12 клінічних ізолятів *Blastocystis* sp. різного походження показала, що штамам, виділеним із ЗФ від симптоматичних осіб з помірною та високою вихідною концентрацією клітин паразитів, притаманні значимо вищі показники PAF (майже у 5 разів) та Pa (у 2 рази і більше) у порівнянні із штамми, виділеними із ЗФ від асимптоматичних та симптоматичних осіб із низькою вихідною концентрацією клітин паразитів ($p \leq 0,05$). Ознаками вірулентних штамів *Blastocystis* sp. запропоновано вважати рівні PAF > 10 % та Pa > 30 AU.

2. З урахуванням виявлених ряду технічних переваг та прямої сильної позитивної кореляції між величинами показників PAF і Pa (яка у вірулентних ізолятів *Blastocystis* sp. сягає $r_{PAF/Pa} = +0,95$) рекомендовано у медичній практиці оцінку вірулентного потенціалу клінічних штамів *Blastocystis* sp. проводити за показником PAF при наявності підозри у пацієнта захворювання на бластоцистоз та за умов: негативного результату виявлення амебоїдних форм паразитів безпосередньо у його ЗФ із помірною концентрацією інших морфоформ *Blastocystis* sp. (> 2 клітин у полі зору), але нижчою за прийнятий критерій діагностично-значимої концентрації (≥ 5 клітин у полі зору).

3. Додатковим лабораторним критерієм діагностики бластоцистозу запропоновано вважати виявлення вірулентного штаму *Blastocystis* sp., який у первинній культурі (на п'яту добу *in vitro* вирощування на живильному середовищі RPMI/IMDMEM) генерує амебоїдні форми з величиною показника PAF > 10 %.

Ключові слова: *Blastocystis* sp., протеазна активність, амебоїдні форми, *in vitro*.

Diagnostic perspectives of evaluation of virulent potential *Blastocystis* sp. strains according to index of percentage of amoeboid forms and protease activity Pokhil S.I., Tymchenko O.M., Bodnya I.P.

Introduction. *Blastocystis* is single-celled, anaerobic, eukaryotic protozoa, that colonizes the intestines of many species animals and humans and induce pathological changes with a number of nonspecific symptoms - abdominal pain, diarrhea, flatulence, anorexia, nausea, vomiting, anal itching, uncontrolled weight loss. The combination of two criteria - the detection ≥ 5 cells of *Blastocystis* sp. observed in the field of view under light microscopy with $\times 400$ magnification and the exclusion of the role of other pathogens is today used to diagnose blastocystosis. Recently, the study of the virulence potential has yielded many new results. Methods for determining the number of amoeboid forms and measuring the protease activity of lysates are simple and promising. **The goal of this study was** experimental reasoning for determining the level of virulent potential *Blastocystis* sp. strains of using indicators of the

percentage amoeboid forms (PAF) formation *in vitro* culture and the level of protease activity (Pa) lysates.

Materials and Methods. 12 strains of *Blastocystis* sp. isolated from different faecal samples (FS) were used, which were 3 from asymptomatic and 9 from symptomatic patients. The parasitic burden of native 12 FS was determined by light microscopy ($\times 400$ magnification, 1% Lugol's solution) of wet smears (mean number cell in 10 view fields). 200 μ l native fresh FS was inoculated in 5 ml of liquid media RPMI/IMDMEM with serum and antibiotics. *Blastocystis* sp. culture growth was carried out under anaerobic conditions at 37 °C for 5 days (determination PAF); and 10 sequential passages in the same medium to stabilize cultures (for Pa lysate). The value of the PAF index for each strain was determined by calculating the percentage of amoeboid forms in 300 counted parasite cells in suspensions smears stained by modified Field's stain method. Pa was determined using 4-day stabilized blastocyst cultures. Cells were precipitated three times at 500 g for 5 min and washed in PBS. Histopaque (1.077 g/ml) was used for the final cleanup (5000 g 10 min). The required concentration of 1×10^6 cell/ml was determined using haemocytometer, adding PBS. We used 15 cycles of freeze and defrosting to outflow proteases from cells. The biochemical method of azocasein cleavage by colorimetric analysis (LisaScan EM analyzer, $\lambda=450$ nm) was used to determine Pa lysates of *Blastocystis* sp.

Results & Discussion. Amoeboid forms were found in 8 out of 12 (66.7%) *Blastocystis* sp. cultures, which exceeds that of direct coproscopy ($p \leq 0.05$). The lowest levels of PAF (1.7-2.3%) were found in strains that had a low parasites concentration in stool samples. Strains from two groups of patients that had a low parasitic load in the faeces had low levels of Pa (<20 AU). Conversely, strains from symptomatic individuals, and moderate to high parasite counts (2.5-3.8 and ≥ 5 per field, respectively) had levels Pa > 30 AU, which is a sign of virulence. Despite the fact that the generation of amoeboid forms correlates with the pathogenicity of parasites, it should be taken into account that the PAF index depends on the type of nutrient media. We noted a strong positive correlation between PAF a values and Pa values in the strains: in cultures with PAF < 3%, the value of Pa < 20 AU, and in parasites with PAF > 10%, the level of Pa > 30 AU.

Conclusion. *Blastocystis* sp. strains from individuals with symptoms and a moderate to severe parasitic load of faecal samples had higher PAF and Pa values ($p \leq 0.05$). We recommend doing an assessment of the virulence potential with the determination of PAF in culture under the following conditions: suspicion of blastocystosis, amoeboid forms are absent, but other morphoforms are present in medium concentrations in smears of native faeces. Virulente signs of blastocystis strains should be considered under the condition - PAF > 10% and Pa > 30 AU.

Keywords: *Blastocystis* sp., protease activity, amoeboid forms, *in vitro*.

References

1. Tan K.S.W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp.

- Clin. Microbiol. Rev. 2008. 21 (4): 639-665. DOI: 10.1128/CMR.00022-08.
2. Parija S.C., Jeremiah S.S. Blastocystis: Taxonomy, biology and virulence. Trop. Parasitol. 2013. (1):17-25. DOI: 10.4103/2229-5070.113894.
 3. 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. DOI: 10.1186/1471-2334-13-389.
 4. Dagci H., Kurt O., Demirel M. et al. Epidemiological and diagnostic features of Blastocystis infection in symptomatic patients in Izmir province, Turkey. Iran. J. Parasitol. 2014. 9 (4): 519-529. URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25759733>.
 5. Pokhil S.I., Tymchenko O.M., Chigirinskaya N.A. et al. Regularities of primary growth of *Blastocystis* sp. in five types of nutrient media. Annals of Mechnikov Institute. 2021. 4: 45-53. DOI: 10.5281/zenodo.5761243
 6. Tito R.Y., Chaffron S., Caenepeel C. et al. Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. Gut microbiota. 2019. 68: 1180-1189. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316106.
 7. Leder K., Hellard M.E., Sinclair M.I. et al. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. J. Gastroenterol. Hepat. 2005. 20 (9): 1390-1394. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2005.03868.x
 8. Yason J.A., Liang Y.R., Png C.W. et al. Interactions between a pathogenic Blastocystis subtype and gut microbiota: in vitro and in vivo studies. Microbiome. 2019. 7(30). DOI: 10.1186/s40168-019-0644-3.
 9. Wawrzyniak I., Poirier P., Viscogliosi E. et al. Blastocystis, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. Ther. Adv. Infect. Dis. 2013. 1 (5): 167-178. URL : DOI: 10.1177/2049936113504754.
 10. Karamati S.A., Mirjalali H., Niyayati M. et al. Association of *Blastocystis* ST6 with higher protease activity among symptomatic subjects. BMC Microbiol. 2021. 21 (1): 285. DOI: 10.1186/s12866-021-02341-9.
 11. Badparva E., Kheirandish F. *Blastocystis hominis*: A Pathogenic Parasite. Arch. Clin. Infect. Dis. 2020. 15 (4). DOI: 10.5812/archcid.97388.
 12. Ajjampur S.S., Tan K.S.W. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from in vitro and in vivo studies. Parasitol. Int. 2016. 65 (6): 772-779. DOI: 10.1016/j.parint.2016.05.007.
 13. Puthia M.K., Vaithilingam A., Lu J. et al. Degradation of human secretory immunoglobulin a by Blastocystis. Parasitol. 2005. 97 (5): 386-389. DOI: 10.1007/s00436-005-1461-0.
 14. Iguchi A., Yoshikawa H., Yamada M. et al. Expression of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis* sp. strain RN94-9. Parasitol. Res. 2009. 105 (1): 135-140. DOI: 10.1007/s00436-009-1373-.
 15. Vielma J.R. Blastocystosis: Epidemiological, clinical, pathogenic, diagnostic, and therapeutic aspects. Invest. Clin. 2019. 60 (1): 53-78. DOI: 10.22209/IC.v60n1a06.
 16. Sio S.W.S., Puthia M.K., Lee A.S.Y. et al. Protease activity of *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 2006. 99 (2): 126-130. DOI: 10.1007/s00436-006-0131-1.
 17. Rajamanikam A., Govind S. Amoebic forms of *Blastocystis* spp. - evidence for a pathogenic role. Parasit. Vectors. 2013. 6: 295. DOI: 10.1186/1756-3305.
 18. Roberts T., Stark D., Harkness J. et al. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. Gut pathogens. 2014. 6 (17): 9. DOI: 10.1186/1757-4749-6-17.
 19. Tan T.C., Suresh K.G. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. Parasitol. Res. 2005. 98 (3): 189-193. DOI: 10.1007/s00436-005-0033-7.
 20. de Melo G.B., Roldan W., Malta F. et al. Culture isolation and molecular identification of *Blastocystis* sp. in Brazilian human isolates: preliminary results. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2020. 62 (51): DOI: 10.1590/s1678-9946202062051.
 21. Ragavan A.D., Govind S.K. Modified Fields' stain: ideal to differentiate *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* sp. Parasitol. Res. 2015. 114 (3): 1163-1166. DOI: 10.1007/s00436-014-4296-8.
 22. Vielma J.R. Blastocystosis: Epidemiological, clinical, pathogenic, diagnostic, and therapeutic aspects. Invest. Clin. 2019. 60 (1): 53-78. DOI: 10.22209/IC.v60n1a06.
 23. Rajamanikam A., Hooi H.S., Kudva M. [et al.] Resistance towards metronidazole in *Blastocystis* sp.: A pathogenic consequence. PLoS ONE. 2019. 14 (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0212542.
 24. Zhang X., Qiao J., Wu X. et al. In vitro culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. Int. J. Infect. Dis. 2012. 16 (1): e23-e28. DOI: 10.1016/j.ijid.2011.09.012.