

# **JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**KATEDRA ANATOMIE A FYZIOLOGIE HOSPODÁŘSKÝCH  
ZVÍŘAT**

---

Studijní program: B4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Blastocystis u prasat**

Vedoucí bakalářské práce:  
**Mgr. Martin Kostka, Ph.D.**

Autor bakalářské práce:  
**Lakatosová Lucie**

---

2010

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Zemědělská fakulta  
Akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie LAKATOSOVÁ**  
Osobní číslo: **Z07382**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Zootechnika**  
Název tématu: **Blastocystis u prasat**  
Zadávací katedra: **\*\*\*Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

**Cíl práce:** vypracovat literární rešerši k danému tématu. Ve vybraném chovu prasat podchytit výskyt prvoků rodu *Blastocystis*, případně dalších střevních prvoků.

**Metodika:** na základě dostupné literatury se studentka seznámí s danou problematikou a vypracuje literární přehled. Ve zvoleném chovu bude odebírat vzorky výkalů zvířat a zaznamenávat jejich zdravotní stav, zejména výskyt průjmových onemocnění. Vzorky vyšetří pomocí kultivace na výskyt střevních prvoků, zejména rodu *Blastocystis*. K identifikaci prvoků použije optickou mikroskopii. Výsledky vyšetření budou statisticky zpracovány a prezentovány pomocí tabulek a grafů.

**Finanční zajištění:** finance na materiální zajištění práce budou poskytnuty z grantu MSM 6007665806.


Rozsah grafických prací: tabulky a grafy  
Rozsah pracovní zprávy: přibližně 35 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:


- Foreyt W J: Veterinary parasitology, reference Manual. Iowa, 2001, 235s.
- Horák P et al.: Paraziti a jejich biologie. Praha, 2007, 393s.
- Rommel M et al.: Veterinarmedizinische Parasitologie. Berlin, 2000, 915s.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Martin Kostka, Ph.D.**  
\*\*\*Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Datum zadání bakalářské práce: **23. března 2010**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2010**

  
prof. Ing. Míloslav Šoch, CSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studeňská 13  
370 05 České Budějovice

  
prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 23. března 2010

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Blastocystis* u prasat vypracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala na konci práce. Současně dávám svolení k tomu, aby tato bakalářská práce byla zveřejněna elektronickou cestou v přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích

.....

Podpis studenta

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu práce Mgr. Martinovi Kostkovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování bakalářské práce.

## ABSTRAKT

Rod *Blastocystis* patří mezi anaerobní jednobuněčné, polymorfní organismy osidlující nižší trávicí trakt mnoha druhů bezobratlých i obratlovců včetně člověka. Rozsáhlá genetická a hostitelská rozmanitost tohoto prvoka je obrovská. Existují různé podtypy, které jsou schopny osidlovat trávicí trakt jen některých hostitelů. Například podtyp č. 3 je zřejmě jediným podtypem lidského původu a je zřejmě proto nejčastěji izolovaným podtypem u lidí. Není celkem jasné, kolik druhů rodu *Blastocystis* existuje. Každopádně nejlépe prozkoumaným druhem je *B. hominis*, vyskytující se u člověka. Existuje možnost, že *Blastocystis* mohou zapříčínovat různé choroby či se podílejí na průběhu nemoci. A lze je nalézt jak u zdravých jedinců tak u pacientů s gastrointestinální poruchou. Nakažení se blastocystami je poměrně snadné vzhledem k tomu, že tento prvek se přenáší pomocí orální cesty ve formě cyst. To je také důvod proč se *Blastocystis* v epidemiologických průzkumech vyskytují v poměrně hojném počtu.

V roce 2009/2010 jsem ve šlechtitelském a produkčním chovu prasat odebírala vzorky od různých kategorií (chovné neboli aukční prasnice a kanci, samice jalové, březí, kojící, běhouni a od jednoho kance tzv. prubíře). Celkem jsem odebrala 46 vzorků u kterých jsem provedla vyšetření kultivační metodou podle Dobell-Leidlaw. Ve většině vzorků jsem našla *Blastocystis* a v menší míře trichomonády.

Klíčová slova: *Blastocystis*, trichomonády, prasata, podtypy

## **ABSTRACT**

The genus *Blastocystis* belongs among anaerobic unicellular, polymorphic organisms living in intestinal tract of many invertebrates and vertebrates including humans. Genetic variability and spectrum of hosts of this protist is tremendous. Several subtypes exist that are able to inhabit intestine of specific hosts. For example, the subtype 3 is probably the only human-borne subtype and is therefore most often isolated human subtype. It not clear how many species of *Blastocystis* exist. Anyway, the best known one is *B. hominis* isolated from humans. It is possible that *Blastocystis* is responsible for some diseases. It can be found in both healthy individuals and patients with gastrointestinal disorders. The *Blastocystis* infection can spread easily via orally transmitted cysts. *Blastocystis* is commonly found in epidemiological studies.

During the year 2009/2010 I collected samples in the breeding and production facilities of a pig farm from different categories (bred or auction sows and boars, female barren, gravid, suckling, and one bred boar). A total of 46 samples was cultivated using two-phase media (Dobell Leidlau). In most specimens I found *Blastocystis* and, to a lesser extent, trichomonads.

Keywords: *Blastocystis*, *Trichomonas*, pigs, subtypes

## Obsah:

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Blastocystis.....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Taxonomie parazita.....	10
2.1.2 Podtypy .....	11
2.1.3 Základní charakteristika .....	13
2.1.4 Morfologie .....	14
2.1.5 Životní cyklus .....	17
2.1.6 Kultivace .....	19
2.1.7 Mikroskopie .....	19
2.1.8 Prevalence a epidemiologie.....	20
2.1.9 Infekce a nemoci .....	20
2.1.10 Léčba .....	21
2.1.11 Zvířecí model .....	22
<b>2.2 Trichomonády .....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Taxonomie parazita.....	23
2.2.2 Základní charakteristika .....	23
2.2.3 Tritrichomonas .....	24
2.2.4 Tetratrichomonas.....	25
<b>3. MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>28</b>
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>30</b>
<b>5. DISKUZE .....</b>	<b>34</b>
<b>6. SOUHRN .....</b>	<b>35</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>37</b>



# 1. ÚVOD

*Blastocystis hominis* je střevní prvok, parazit, který byl poprvé popsán počátkem 20. století, ale až v letech 1970 - 1980 Charles Zierdt upoutal pozornost biologů a lékařů studii tohoto organismu. Jeho mikroskopické rysy následně popsal (Zierdt et al. 1967 podle Stenzel a Boreham,1996), které byly založeny na morfologických a fyziologických kritériích.

Cílem mé bakalářské práce bylo především vypracovat literární přehled týkající se prvoků rodu *Blastocystis*. Vzhledem k tomu, že pomocí použitých kultivačních metod jsou běžně zachyceni také střevní bičíkovci ze skupiny *Parabasala*, je několik stran věnováno i nejběžnějším zástupcům této skupiny u prasat. Součástí práce bylo také praktické ověření situace v chovech prasat - zjištění, zda se ve mnou vybraných chovech vyskytují *Blastocystis* a střevní bičíkovci. A zda je jejich výskyt ovlivněn věkem prasat.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Blastocystis

Přesto, že prvoci rodu *Blastocystis* byli objeveni téměř před 100 lety, pokrok ve výzkumu byl postupný a náročný vzhledem k malému počtu laboratoří pracujících na výzkumu tohoto parazita. Doposud byla morfologie *Blastocystis hominis* studována pomocí světelné a elektronové mikroskopie, ale všechny ostatní aspekty její biologie jsou i nadále málo probádanou oblastí. Nicméně, dostupnost četných a rozmanitých molekulárních nástrojů a jejich aplikace do studie *Blastocystis* nás přivedla blíže k pochopení jejich biologie. (Stenzel a Boreham, 1996)

#### 2.1.1 Taxonomie parazita

*Blastocystis hominis* je střevní prvok, parazit, který byl poprvé popsán v roce 1912 Brumtem (Brumt 1912 podle Stenzel a Boreham, 1996). Dřívější studie *Blastocystis* spp. ukazovaly na to, že se jedná o klidová stadia bičíkovců, kvasinky, nebo že jde pouze o rostlinný materiál či spory plísní. Ale nedařilo se je kultivovat na médiu pro houby a byly odolné i vůči protiplísňovým lékům, což jejich zařazení mezi kvasinky či plísně zpochybnilo. Citlivé jsou na antiprotozoální léky (např. metronidazol (Flagyl) je pro *Blastocystis* toxický) a krystalické alkaloidy (Tan, 2008) Dříve používané metody dnes byly nahrazeny zejména fylogenetickou analýzou, která dokazuje že *Blastocystis* patří do říše *Stramenopila*. Říše *Stramenopila* zahrnuje mnoho různých skupin, zejména různé tzv. „hnědé“ řasy (např. rozsivky, chaluhy, zlativky a další) a oomycéty (např. *Phytophthora*) (Tyler et al. 2006). Zástupci říše *Stramenopila* se vyznačují tím, že jeden ze dvou jejich bičíků je vybaven mastigonemou (vlákno, která lemují bičík). Je zajímavé, že *Blastocystis* spp. nemá bičíky (v žádném ze stádií životního cyklu), není pohyblivá a její zařazení do skupiny *Stramenopila* tak není podpořeno morfologickými znaky. Na základě molekulárních studií je řazena do nově vytvořené třídy, třída *Blastocystea*, podkmene *Opalinata* společně s opalinkami a bičíkovci rodů *Proteromonas* a *Karotomorpha*.

## 2.1.2 Podtypy

V současné době jsou *Blastocystis* na základě rozsáhlé genetické rozmanitosti a molekulární analýzy ssr RNA genu rozděleny do devíti hlavních podtypů (Noël et al., 2005; Stensvold et al., 2007).

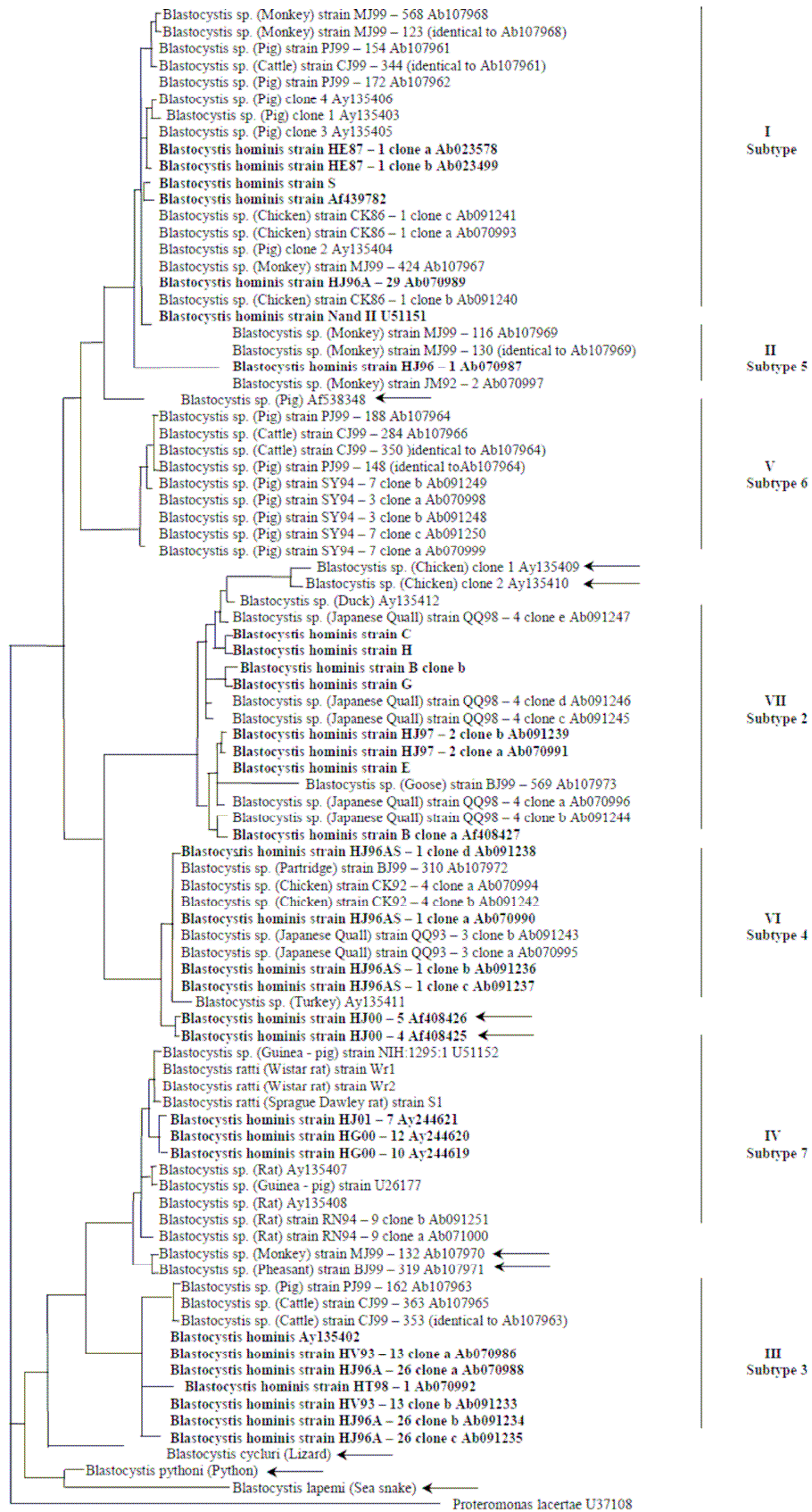
Lidé mohou být hostitelem *Blastocystis* od různých druhů zvířat. podtyp č. 3 byl nejčastěji izolovaným genotypem v epidemiologických průzkumech a je asi jediným genotypem lidského původu (Tan, 2008) Pravidelně však byly izolovány i podtypy č. 1, 2 a 4. Další podtypy č. 5- 9 byly od lidí izolovány pouze sporadicky.

Podtyp č. 4 je podtypem izolovaným pouze od hlodavců a vačnatců (kromě lidí), ale celkový počet studií zabývajících se tímto konkrétním podtypem je malý, a proto by neměl být brán jako směrodatný. Naproti tomu podtypy 6 a 7 byly u ptačích hostitelů nalezeny opakovaně v rámci vícero studií a lze se proto domnívat, že jejich hlavními zvířecími hostiteli jsou skutečně ptáci.

Podtyp č. 5 je v současné době přijat jako hlavní genotyp *Blastocystis* u prasat. Z důvodu vysoké prevalence u tohoto hostitele (Tan, 2008) ovšem existují i další studie, které se přiklání k tomu, že hlavním genotypem u prasat je podtyp č. 1 (Stensvold et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že prasata mohou být infikována i podtypem č. 2 a 3, které dříve byly popsány výhradně u lidí a primátů (Tan, 2008).

Podtyp č. 9 byl zatím izolovaný pouze u lidí, ale jen ve velmi málo případech. Podle výsledků fylogenetických analýz je ovšem tento podtyp příbuzný s podtypy č. 6 a 7, takže je možné, že ptáci jsou také normální hostitelé tohoto podtypu. Přes zdánlivou specifickou tohoto parazita je vysoká pravděpodobnost, že infekce u lidí může být způsobena „ptačími“ podtypy, jak bylo již dříve navrženo (Noël et al., 2005).

Nově byl stanoven podtyp č. 10, který byl izolovaný od primátů a sudokopytníků v Dánsku a je nejspíše sesterskou skupinou podtypu č. 8. (Stensvold et al., 2009). Důvodem proč tento podtyp nebyl identifikován již dříve je jeho možné geograficky omezené rozšíření. Navíc mnoho studií (včetně této) používá *in vitro* kultury pro následnou extrakci DNA z kultivovaných kmenů a není známo, zda všechny podtypy rostou stejně dobře. Např. Parkar et al. (2007) uvádí, že podtyp č. 2 při společné kultivaci přerůstá podtyp č. 1. Je proto možné, že podtyp č. 10 neroste v běžně používaných kulturách a to by mohl být další z důvodů proč nebyl již dříve identifikován. Podtyp č. 10 nebyl doposud izolován u lidí.



Obr. 1 (na předchozí straně). Rozdělení jednotlivých izolátů do podtypů je neucelené a liší se podle jednotlivých autorů. Rozdělení označené římskými číslicemi je podle Arisue et al. (2003) a rozdělení označené „subtype 1-7 je podle Noël et al. (2005). Rozdělení podle Stensvold et al. (2007) je téměř stejné jako u Arisue et al. (2003) až na to že tento autor začlenil izoláty, které se zde vyznačují šípkami a jsou mimo vyznačené podtypy, tzv „outliers“. Volné Izoláty nacházející se u podtypu IV/ subtype 7 označil jako podtyp č. 8, pod podtypem VI/ subtype 4 označil jako podtyp č. 9 a u podtypu VII/ subtype 2 jako podtyp č. 7. Tento autor také zdůrazňuje nutnost ujednotit popisování jednotlivých podtypů. Zdroj: Noël et al. 2005, upraveno.

Získání informací o hostitelské specifitě *Blastocystis* je nezbytné pro epidemiologické studie zabývající se přenosem a šířením parazita. Současné i dřívější studie naznačují, že je možný přenos mezi některými hostiteli a dalo by se říct, že *Blastocystis* jsou parazité se střední hostitelskou specifitou. Budoucí studie by se měly zaměřit na rozvoj rozlišení molekulárních markerů pro analýzu izolátů s cílem dalšího objasnění původce (Stensvold et al., 2009).

### 2.1.3 Základní charakteristika

Rod *Blastocystis* patří mezi anaerobní jednobuněčné, polymorfní organismy, které mají v buňkách jedno nebo více jader. Mají hladké a drsné endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex a mitochondrie. *Blastocystis* je parazitický organismus, který osidluje nižší trávicí trakt mnoha druhů bezobratlých ( např. u švábů (Suresh et al. 1997) a u mlžů rodu *Donax* z peruánské severního pobřeží (Pérez-Cordón et al. 2007), ale toto tvrzení je poměrně odvážné vzhledem k tomu že byl proveden pouze jeden výzkum a chtělo by zajisté povést další výzkumy) i obratlovců jako jsou plazi (želvy, krokodýli, ještěři, hadi, Suresh et al. 1997), ptáci (holubi, hrabaví, vrubozobí; např. Yoshikawa et al. 1996), savci (hlodavci, šelmy, lichokopytníci i sudokopytníci, primáti včetně člověka; Abe et al. 2003).

Nicméně, polymorfní povaha parazita a nedostatek standardizace v technice vedly ke zmatkům a v některých případech k nesprávnému výkladu údajů. Z hromadících se epidemiologických *in vivo* a *in vitro* údajů jednoznačně vyplývá, že *Blastocystis* je patogenní. Ačkoli je rostoucí množství důkazů o tom, že *B. hominis* mohou být patogenní za určitých podmínek, existují však i jiné studie, které jsou opačného názoru.

## 2.1.4 Morfologie

Z hlediska forem rozlišujeme čtyři hlavní formy *Blastocystis* (vakuolární, granulární, améboidní a cysty)

### Vakuolární a granulární formy

Vakuolární formy (Obr.2A) jsou kulovité a charakterizované velkou centrální vakuolou, která může zaujímat až 90% buněčného objemu. Centrální vakuola obvykle obsahuje jemný granulární nebo vločkovitý materiál, různé elektronové hustoty (Tan et al., 2002) a je obklopena jen tenkou vrstvou cytoplasmy. Buňky obou forem mají nejčastěji sférický tvar, dosahují velikosti asi 4 - 15  $\mu\text{m}$  (vakuolární formy) až 10 - 60  $\mu\text{m}$  (granulární formy). Vakuolární i granulární formy jsou citlivé na teplotní změny, osmotický tlak a vystavení vzduchu (Zierdt, 1991). Za typickou formu *B. hominis* je často právě považována vakuolární forma. Tato forma *Blastocystis* je běžně diagnostikována ve výkalech zvířat či lidí a v kulturách je to nečastěji se vyskytující forma. Granulární formy (Obr. 2B) *Blastocystis* lze hojně pozorovat v kultivačních médiích obohacených krevním sérem (Zierdt, 1973 podle Tan, 2008). V buňce se nachází několik mitochondrií různého tvaru. Jejich význam není zcela zřejmý. Mitochondrie neobsahují cytochromy a chybí jim i další typické mitochondriální enzymy. Golgiho komplex je asociován s jádrem. Jader může být i více (až čtyři). Průměr jádra je asi 1  $\mu\text{m}$ . Tyto formy se množí binárním dělením ve dva  $\pm$  stejně velké jedince.

Organismus často obklopuje povrchová vrstva různé tloušťky někdy označovaná jako fibrilární plášť. Povrchová vrstva obsahuje řadu sacharidů a předpokládá se, že hraje roli při odchytu a degradaci bakterií pro výživu buňky *Blastocystis*, ochranně před osmotickým šokem nebo poskytují mechanickou překážku proti poškození membrány proteiny humorální složky imunitního systému (Tan, 2008). Tato povrchová vrstva je často při izolaci parazita z výkalů silnější a postupně se během dlouhodobé laboratorní kultivaci ztenčuje. V kulturách *in vitro* byly pozorovány i buňky bez povrchové vrstvy. Důvod pro toto ztenčování je neznámý, ale předpokládá se, že jak se během kultivace snižuje význam bakterií jakožto složky výživy *Blastocystis*, dochází i k degradaci fibrilárního pláště. (Zaman, 1997).

## Multivakuolární a avakuolární formy

V čerstvé stolici se mohou vyskytovat formy s několika drobnými, různě velikými, propojenými vakuolami. Jejich buňky měří 5- 8  $\mu\text{m}$  a jsou jednojaderné. Na povrchu mají poměrně silný glykoproteinový plášť (Zaman et. al., 1997). Zaman et. al. (1999) studovali tento vnější plášť *Blastocystis* skenovacím elektronovým mikroskopem a domnívají se, že slouží k zachycování bakterií a jejich trávení. V lidském střevě se za určitých podmínek mohou vyskytovat i drobné (asi 5  $\mu\text{m}$ ) formy bez jakýchkoli vakuol.

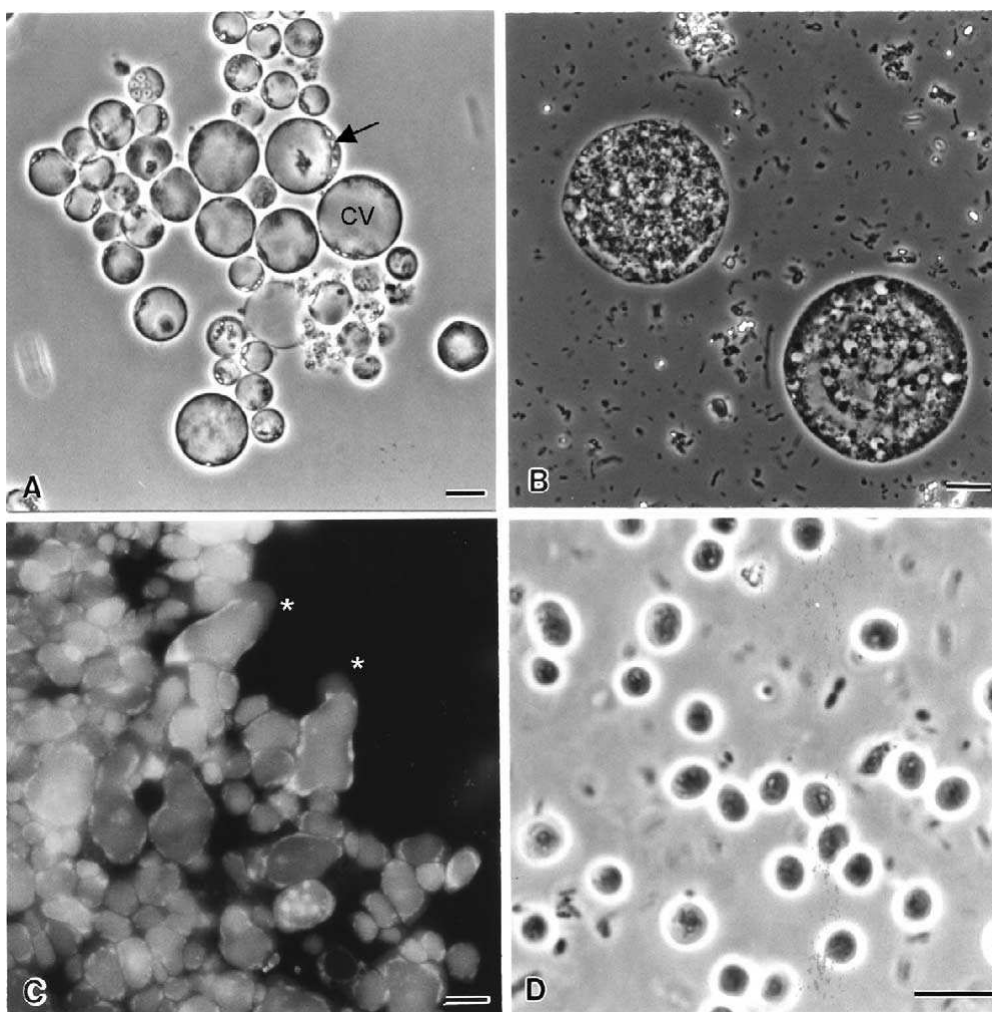
## Améboidní formy

Améboidní formy (obr. 2C) prvoků rodu *Blastocystis* jsou hlášeny jen vzácně a jejich morfologický popis není jednoznačný. Améboidní formy pravděpodobně vznikají z vakuolární formy. Jsou důkazy o tom, že při kultivaci vakuolární formy na agaru a po její inkubaci výsledná kolonie obsahovala četné améboidní formy. Velikost buněk améboidních forem je 3 - 8  $\mu\text{m}$ , buňky jsou nepravidelného tvaru a lze u nich pozorovat pseudopodie. Podle některých studií u améboidních forem chybí centrální vakuola, Golgiho komplex, povrchová vrstva a mitochondrie. V cytoplasmě jsou ve vakuolách pohlčené bakterie. Přítomnost bakterií a bakteriálních zbytků u améboidních forem naznačuje nutriční roli pro tuto formu. U améboidních forem se předpokládá, že hrají značnou roli v patogenezi (Tan, 2008). Byla provedena studie, která uvádí, že améboidní formy byly nalezeny v průjmové tekutině pacienta, který zemřel na aspirační pneumonii. Buňky nalezené u tohoto pacienta byly nepravidelného tvaru a některé buňky obsahovaly jednu nebo dvě velké pseudopodie. Nedávná studie odhalila, že akutní kopřivka byla spojena s améboidní formou rodu *Blastocystis*, který patří do podtypu č. 3 (Katsarou-Katsari et al., 2008)

## Cysty

Cysty (obr. 2D) jsou nedávno popsanou formou parazita, vzhledem k jejich velikosti 3 – 5  $\mu\text{m}$ , což nejspíše vedlo k záměně se zbytky tráveniny. Cysty jsou proměnlivého tvaru, ale většinou jsou vejčité nebo kulovité. Cysta je chráněna silnou stěnou složenou z několika vrstev (Moe et al., 1999). Cytoplazma cyst může obsahovat jedno až čtyři jádra, glykogenová zrna, tukové kapénky a malé vakuoly (Tan, 2008). Mitochondrie v cystách mají jen slabě vyvinuté krysty. V lidské stolici

byly pozorovány dva druhy cyst: cysty s fibrilárním pláštěm a bez něj. Vnitřní stavbou jsou si oba druhy cyst podobné (Stenzel et. al., 1997). Cysty izolované z živočišných výkalů odhalily různé morfologické rozdíly při srovnávání s cystami lidského *B. hominis*. Ve stolici opice makaka byly popsány velké (12 - 15  $\mu\text{m}$ ) vícejaderné cysty. Dále byly popsány velké cysty ve stolici kura (*Gallus domesticus*). Tyto cysty byly kryty jedinou fibrilární vrstvou, uvnitř se nacházelo až sedm menších cyst obdobných cystám *B. hominis* (Stenzel et. al., 1997). Morfologická různorodost cyst by mohla být způsobena přítomností různých druhů *Blastocystis*.



Obr. 2 Morfologické formy *Blastocystis* zobrazené pod světelným mikroskopem.

(A) vakuolární forma je kulovitá s velkou centrální vakuolou (CV). (B) Granulární forma obsahující řadu granulárních inkluzí. (C) Améboidní forma zobrazená fluorescenční mikroskopií po obarvení akridinovou oranží, je nepravidelného tvaru a obsahuje jedno nebo více pseudopodií jako cytoplazmatické výběžky (\*). (D) Cysty ve fázovém kontrastu. Měřítka odpovídá 10 mikrometrům. Zdroj: Tan, 2004



Cysty byly údajně schopny přežívat ve vodě po dobu až 19 dní při pokojové teplotě, ale byly citlivé na extrémní teplo, chlad a na běžné dezinfekční prostředky (Moe et. al., 1996).

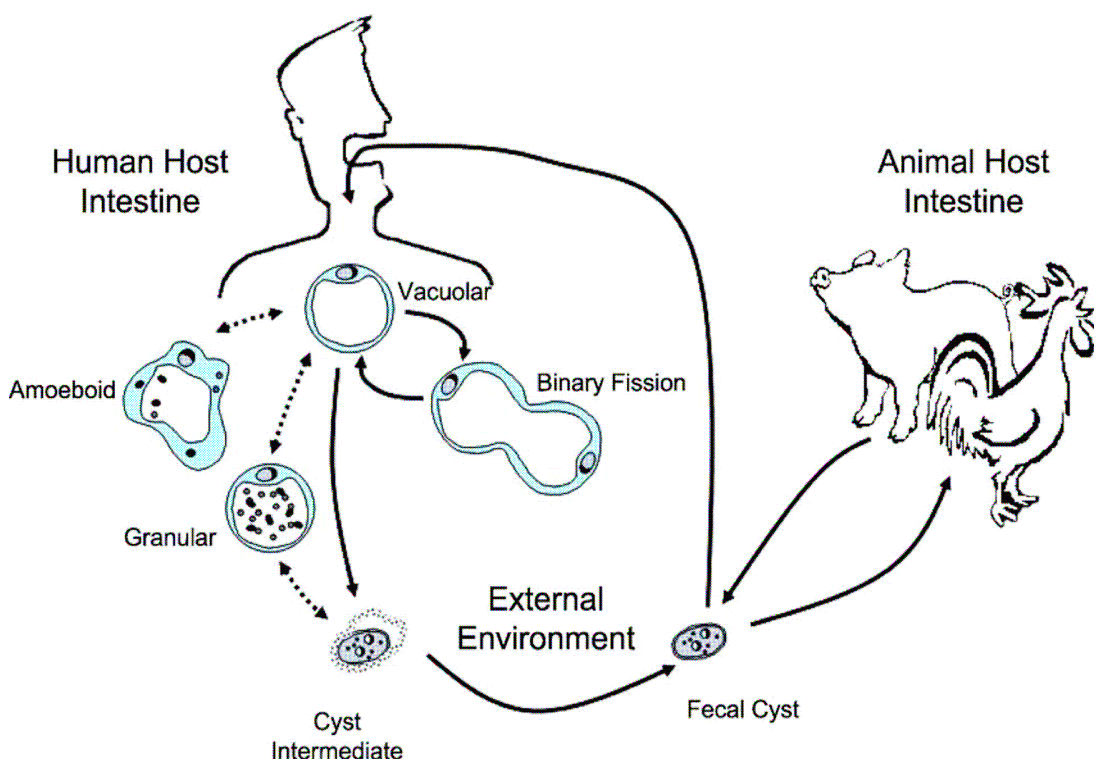
Autoři experimentální studie infekčnosti prováděné na BALB / c myších, Wistar potkanů a různých druhů ptáků uvedli, že tato forma je nepochybně přenosnou formou parazita. (Tan, 2008)

### 2.1.5 Životní cyklus

Nedávná studie tvrdila, že *Blastocystis* mají neobyčejně rozmanitý způsob rozmnožování, např. binární dělení, schizogonií, pučení, či tvorbu zvláštních váčků. Jedině binární dělení bylo však jasně prokazatelným způsobem rozmnožování (Stenzel a Boreham, 1996).

Význam jednotlivých morfologických forem v životním cyklu parazita stále není úplně jasný. Multivakuolární nebo améboidní formy, které se diferencovaly z cyst po přenesení do hostitelského organismu orální cestou, se v organismu změnilly v avakuolární formu. Tato forma se poté změnila zpět v améboidní nebo multivakuolární formu a cyklus se opakuje (Stenzel a Boreham, 1996). Stenzel a Boreham se domnívají, že vakuolární formy nacházející se v kulturách jsou ve skutečnosti produkty *in vitro* růstu. Ale tato domněnka nebyla potvrzena. Experimentální infekce laboratorních potkanů a myší ukázala, že formy, které se nacházely v *in vivo* kulturách jsou obdobné těm v *in vitro* kulturách. Ale vakuolární formy *in vivo* byly menší (Moe et al., 1997). Obvykle obsahovaly menší centrální vakuolu se silnějším cytoplazmatickým okrajem. Životní cyklus vakuolární formy naznačil, že se diferencovala buď do granulární formy nebo do améboidní formy. Granulární forma následně začala produkovat dceřiné vakuolární buňky, mající uvnitř centrální vakuolu. Zatímco améboidní forma následně začala produkovat vakuolární buňky pučením (Snowden et. al., 2000).

Singh, et. al. (1995) navrhuje další možný způsob životního cyklu vakuolární formy: vakuolární forma po přenesení do hostitelského organismu se změnila na améboidní formu a následně na precyst formu. Uvnitř tohoto precystického stadia vznikají budoucí cysty schizogonií. Výsledkem jsou tlustostěnné cysty, které puknou a uvolní dceřiné vakuolární formy.



Obr. 3 (na předchozí straně). Životní cyklu *Blastocystis*. Infekce u člověka i zvířete začíná požitím fekální cysty. Fekální cista se vyvinout do vakuolární formy, které se následně množí binárním štěpením. Některé vakuolární formy se změny na cysty a tyto fekální cysty při zrání ztrácí vnější fibrilární vrstvy. Fekální cista je poté přenesena orální cestou na lidského nebo zvířecího hostitele a cyklus se opakuje. Přechod z jiných forem s ohledem na vakuolární formu není dostatečně prostudován a je znázorněna přerušovanými čarami. Zdroj: Tan, 2004

U životního cyklu zahrnující tlustostěnné a tenkostěnné cysty vznikla hypotéza, že tlustostěnné cysty jsou důležité pro přenos *Blastocystis* do dalšího hostitele, zatímco tenkostěnné cysty jsou autoinfekční.

Po požití cysty hostitelem parazit prodělá změny v tlustém střevě a rozvine se do vakuolární formy a i v této formě je vylučován s výkaly (Tan, 2008). Moe et al. (1999) zkoumali za pomoci transmisní elektronové mikroskopie vývoj cyst ve vakuolární formy u izolátů získaných od lidí a krys. Zjistila, že získané cysty jak od lidí tak od krys se do 24 hod. po naočkování do media změnilo na vakuolární formu. Mikrofotografie prokázala, že buněčné dělení vakuolární formy již začalo, zatímco parazit byl stále ještě ve formě cysty.

Suresh et al. (1997) zkoumali střevní obsah gekonů lemovaných (*Cosymbotus platyurus*) a švábů amerických (*Periplaneta americana*) v lidských obydlích. Ukázalo se, že oba druhy jsou běžně nakaženy blastocystami. Je možné, že gekoni se nakazí požíváním švábů.

Budoucí studie by měly brát v úvahu genotypovou různorodost *Blastocystis* spp. u různých druhů zvířat a i to, že lidé mohou být hostitelé různých podtypů.

### 2.1.6 Kultivace

*B. hominis* lze pěstovat poměrně snadno na různých druzích médií: např. Dobell, IMDM-HS (Iscove's Modified Dulbecco's Medium + Horse Serum), TYSGM (Clark a Diamond 2002). Především pro axenizaci kmenů *B. hominis* lze využít schopnost blastocyst růst na pevném agaru (jde o utuhlý 1% roztok agaru v IMDM-HS). *B. hominis* vytváří na agaru kolonie připomínající kolonie bakterií a z agarové plotny lze jednotlivé klony očkovat do tekutého média (Ng et al. 1999, Tan et al. 2000). Generační doba *B. hominis* je v *in vitro* podmínkách u různých kmenů různá, v experimentu Zierdta a Swana (1981) byla v rozpětí 8,5 hod až 19,4 hod.

### 2.1.7 Mikroskopie

*Blastocystis* představuje značné problémy pro diagnostické laboratoře. Prvním problémem je nejistá patogeneze tohoto parazita, což odrazuje mnoho lékařů od zvažování, že původcem choroby může být *Blastocystis*. Za druhé, polymorfní povaha organismu ve vlhkém mikroskopickém preparátu může vést k záměně s kvasinkami, výtrusovci rodu *Cyclospora sp.* nebo tukovými kapénkami.

Přímá mikroskopie je obvykle prováděna obarvením vzorku. Běžně se využívá barvení Lugolovým roztokem ve vlhkých mikroskopických preparátech, které obarví prvoky trvale a rychle. Barvení trichromem, což je další rutinní barvení v mnoha klinických laboratořích, je podle různých studií k detekci střevních prvoků (včetně blastocyst) ještě vhodnější (Gardner et. al., 1980) (Tan, 2008).

### 2.1.8 Prevalence a epidemiologie

*Blastocystis* je parazit ubiquitární a celosvětově rozšířený (Jelínek et al., 1997). V některých epidemiologických průzkumech je to nejčastěji izolovaný parazit vůbec (Tan, 2008). Obecně platí, že vyšší výskyt infekce je v rozvojových zemích než ve vyspělých (Boreham a Stenzel, 1996). V rámci komunity s nižší sociálně ekonomickou úrovní, která trpí špatnou hygienou životního prostředí, převážně díky nedostatku vody, kanalizace a odvozu odpadu, jsou lidé vystaveny většímu riziku infekce (Tan, 2002). Prevalence je nízká např. v zemích jako je Japonsko (0,5 až 1%) a Singapur (3,3%) a vysoká v rozvojových zemích, včetně Argentiny (27,2%), Brazílie (40,9%), Kuby (38,5%), Egypta (33,3%), a Indonésie (60%) (Tan, 2008).

Nedávné průzkumy pomocí PCR metody a následného sekvenování genu pro SSU rRNA vrhají nové světlo na rozšíření různých genotypů *Blastocystis* v lidské populaci i u zvířecích hostitelů a také poskytují informace o možném přenosu mezi hostiteli nebo o zdroji nákazy pro člověka. Yoshikawa et al. (2004) použili tyto molekulární metody pro určení zastoupení různých podtypů *Blastocystis* u lidí v Bangladéši, Německu, Japonsku a Pákistánu. Nejdominantnějším podtypem v těchto zemích byl podtyp č. 3 (41,7 - 92,3%) a na druhém místě byl buď podtyp č. 1 (7,7 - 25%) nebo podtyp č. 6 (10 - 22,9%). I další studie naznačují, že podtyp č. 3 je podtypem lidského původu a také že neexistuje žádná souvislost mezi geografickým původem a genotypem *Blastocystis*.

### 2.1.9 Infekce a nemoci

*Blastocystis hominis* se běžně nachází jak u zdravých jedinců, tak u pacientů s gastrointestinálními poruchami.

Infekce se může přenášet fekálně-orální cestou kontaminovanou vodou či potravinou (Morris et al., 2009). Klinické projevy nemoci, které byly způsobeny *Blastocystis* spp. jsou nespecifické a zahrnují nevolnost, nechutenství, bolesti břicha, nadýmání, plynatost a akutní nebo chronický průjem. Z těchto příznaků byly u pacientů nejčastěji zaznamenány bolesti břicha a průjem. Mezi další příznaky spojené s infekcí *Blastocystis* patří leukocyty ve stolici, eozinofilie (chronická eozinofilní leukémie) a kožní vyrážky, zejména kopřivka (Tan, 2008).

Zdá se, že parazit je obecně neinvazní. Některé studie naznačují, že extraintestinální infekce *Blastocystis* spp. se mohou vyskytnout prostřednictvím

jiného invazního patogenu. Fekální leukocyty svědčí o zánětlivém průjmu, který může být důsledkem jak infekčních tak neinfekčních onemocnění, jako jsou zánětlivá střevní onemocnění a infekce způsobené bakteriemi *Clostridium difficile*, *Salmonella* spp. a *Shigella* spp. V současné době existuje jen málo důkazů o tom, že infekce způsobená *Blastocystis* sama o sobě vede k rozvoji zánětlivých průjmů. Další studie naznačují souvislost mezi *Blastocystis* a syndromem podráždění střev (IBS- Irritable Bowel Syndrome). To je funkční porucha střev, která je spojena s bolestmi břicha a poruchami vyprazdňování (Tan, 2008).

### 2.1.10 Léčba

Samotná potřeba léčby osob nakažených *Blastocystis* je nejasná vzhledem ke sporné patogenезi organismu a častému spontánnímu vymizení příznaků nemoci (Tan, 2008). V případech, kdy je léčba oprávněná je nejčastěji předepsaným antibiotikem metronidazol. Studie ukázaly, že kmen *Blastocystis* izolovaný od různých pacientů může vykazovat rozdílnou citlivost na metronidazol. Např. cysty mohou být odolné až na 5mg/ml léku. Morfologická a rozsáhlá genetická různorodost organismu může vysvětlovat pozorovanou variabilitu ve vnímavosti k lékům a případné selhání léčby. (Ok et al., 1999 podle Tan, 2008) uvedli, že vymýcení *Blastocystis* léky je možné nebo aspoň snížení příznaků u více než 90% jedinců. Naproti tomu studie Moghaddam et al. (2005) ukázaly pouze 22% vymýcení parazitů u infikovaných jedinců. Širokospektrální antibiotikum *Paromomycin*, které se používá pro léčbu akutní a chronické střevní amébiázy prokázalo úspěšnou léčbu i infekce *Blastocystis* spojených s kožními onemocněními, převážně kopřivkou (Tan, 2008). Následné *in vitro* studie o vnímavosti čtyř axenických kmenů *Blastocystis* k různým lékům však ukázalo, že *paromomycin* nebyl inhibiční pro parazita.

I přes důkazy, že metronidazol nebyl účinný ve všech případech je považován za nejúčinnější lék na infekci *Blastocystis* a následně po metronidazolu jsou dalšími vhodnými léky cotrimoxazol a nitazoxanid. Budoucí studie by se měly zaměřit na rozdíly mezi jednotlivými genotypy a léky na ně působící. Dále na mechanismus, který působí rezistentnci vůči metronidazolu.

### 2.1.11 Zvířecí model

Nedávné studie ukázaly, že krysy a kuřata jsou vhodnými kandidáty na zvířecí modely. Absence studií na zvířatech byla hlavní překážkou pro chápání patobiologie *Blastocystis*. Experimentální infekce byly zkoumány na potkanech, myších, morčatech a kuřatech (Tan, 2008). Experimenty prováděné na bezmikrobiálních morčatech zjistily, že jsou citlivé na infekci *Blastocystis* prostřednictvím orálního a intracékálního očkování (Phillips a Zierdt, 1976). Těžká infekce vedla u zvířat k průjmům a histologickým změnám sliznice slepého střeva. Pozdější studie experimentální infekce mladých (méně než 8- i týdenních) BALB / c myši blastocystami naopak obecně spontánně vymizela, i když u některých myši se objevil úbytek hmotnosti a histologické vyšetření ukázalo zánětlivé reakce a olupující se sliznici. Mírný průběh a spontánní vymizení této infekce může být způsoben jak nízkým patogenním potenciálem tohoto konkrétního izolátu *Blastocystis* tak možností, že myši obecně nemusí být dobrým hostitelem *Blastocystis*. Průzkumy ukázaly, že laboratorní myši nejsou běžnými hostiteli *Blastocystis*, zatímco krysy a domácí drůbež, a to zejména kuřata, jsou často infikované blastocystami (Lee a Stenzel, 1999).

Zkoumána byla i schopnost konkrétních izolátů infikovat i další hostitele. Např. izoláty od morčat a laboratorních myši můžou infikovat laboratorní potkany (Wistar), izoláty od křepelek a hus mohou zase snadno nakazit kuřata (Tanizaki et al., 2005). Infekčnost různých genotypů *Blastocystis* izolovaných z lidí byla testována na potkanech a kuřatech. Infekce probíhala různě a lišila se podle toho, ke kterému podtypu izolát náležel (v tomto případě šlo o podtypy 4 a 6). Je zajímavé že, podtyp č. 3, který je nespíše primárně lidským podtypem, nemůže nakazit kuřata ani krysy. Podtyp č. 7 může infikovat pouze kuřata, což naznačuje, že tyto podtypy mají omezené spektrum hostitelů (Iguchi et al., 2007)

## 2.2 Trichomonády

I v našich kultivačních experimentech zaměřených na výskyt *Blastocystis* u prasat byly v kulturách běžně pozorovány také střevní trichomonády (bičíkovci řádu *Trichomonadida*). Během další práce s kulturami střevních prvoků prasat se vyplatí zabývat se také jimi a jejich případným vztahem s infekcí blastocystami. Proto je dvěma nejběžnějším rodům střevních prasečích trichomonád v této práci věnována následující kapitola.

Informace do tohoto článku jsem načerpala především z článků (Hibler et al., 1960) a (Čepička et al. 2006).

### 2.2.1 Taxonomie parazita

**Nadříše:** *Eukaryota*

**Říše:** *Mastigota*

**Kmen:** *Axostylata*

**Třída:** *Parabasalea*

**Řád:** *Trichomonadida* (Hausmann, 2003)

### 2.2.2 Základní charakteristika

Trichomonády jsou prvoci vyskytující se v nosní dutině, žaludku, tenkém, tlustém a slepém střevě domácích prasat. Hammond, Fitzgerald & Johnson (18) oznámili, že tyto bičíkovci byli nalezeni v nosní dutině (56,3% ze 64), v žaludku (10,2% ze 329) a ve slepém střevě (73% ze 431) vzorcích odebraných od prasat v západních Spojených Státech.

## 2.2.3 Tritrichomonas

Dvě nejčastěji se vyskytující tritrichomonády u prasat:

### **Tritrichomonas suis**

#### **Morfologie**

V žaludečním obsahu prasat byl nalezen pouze jeden morfologický typ trichomonády. Podobné trichomonády byli také nalezeny ve slepém střevě, tenkém střevě a nosní dutině. Nepatrné rozdíly mezi těmito trichomonádami byly v morfologii a v reakcích na kultivaci. *T. suis* jsou charakteristické dlouhým vřetenovitým tvarem (obr. 4) ale občas můžou mít i hruškovitý nebo kulatý tvar. Během počátečního období kultivace byl vyšší podíl trichomonád, které měli hruškovitý tvar. *T. suis* se pohybuje v nativních preparátech poměrně rychle, přímočaře, podobně jako příbuzná *T. foetus*. Buněčná ústa nebyla pozorována. Filopodia byla většinou krátká a nepravidelná. Tři přední bičíky jsou přibližně stejně dlouhé jako tělo. Některé bičíky byly ukončeny bulevnatou strukturou. Undulující membrána a žebro, které ji podepírá, jsou ukončeny téměř u konce těla. Undulující membrána má výšku asi 1,6  $\mu\text{m}$ . Zadní volný bičík byl obvykle kratší než tělo a u mnoha exemplářů byl tento bičík ukončen jemnými vlákny. Oválné nebo protáhlé jádro se nacházelo v přední 1/3 těla, obvykle v dorzomediální pozici. Tvary jader se značně lišily mezi jednotlivými buňkami. Jádro bylo často při barvení protargolem velmi silně obarveno, ale méně výrazně byla zbarvená granula. Jádro také obsahovalo velký a nápadný endosom.

**Reakce na kultivaci:** tyto trichomonády dobře rostly v modifikovaném Plastridge, CPLM, Diamond's médiu. Během počátečního období kultivace v původní kultuře a v prvních subkulturách měli trichomonády často okrouhlý tvar než je obvyklé a rostly pomaleji. Tento jev může být způsoben nepříznivým účinkem dalších organismů, kteří byly přítomny v počátečním období kultivace. V následujících subkulturách začali mít typičtější tvar těla a rostly rychleji. V čerstvých kulturách trichomonády byly přítomny v největším počtu na spodní části zkumavky. Vzhledem k tomu, že *T. suis* byla izolována z žaludku, mělo by být  $\text{pH} < 5$ , ale prodloužení životnosti v kultivaci bylo dosaženo při  $\text{pH}$  v rozmezí 6,5- 8,0.



## **Tritrichomonas rotunda**

### **Morfologie**

*Tritrichomonas rotunda* je typická širokým hruškovitým nebo občas oválným či elipsovitým tvarem (obr. 5). Délka těla bez vyčnívající části axostylu je obvykle jen o 1/3 větší než šířka. Tato trichomonáda se pohybuje pomaleji než *T. buttreiy*, *T. suis* a *T. foetus*. Tělo bylo méně pružné než u *T. suis*. Buněčná ústa nebyla pozorována. Tři přední bičíky jsou zhruba stejně dlouhé a jsou výrazně delší než tělo. Každý z bičíků je ukončen uzlovitou nebo lopatkovitou strukturou. Undulující membrána je méně výrazná a její výška byla průměrně 1,14 μm. Undulující membrána a žebro bylo obvykle rozšířeno přibližně 1/2 až 2/3 délky těla. U několika menších exemplářů membrána dosahovala až na konec těla. Zadní volný bičík byl kratší než tělo a obvykle byl ukončen jemnými vlákny, která měla průměrnou délku 1,20 μm. Délka těchto vláken byla tedy podstatně větší než u *T. suis* a *T. Buttreiy*. Jádru bylo velké a přibližně kulovité s endosome a obklopené světlým kruhem. Jádru bylo vždy umístěno v přední části v centrální nebo hřbetní poloze.

**Reakce na kultivaci:** V primárních kulturách byla největší koncentrace *T. rotunda* zhruba ve střední části zkumavky. V prvních subkulturách rostl tento druh rychle a často byl početnější než *T. suis*, pokud tyto trichomonády byly přítomny. V subkulturách byly *T. rotunda* přítomny v největším počtu na dně zkumavky. Navzdory rychlému růstu v prvních subkulturách se při delší kultivaci jejich výskyt rychle snižoval a ve 4. až 5. subkultuře již nebyly nalezeny.

## 2.2.4 Tetratrichomonas

### **Základní charakteristika**

Dalším rodem trichomonád vyskytujícím se u prasat je rod *Tetratrichomonas*. Molekulárně fylogenetické studie ukazují, že v rámci řádu *Trichomonadida* není blíže příbuzný výše zmíněnému rodu *Tritrichomonas*, ale patří spolu s dalšími několika rody do čeledi *Trichomonadidae* (Hampl et al. 2006). Předpokládá se, že některé druhy tetratrichomonád mohou infikovat široké spektrum hostitelských taxonů jako jsou ptáci a lidé v případě *T. gallinarum* (Čepička et al., 2005; Kutisova et al., 2005; McDowell, 1953) a u obojživelníků a plazů v případě *T. prowazeki* (Honigberg, 1951), zatímco jiné druhy jsou omezeny na jediného hostitele, např.

*T. microti*- hlodavci (Wenrich a Saxe, 1950), *T. limacis*- slimáci (Kozlov, 1945; Salleudin, 1972), *T. brumpti*- želvy (Honigberg, 1951), *T. didelphidis*-vačnatci (Andersen a Reilly, 1965; Tasca et al., 2001), *T. buttreysi*- sudokopytníci (Hibler et al., 1960; Jensen a Hammond, 1964), a *T. ovis*- ovce (Andersen a Levine, 1962). Druhy tetratríchomonád lze nalézt většinou v dolní části zažívacího traktu u širokého spektra zvířecích hostitelů včetně pijavic, měkkýšů, ryb a všech tříd suchozemských obratlovců. Málo je však známo o hostitelské specifitě tetratríchomonád a parabasalidů obecně.

Nejčastěji se vyskytující se tetratríchomonáda u prasat:

### **Tetratríchomonas buttreysi**

#### **Morfologie**

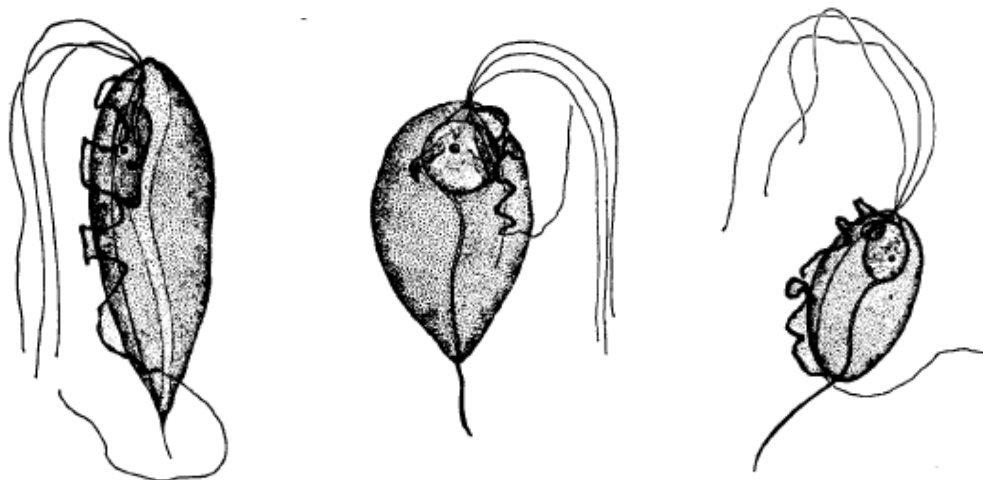
Tento druh je podstatně menší než ostatní dva výše zmíněné druhy tritrichomonád. Tvar je obvykle elipsoidní, ale někteří jedinci byli více protáhlí (Obr. 5) Pohyb byl rychlý, nevyzpytatelný a neřízený. Buněčná ústa nebyla pozorována. 3 až 4 přední bičíky se různě lišily v délce a většinou byly dvakrát delší než tělo. Každý bičík byl ukončen uzlovitou nebo lopatkovitou strukturou. Undulující membrána byla relativně vysoká, průměrně 1,35  $\mu\text{m}$ . Průměrná délka zadního volného bičíku byla přibližně stejná jako délka těla, ale u některých exemplářů byla téměř dvakrát delší než tělo. Zadní bičík byl obvykle zakončen v jemných vláknech. Axostyl byl poměrně úzký s lopatkovitou hlavičkou. Jádro bylo často oválné poblíž přední části těla a obsahovalo malý endosom

**Reakce na kultivaci:** *T. buttreysi* byli nejpočetnější v horní části zkumavky v blízkosti místa očkování. Množení obvykle pokračovalo po dobu 4 nebo 5 dní, pokud nedošlo k přerůstání bakteriemi. Tetratríchomonády, které byly dočasně kultivovány v jiných médiích, měly nápadně větší rozměry (délku a šířku těla v průměru o 0,75  $\mu\text{m}$  větší než normálně).

**Pořadí forem v kultuře:** V kulturách, které obsahovaly všechny tři druhy tritrichomonád, byli *T. buttreysi* nejpočetnější po prvních 48 hodinách v původní kultuře. V první pasáži se *T. rotunda* vyskytovala obvykle ve větším počtu než *T. suis* a *T. buttreysi*. Vzhledem k tomu, že *T. suis* byly v této fázi kultivace širší než jindy, mohli být proto snadno zaměněny s *T. rotunda*. V druhé a třetí subkultuře byl

tvár *T. suis* již typický a rychleji rostly, zatímco počet *T. rotunda* začal klesat. Ve čtvrté a páté pasáži se *T. rotunda* již nevyskytovala a zůstala pouze *T. suis* (17,37).

**Výskyt:** *T. suis* se vyskytují mnohem častěji než ostatní druhy prasečích trichomonád. U 100 prasat u kterých byly odebrány vzorky z nosní dutiny, žaludku, tenkého střeva a slepého střeva, byli nalezeni *T. suis* v nosní dutině, žaludku a slepém střevě u 5 prasat, v nosní dutině, tenkém střevě a slepém střevě u 3 prasat, dále v nosní dutině a slepém střevě u 32 prasat, v žaludek a slepém střevě pouze u 1 prasete, v nosní dutině u 15 prasat a pouze u 4 prasat ve slepém střevě. Výskyt *T. suis* v žaludku prasat zřejmě souvisí s pH. *T. suis* byly zjištěny pouze u těch prasat, u kterých se pH pohybovalo v rozmezí mezi 5 -7. *T. rotunda* a *T. buttreyi* byly zjištěny v nižším počtu. S výjimkou nalezených *T. buttreyi* u jednoho prasete v tenkém střevě byly tyto dvě trichomonády nalezeny pouze ve slepém střevě. Byla zjištěna korelace mezi výskytem a množstvím těchto tří druhů. Větší populace *T. suis* a *T. buttreyi* byli nalezeni v poněkud tekutějších konzistencích, zatímco *T. rotunda* se obvykle nacházela pouze v pevnějších konzistencích (Hibler et.al., 1960).



Obr. 4 Tritrichomonas suis. Obr. 5 Tritrichomonas rotunda. Obr. 6 Tetratrichomonas buttreyi

### 3. MATERIÁL A METODIKA

V roce 2009/2010 jsem ve šlechtitelském a produkčním chovu prasat odebírala vzorky od různých kategorií (chovné neboli aukční prasnice a kanci, samice jalové, březí, kojící, běhouni a od jednoho kance tzv. prubíře). Celkem jsem odebrala 46 vzorků.

Vzorky čerstvých výkalů jsem odebírala z podlahy kotce v neporušením stavu do plastických kelímků dřevěnou špachtlí. Poté jsem kelímek označila číslem a zapsala si potřebné údaje (kategorie, věk, váha, plemeno, pohlaví).

Vzorky jsem vyšetřovala v parazitologické laboratoři následující den po odběru. Vyšetření byla zaměřena na výskyt prvoků rodu *Blastocystis* a částečně na střevní trichomonády, které se ve vzorcích též běžně vyskytovaly. Nejprve jsem kličkou odebrala část výkalu a naočkovala do tekutého media připraveného metodou podle Dobell-Leidlaw. Poté jsem zkumavky vložila do termostatu nastaveného na 37°C a kultivovala po dobu 3 dnů. Po třech dnech jsem obsah zkumavky přeočkovala a další 3 dny opět kultivovala. Jednotlivé prvoky jsem identifikovala pomocí světelného mikroskopu při 400násobném zvětšení.

#### **Dvoufázové médium podle Dobell-Leidlaw (1926), modifikováno:**

Dobell-Leidlawovo médium se skládá z pevné a tekuté složky. Obě složky se připravují odděleně a médium je zkompletováno bezprostředně před použitím. Pevnou složku představuje 1,5 ml koagulovaného koňského séra. Sérum se nechá koagulovat v šikmo položených skleněných zkumavkách v horkovzdušném sterilizátoru jednu hodinu při 80°C. Tato procedura se druhý den opakuje, aby byly zničeny případné kontaminující organismy klíčící ze spor přeživších první fázi sterilizace. Zkumavky s pevnou fází jsou skladovány v lednici. Tekutá složka média se skládá z 500 ml Ringerova roztoku a 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku.

Tab. 1 Složení Ringerova roztoku:

<b>Roztok A</b>		<b>Roztok B</b>	
NaCl	3,25 g	CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,08 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,1 g	Destilovaná voda	do 50 ml
KCl	0,07 g		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,005 g		
Destilovaná voda	do 450 ml		

Oba roztoky jsou připraveny a autoklávovány odděleně, aby se předešlo vysrážení fosfátů v přítomnosti vápenatých kationtů. Po zchladnutí oba roztoky smícháme a přidáme 50 ml pipetou sterilně odebraného vaječného bílku (přibližně ze dvou vajec). Tekutá složka je pak uchovávána v lahvi v lednici. Před použitím média převrstvíme pevnou složku 3 ml tekuté složky.

## 4. VÝSLEDKY

Tab. 2 Odběr 8. 11. 2009 - ŠLECHTITELSKÝ CHOV

	Kategorie	Věk	Váha v kg	Plemeno	B	T
1	Prasnice březí	2,5 roku	180	BU	-	-
2		2,5 roku	180	BU	-	-
3	Prasnice kojící	2,5 roku	230	BU	++	+
4		2 roky	200	LA	+++	-
5	Běhouni	1,5 měsíce	10-12	BUxLA	++	-
6		1,5 měsíce	10-12	DUxP	++	-
7	Prasnice chovné (aukční)	8 měsíce	125	BU	-	-
8		8 měsíce	120	LA	-	-
9	Kanci chovní (aukční)	7 měsíce	105	LA	+	-
10		7 měsíce	115	BOxP	+	-

Tab. 3 Odběr 29.11.2009- ŠLECHTITELSKÝ CHOV

	Kategorie	Věk	Váha v kg	Plemeno	B	T
1	Prasnice jakové a březí	3 roky	170	BU	-	-
2		4 roky	180	BU	+	+
3		1,5 roku	150	BU	+	-
4	Prasnice kojící	3 roky	190	BU	-	-
5		1,5 roku	190	LA	+	-
6		3 roky	200	BU	-	-
7	Běhouni	1 měsíc	18-15	BU, DU	++	-
8		1,5 měsíce	10	BU, DUxP	++	-
9	Prasnice chovné (aukční)	4 měsíce	60	BU	+	+
10		5 měsíců	80	BUxLA	+	-
11	Kanci chovní (aukční)	8 měsíců	110	DUxP	-	-
12		8 měsíců	105	DU	-	-

Tab. 4 Odběr 8.12. 2009- PRODUKČNÍ CHOV

	Kategorie	Věk	Váha v kg	Plemeno	B	T
1	Prasnice jalové	8 měsíců	140	BUxLA	-	+
2		2, 2 roku	190	BUxLA	-	+
3		9 měsíců	135	BUxLA	-	+
4		1, 6 roku	210	BUxLA	+	+
5	Kanec- prubíř	2 roky	300	BUxLA	+	+
6	Prasnice březí	2 roky	195	BUxLA	+	+
7		3 roky	250	BUxLA	+	-
8		7 měsíců	190	BUxLA	+	+
9	Prasnice kojící	4, 7 roku	180	BUxLA	+	-
10		3, 2 roku	180	BUxLA	-	-
11	Běhouni	1 měsíc	8	BUxLA	-	+
12		1 měsíc	8	BUxLA	-	-

Tab. 5 Odběr 2.2. 2010- PRODUKČNÍ CHOV

	Kategorie	Věk	Váha v kg	Plemeno	B	T
1	Prasnice jalové	1,75 roku	200	BUxLA		
2		3, 2 roku	210	BUxLA	+	+
3		1,2 roku	190	BUxLA	-	-
4	Prasnice březí	5 měsíců	185	BUxLA	-	-
5		3, 2 roku	195	BUxLA	-	-
6		7 měsíců	196	BUxLA	++	-
7	Prasnice kojící	11 měsíců	170	BUxLA	++	-
8		10 měsíců	180	BUxLA	-	-
9		9 měsíců	190	BUxLA	-	-
10	Běhouni	1 měsíc	8	BUxLA	+	-
11		1 měsíc	8	BUxLA	-	-
12		1 měsíc	8	BUxLA	++	-

Legenda:

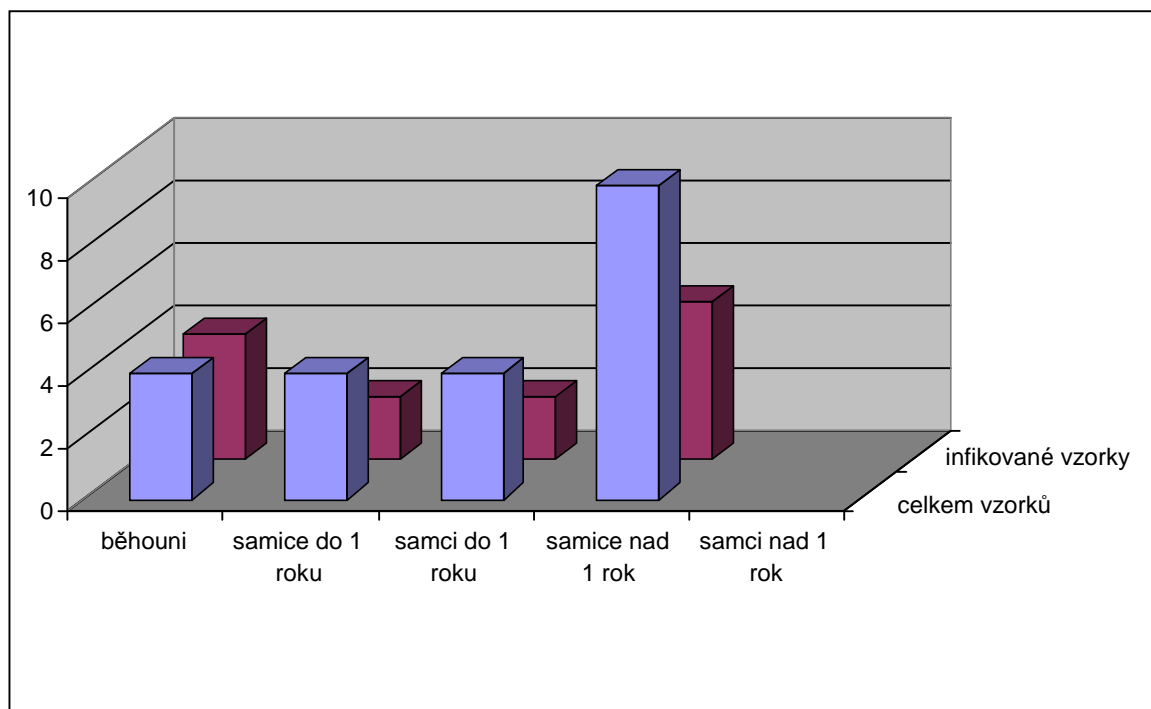
B- *Blastocystis*, T- Trichomonády, BU- Bílé ušlechtilé, LA- Landrase, DU- Duroc, P- Pietrain, BO- Bílé ušlechtilé otcovská linie

Hodnocení výskytu prvoků rodu *Blastocystis* a střevních trichomonád jsem prováděla na základě tohoto systému:

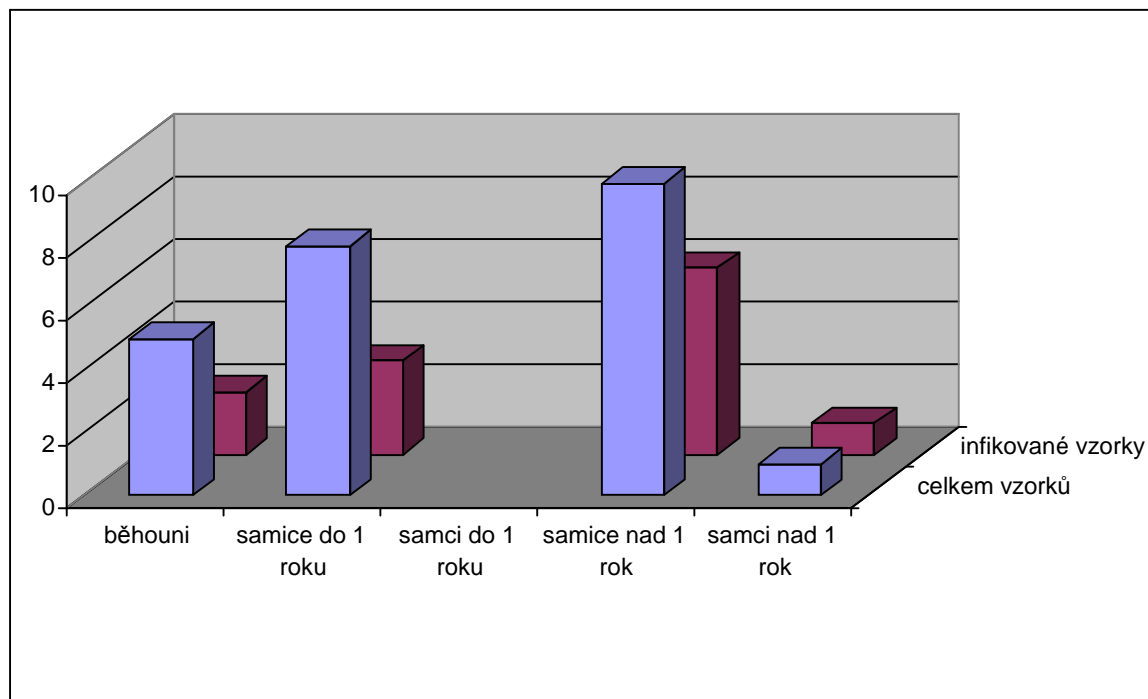
Tab. 6 Systém hodnocení:

Značky	Zvětšení (40x)
+	5 a méně buněk na zorném poli
++	do 20 buněk na zorném poli
+++	více než 20 buněk na zorném poli
-	žádné buňky nebyly nalezeny

Graf 1 Šlechtitelský chov



Graf 2 Produkční chov

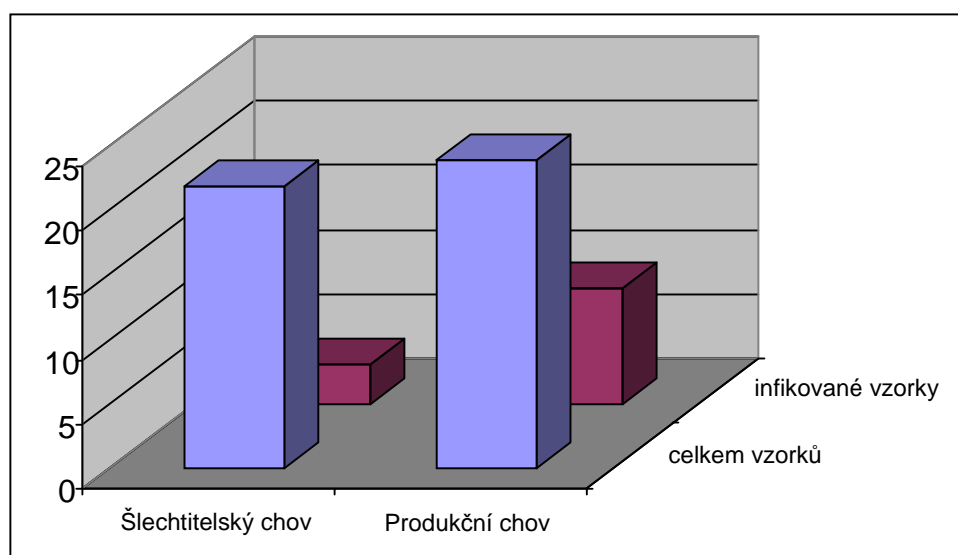


Graf 1 a 2 vyjadřují závislost mezi celkovým počtem odebraných a počtem infikovaných vzorků.



V procentuálním zastoupení je výskyt *Blastocystis* 59% ve šlechtitelském chovu a 50% v produkčním chovu. Bohužel tyto výsledky nejsou směrodatné vzhledem k nízkému počtu odebraných vzorků.

Graf 3 Výskyt trichomonád ve šlechtitelském a produkčním chovu



Graf 1 a 2 vyjadřují závislost mezi celkovým počtem odebraných a počtem infikovaných vzorků

V procentuálním zastoupení je výskyt trichomonád 13,6% ve šlechtitelském chovu a 37,5% v produkčním chovu. Tyto výsledky nejsou též směrodatné vzhledem k nízkému počtu odebraných vzorků.

## 5. DISKUZE

V roce 2009/2010 jsem ve šlechtitelském a produkčním chovu prasat odebírala vzorky od různých kategorií (chovné neboli aukční prasnice a kanci, samice jalové, březí, kojící, běhouni a od jednoho kance tzv. prubíře). Celkem jsem odebrala 46 vzorků. Z toho 22 ve šlechtitelském chovu a pozitivních na výskyt *Blastocystis* bylo 12 vzorků. V produkčním chovu jsem odebrala 24 vzorků a z toho bylo 10 vzorků pozitivních. Kultivaci jsem prováděla metodou Dobell-Leidlaw. Zjistila jsem že se *Blastocystis* vyskytovali u 59 % ve šlechtitelském chovu a 50 % v produkčním chovu.

Své výsledky porovnávám s výzkumem Abe et al. (2002) kdy odebrali 61 vzorků z 12 farem v západním Japonsku. Přičemž 58 vzorků bylo pozitivních na výskyt *Blastocystis*. Vzorky byly odebírány přímo z rekta prasat a výskyt *Blastocystis* zkoumali pomocí světelné mikroskopie s využitím fekální suspenze, kdy přibližně 0,1 g výkalů bylo rozmícháno v 1 ml fyziologického roztoku a přefiltrováno přes gázu. Poté 20 $\mu$ l fekální suspenze bylo zkoumáno pod světelným mikroskopem při 200x zvětšení. Pokud se ve vzorku nacházely *Blastocystis* bylo 200 $\mu$ l fekální suspenze naočkováno na dvoufázový agar, který popsal (Yoshikawa et al., 1995). Po 3-5 dnech kultivace při 37°C, byly vzorky opět pozorovány pod světelným mikroskopem. Pokud se 5-tý den *Blastocystis* ve vzorcích nevyskytovaly byly považovány za negativní. Abe et al. (2002) došli k závěru, že se *Blastocystis* vyskytovala u 95% prasat v tomto výzkumu.

## 6. SOUHRN

Prvoci rod *Blastocystis* patří mezi anaerobní jednobuněčné, polymorfní organismy osidlující nižší trávicí trakt mnoha druhů bezobratlých i obratlovců včetně člověka. Prvoka lze snadno kultivovat na různých druzích medií. V mém výzkumu jsem používala kultivaci podle Dobell-Leidlaw. *Blastocystis* se dělí do 10 podtypů a dále se určují nové podtypy. U prasat se nejčastěji vyskytují podtypy č. 5 a 1, kde je spor, který z těchto podtypů je hlavním genotypem u prasat. Dále se u nich vyskytují i podtypy č. 2 a 3.

V rozvojových zemích je infekce blastocystami vysoká, ale není jednoznačné zda u jedinců nakažených *Blastocystis* zahájit léčbu vzhledem k tomu, že infekce měla v některých případech spontánně mizející charakter nemoci. Každopádně nejúčinnějším lékem je antibiotikem metronidazol.

Budoucí studie by se měly zaměřit na rozdělení jednotlivých druhů *Blastocystis* do určitých podtypů a ujednotit popisování jednotlivých podtypů. Dále na to jaké druhy *Blastocystis* jsou schopny infikovat hostitele a jak široké spektrum hostitelů můžou nakazit jednotlivé druhy. A to jak závažná může být infekce a jaké poruchy může u jedince vyvolat.

V roce 2009/2010 jsem ve šlechtitelském a produkčním chovu prasat odebírala vzorky od různých kategorií (chovné neboli aukční prasnice a kanci, samice jalové, březí, kojící, běhouni a od jednoho kance tzv. prubíře). Celkem jsem odebrala 46 vzorků. Zjistila jsem, že *Blastocystis* se vyskytovali u 59 % a trichomonády u 13, 6% ve šlechtitelském chovu. V produkčním chovu se *Blastocystis* vyskytovali u 50% a trichomonády u 37, 5%.

## Summary

Protists of the genus *Blastocystis* belong among anaerobic unicellular, polymorphic organisms inhabiting lower intestinal tract of numerous invertebrates and vertebrates including humans. The protist can be easily cultivated on several types of media. In my work, I used cultivation on media of Dobell-Leidlaw. *Blastocystis* can be divided in at least ten subtypes, and new subtypes are still being described. In pigs, subtypes 5 and 1 are most commonly found. It is not quite clear, which one is main *Blastocystis* subtype in pigs. Other subtypes that can be found in pigs are 2 and 3.

*Blastocystis* infection is quite common in developing countries. It is not clear whether or not to use medicaments to cure the infection as it appears to disappear spontaneously. Anyway, metronidazole is most efficient antibiotic against *Blastocystis*.

Future studies should focus on dividing *Blastocystis* species into appropriate subtypes and unite the description of new subtypes, also on host specificity of *Blastocystis* subtypes and its influence on host health.

In the year 2009/2010 I collected samples in the breeding and production facilities of a pig farm from different categories (bred or auction sows and boars, female barren, gravid, suckling, and one bred boar). A total of 46 samples was cultivated using two-phase media (Dobell Leidlaw). I discovered that *Blastocystis* was observed in 59% and trichomonads in 13, 6% in selection breeding. In production breeding *Blastocystis* occurred in 50% and trichomonads in 37, 5%.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Abe, N., Nagoshi, M., Takami, K., Sawano, Y., Yoshikawa, H. (2002): A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Veterinary Parasitology* 106: 203 – 212.
- 2) Abe, N., Wu, Z., Yoshikawa, H. (2003): Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction Fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology Research* 90: 124 – 128.
- 3) Arisue, N., Hashimoto, T., Yoshikawa, H. (2003): Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology* 126: 1 – 9.
- 4) Clark, C. G., Diamond L. S. (2002): Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 329 – 341.
- 5) Čepička, I., Hampl, V., Kulda, J., Flegr, J. (2006): New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 542 – 551.
- 6) Gardner, B. B., Del Junco, D. J., Fenn, J., Hengesbaugh, J. H. (1980): Comparison of direct wet mount and trichrome staining techniques for detecting *Entamoeba* species trophozoites in stools. *Journal of Clinical Microbiology* 12: 656 – 658.
- 7) Hausmann, K., Hülsmann, N. (2003): *Protozoologie*. Academia: 347.
- 8) Hibler, Ch. P., Hammond, D. M., Caskey, F. H., Johnson, A. E., Fitzgerald, P. R. (1960): The Morphology and Incidence of the Trichomonads of Swine, *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond), *Tritrichomonas rotunda*, n. sp. and *Trichomonas buttreyi*, n.sp. *J. Protozool.* 7: 159 – 171.
- 9) Iguchi, A., Ebisu, A., Nagata, S., Saitou, Y., Yoshikawa, H., Iwatani, S., I.Kimata, I. (2007): Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitology International* 56: 107 – 112.

- 10) Jelínek, T., Peyerl, G., Löscher, T., von Sonnenburg, F., Nothdurft, H. D. (1997): The role of *Blastocystis hominis* as a possible intestinal pathogen in travellers. *Journal of Infection* 35: 63 – 66.
- 11) Katsarou-Katsari, A., Vassalos, C. M., Tzanetou, K., Spanakos, G, Papadopoulou, C., Vakalis, N. (2008): Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm Venereol* 88: 80 – 81.
- 12) Lee, M. G., Stenzel, D. J. (1999): A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitology Research* 85: 109–117.
- 13) Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, K. S. W., Ng. G. C., Chen, X. Q., Yap, E. H. (1996): Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Research* 82: 439 – 444.
- 14) Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, K. S. W., Chen, X. Q., Ng. G. C. Yap, E. H. (1997): Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research* 83: 319 – 325.
- 15) Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, K. S. W., Chen, X. Q., Yap, E. H. (1999): Development of *Blastocystis hominis* Cysts into Vacuolar Forms *in vitro*. *Parasitology Research* 85: 103 – 108.
- 16) Moghaddam, D. D., Ghadirian, E., Azami, M. (2005): *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim / sulfamethoxazole. *Parasitology Research* 96: 273 – 275.
- 17) Morris, S. J., Whipps, Ch. M., Ganac, R. D., Hudson, N. R., Kenneth Boroom, K. (2009): Association of Blastocystis subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitology Research* 104: 341 – 345.
- 18) Ng, G. C., Tan, K. S. W. (1999): Colony Growth as a Step Towards Axenization of *Blastocystis isolates*. *Parasitology Research* 85: 678 – 679.
- 19) Noël, Ch., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V. P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L. - Ch., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M. L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L., Eric Viscogliosi, E. (2005): Molecular Phylogenies of

- Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species, and Zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 348 – 355.
- 20) Ok, Ü. Z., Girginkardesler, N., Balcioglu, C., Ertan, P., Pirildar, T., Kilimcioglu, A. A. (1999): Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *American Journal of Gastroenterology* 94: 3245 – 3247.
- 21) Pérez-Cordón, G., Rosales, M. J., del Mar Gavira, M., Valdez, R. A., Vargas, F., Córdova, O. (2007): Finding of *Blastocystis* sp. in bivalves of the genus *Donax*. *Rev. peru. biol.* 14: 301 – 302.
- 22) Phillips, B. P., Zierdt, C. H. (1976): *Blastocystis hominis*: pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. *Experimental Parasitology* 39: 358 – 364.
- 23) Singh, M., Suresh, K., Ho, L. C., Ng, G. C., Yap, E. H. (1995): Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 81: 446 – 450.
- 24) Snowden, K., Logan, K., Blozinski, C., Hoevers, J., Holman, P. (2000): Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis* isolates from animal hosts. *Parasitology Research* 86: 62 – 66.
- 25) Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S.W., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., Clark, C.G. (2007): Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends in Parasitology* 23: 93 – 96.
- 26) Stensvold, C. R., Alfellani, M. A., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E. L., Maddox, Ch., Nielsen, H. V., Clark, C. G. (2009): Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal for Parasitology* 39: 473 – 479.
- 27) Stenzel D. J., Boreham P. F. L. (1996): *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 9: 563 – 584.

- 28) Stenzel, D. J., Lee, M. G., Boreham, P. F. L. (1997): Morphological Differences in *Blastocystis* Cysts – an Indication of Different Species? *Parasitology Research* 83: 452 – 457.
- 29) Suresh, K., Mak, J. W., Chuong, L. S., Rangunathan, T., Init, I. (1997): Sac-like Pouches in *Blastocystis* from the House Lizard *Cosymbotus platyurus*. *Parasitology Research* 83: 523 – 525.
- 30) Tan, K. S. W., Ng, G. C., Quek, E., Howe, J., Ramachandran N. P., Yap, E. H., Singh, M. (2000): *Blastocystis hominis*: a Simplified, High - efficiency Method for Clonal Growth on Solid Agar. *Experimental Parasitology* 96: 9 – 15.
- 31) Tan, K. S. W., Singh, M., Yap, E. H. (2002): Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal for Parasitology* 32: 89 – 804.
- 32) Tan, K. S. W. (2008): New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 21: 639 – 655.
- 33) Tanizaki, A., Yoshikawa, H., Iwatani, S., Kimata, I. (2005): Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. *Parasitology Research* 96: 57 – 61.
- 34) Tyler, B.M. et. al. (2006): Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science Magazine* 313: 1261 – 1266.
- 35) Yoshikawa, H., Kuwayama, N., Enose, Y. (1995): Histochemical detection of carbohydrates of *Blastocystis hominis*. *Jornal of Eukaryotic Microbiology* 42: 70 – 74.
- 36) Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I. K., Hossain, M. B., Zaman, V., Haque, R., Takahashi, Y. (2004): Polymerase chain reaction based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology Research* 92: 22 – 29.
- 37) Yoshikawa, H., Nagono, I., Yap., E. H., Singh, M., Takahashi, Y. (2007): DNA Polymorphism Revealed by Arbitrary Primers Polymerase Chain



- Reaction Among *Blastocystis* Strains Isolated from Humans, a Chicken, and a Reptile. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 127 – 130.
- 38) Zaman, V., Howe, J., Ng, M. (1997): Observations on the Surface Coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 83: 731 – 733.
- 39) Zaman, V., Howe, J., Ng, M., Goh, T. K. (1999): Scanning Electron Microscopy of the Surface Coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 85: 974 – 976.
- 40) Zierdt, C. H., Swan, J. C. (1981): Generation Time and Growth Rate of the Human Intestinal Parasite *Blastocystis hominis*. *J. Protozool.* 28: 483 – 485.
- 41) Zierdt, Ch. H. (1991): *Blastocystis hominis*-Past and Future. *Clinical Microbiology reviews* 4: 61 – 79.