

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
KATEDRA VETERINÁRNÍCH DISCIPLIN A KVALITY PRODUKTŮ

Studijní program: N4101 ZEMĚDĚLSKÉ INŽENÝRSTVÍ

Studijní obor: ŽIVOČIŠNÉ BIOTECHNOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BLASTOCYSTIS U PRASAT

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Martin Kostka Ph.D.

Autor diplomové práce:

Bc. Ivana Horská

2011

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana HORSKÁ**
Osobní číslo: **Z09731**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Živočišné biotechnologie**
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: pokusit se odhadnout prevalenci blastocystis u prasat, charakterizovat prasečí kmeny blastocystis molekulárně a stanovit, do kterého genotypu patří.

Metodika: po odebrání vzorů výkalů prasat se studentka pokusí vykultivovat střevní prvoky, především Blastocystis, na kultivačních médiích, která si sama připraví. Z izolované DNA pomocí PCR získá sekvenci SSU rDNA Blastocystis. Získané sekvence budou analyzovány fylogenetickými metodami. Výsledky práce budou statisticky zpracovány a prezentovány pomocí obrázků, tabulek či grafů.

Finanční zajištění: finance na materiální zajištění práce budou poskytnuty z grantu MSM6007665806

Rozsah grafických prací: **obrázky, grafy a tabulky**

Rozsah pracovní zprávy: **přibližně 40-50 stran**

Forma zpracování diplomové 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.**
- Stenzel, D. J., Boreham, P. F. L. (1996): **Blastocystis hominis revisited. Clin. Microbiol. Rev. 9, 563 - 584.**

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Martin Kostka, Ph.D.

Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Datum zadání diplomové práce: **14. března 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **29. dubna 2011**



prof. Ing. Milošlav Šoch, CSc.
děkan

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

L.S.



prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 14. března 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma *Blastocystis* u prasat vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 29.dubna 2011

.....
Ivana Horská

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Mgr. M. Kostkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Doc. Ing. M. Kváčovi, Ph.D., za umožnění práce v jeho laboratoři a zpřístupnění sbírky vzorků DNA pro mé experimenty.

Abstrakt

Blastocystis je obligátně anaerobní prvok, který se běžně vyskytuje ve střevním traktu mnoha zvířat i lidí a je celosvětově rozšířen. Jedná se o geneticky velmi variabilní a rozporuplný organismus, u kterého je třeba prozkoumat a objasnit mnoho aspektů jeho biologie.

Ve vybraném zemědělském družstvu byly v průběhu roku 2010 odebrány pro parazitologické vyšetření vzorky výkalů prasat. Celkem bylo odebráno a vyšetřeno kultivační metodou dle Dobell-Leidlaw (1926) 40 vzorků, z toho pozitivních na *Blastocystis* bylo 19 vzorků. Další vzorky byly vyšetřeny pomocí molekulárních metod (PCR). Jejich pomocí bylo získáno celkem 5 sekvencí *Blastocystis*, které bylo možné dobře zařadit do podtypů 1 a 5.

Klíčová slova: *Blastocystis*, variabilita, prasata

Abstrakt

Blastocystis is an obligately anaerobic protist, commonly found in intestinal tract of numerous animals and humans across whole world. It is genetically very variable and rather enigmatic organism. Many aspects of its biology need to be further studied and clarified.

On a chosen farm were during the year 2010 collected samples of pig faeces for parasitological survey. A total number of 40 samples was collected and cultivated by the method of Dobel-Leidlaw (1926). Of them, 19 was positive for *Blastocystis*. Other samples were checked by molecular methods (PCR). Using them, five *Blastocystis* sequences were obtained, which clearly belong to subtypes 1 and 5.

Keywords: *Blastocystis*, variability, pigs

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled.....	9
2.1. Základní pojmy v parazitologii	9
2.1.1. Rozdělení parazitů a hostitelů.....	9
2.1.2. Vztah parazit - hostitel.....	10
2.2. <i>Blastocystis</i>	11
2.2.1. Základní charakteristika.....	11
2.2.2. Taxonomická klasifikace.....	11
2.2.2.1. Historie.....	11
2.2.2.2. Taxonomické zařazení rodu <i>Blastocystis</i>	13
2.2.2.3. Genetická rozmanitost	14
2.2.3. Morfologie jednotlivých forem	17
2.2.3.1. Vakuolární a granulární forma.....	17
2.2.3.2. Multivakuolární a avakuolární forma	18
2.2.3.3. Améboidní forma.....	18
2.2.3.4. Cysta	19
2.2.4. Životní cyklus	21
2.2.5. Infekce a onemocnění	23
2.2.5.1. Epidemiologie a prevalence.....	23
2.2.5.2. Přenos.....	24
2.2.5.3. Klinické příznaky.....	24
2.2.5.4. Diagnostika	25
2.2.5.5. Terapie	26
2.2.5.6. Prevence.....	27
3. Materiál a metody	28
3.1. Kultivace vzorků výkalů ve dvoufázovém médiu podle Dobella- Leidlawa (1926), modifikováno	28
3.1.1. Složení Ringerova roztoku.....	29
3.2. PCR	29
3.3. Elektroforéza	31
3.4. Sekvenování.....	32
3.5. Fylogenetické analýzy.....	32

3.5.1. Příprava alignmentu	32
3.5.2. Tvorba fylogenetických stromů	33
4. Výsledky	34
4.1. Kultivace a mikroskopie.....	34
4.2. PCR a sekvenování	35
4.3. Fylogenetické analýzy	36
5. Diskuse	39
6. Souhrn.....	40
7. Summary.....	41
8. Seznam použité literatury	42

1. Úvod

Blastocystis je jednobuněčný parazitický prvok, který se běžně vyskytuje ve střevním traktu široké škály zvířat i lidí.

Přesto, že byl objeven již kolem roku 1900, pokrok ve výzkumu byl postupný a náročný z několika důvodů - malý počet laboratoří, které by se zabývaly problematikou a studiem parazita, existence genetické rozmanitosti komplikovalo porovnání a ověření dat, absence vhodného zvířecího modelu komplikovala vyšetření jeho imunologie a patologie. Vznikaly nesrovnalosti v literatuře, zejména v důsledku použití nestandardizovaných diagnostických metod a vyvstávaly tak obtíže při identifikaci parazita.

Biologie tohoto parazita byla lépe pochopena až v poledních letech, ale stále se jedná o rozporuplný organismus a je třeba prozkoumat a objasnit mnoho aspektů jeho biologie. V současné době se obnovil zájem o tohoto parazita z důvodu přezkoumání klasifikace, genetické rozmanitosti, způsobu přenosu, patologického potenciálu, životního cyklu a z důvodu upřesnění molekulární diagnostické techniky.

Cílem mé diplomové práce je odhadnout prevalenci *Blastocystis* u prasat, pomocí molekulárních metod charakterizovat prasečí kmeny *Blastocystis* a stanovit, do kterého genotypu patří.

2. Literární přehled

2.1. Základní pojmy v parazitologii

Parazitologie je věda, která se zabývá cizopasnictvím, jedná se vlastně o obor ekologie, tj. nauky o vztazích různých organismů k prostředí i k sobě navzájem (Jírovec et al., 1977).

Parazitismus je jednou z nejrozšířenějších životních strategií. Organismy v přírodě nikdy nežijí samy, žijí společně s dalšími organismy. Parazitismus je jedním z typů tohoto soužití, při kterém jeden z partnerů má ze soužití prospěch a druhý škodu (Volf a Horák, 2007). Tento biologický jev je v přírodě velmi rozšířen, nelze ho chápat jako výjimečnou či náhodnou formu života. Jedná se o logický důsledek vzniklý působením široké škály různých činitelů ve vývoji živočichů a jejich vzájemných vztahů (Ryšavý et al., 1989) a má velmi důležitou roli v evoluci (Volf a Horák, 2007).

Parazit je organismus, který žije na úkor jiného organismu a je s ním svým životním cyklem těsně vázán po kratší či delší dobu (Ryšavý et al., 1989).

2.1.1. Rozdělení parazitů a hostitelů

Tato práce je zaměřená na parazity rodu *Blastocystis*, proto dále budou popsány jen termíny, které s těmito organismy souvisejí:

- Podle místa, kde se parazit nachází, *Blastocystis* řadíme mezi **vnitřní** parazity (endoparazity), tzn. že žijí uvnitř těla hostitele (Ryšavý et al., 1989).
- Z hlediska životního cyklu je řadíme mezi **jednohostitelské** (monoxenní) parazity (Volf a Horák, 2007).
- Po celé své aktivní období žijí uvnitř svého hostitele a na základě toho je řadíme mezi **permanentní** (trvalé) parazity (Ryšavý et al., 1989).
- V těle hostitele se množí, onemocnění probíhá spíše akutně a končí obvykle uzdravením hostitele, případně vznikem imunity proti této infekci. Proto je řadíme mezi **mikroparazity** (Volf a Horák, 2007).

- **Obligátní** parazit musí bezpodmínečně část svého života žít paraziticky, aby mohl dokončit svůj vývoj, bez svého hostitele není schopen množení a života. Část svého vývoje realizují ve vnějším prostředí jako cysty (Volf a Horák, 2007; Ryšavý et al., 1989).
- Každý hostitel *Blastocystis* je **definitivní** (Volf a Horák, 2007).

2.1.2. Vztah parazit-hostitel

Vztah parazit–hostitel mezi oběma partnery vytváří systém vzájemného působení a ovlivňování. Aby tento systém mohl vzniknout, je třeba splnit některé základní podmínky:

- Musí být zajištěna možnost kontaktu parazita a hostitele, forma tohoto kontaktu závisí na způsobu rozšiřování obou složek systému, na jejich chování a na ekologických podmínkách, které v daném biotopu převládají.
- Hostitel musí zajistit svému parazitu vhodné podmínky pro jeho další vývoj. Tyto podmínky mohou být závislé na fyziologických či morfologických vlastnostech hostitele, které determinují jeho vhodnost nebo nevhodnost pro existenci daného parazita.
- Parazit za normálních podmínek musí být schopen odolávat jakýmkoli reakcím hostitele namířeným specificky proti němu. Pokud jsou splněny všechny tyto podmínky, je možný vznik tohoto systému.

Podmínky vzniku vztahu parazit-hostitel však nejsou trvalé, mohou se měnit v průběhu vývoje, růstu hostitele a parazita, ročního období nebo klimatických změn (Ryšavý et al., 1989).

2.2. Blastocystis

2.2.1. Základní charakteristika

Blastocystis je obligátně anaerobní prvok, který se běžně vyskytuje ve střevním traktu mnoha zvířat i lidí a je celosvětově rozšířen (Pakandl, 1999; Sohaila et al., 2005). Přesto, že byl objeven již kolem roku 1900 (Tan, 2008; Tan et al., 2010), pokrok ve výzkumu byl postupný a náročný (Tan et al., 2002), až v posledních desetiletích došlo za pomoci moderních molekulárních metod k významnému pokroku ve výzkumu a pochopení biologie tohoto prvoka (Tan, 2008).

Blastocystis je geneticky velmi variabilní organismus, není jasné, kolik druhů existuje. Donedávna byl uznán pouze druh *Blastocystis hominis*, který je izolovaný ze střevního traktu lidí (Yoshikawa et al., 1998; Volf a Horák, 2007). Parazity izolované ze střevního traktu zvířecích hostitelů označujeme jako *Blastocystis* spp. (Abe et al., 2003; Noël et al., 2005; Pérez-Cordón et al., 2007; Stensvold et al., 2007). V poslední době bylo popsáno i několik dalších druhů, zejména z ptáků, plazů a krys (Chen et al., 1997; Noël et al., 2005).

Na základě morfologických a fyziologických studií bylo zjištěno, že buňky *Blastocystis* jsou převážně kulovité, může mít jedno nebo několik jader. Buňku téměř vyplňuje velká vakuola, dále buňka obsahuje endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex a četné mitochondrie, které jsou vakuolou zatlačeny na periferii pod povrchem buňky (Zierdt a Swan, 1981; Volf a Horák, 2007). *Blastocystis* nemají žádné bičíky ani povrchové mikrotubuly, neobsahují buněčnou stěnu. Existují rozdíly ve velikost a tvaru buňky (Sohaila et al., 2005).

2.2.2. Taxonomická klasifikace

2.2.2.1. Historie

Poprvé definoval rod *Blastocystis* již kolem roku 1900 Alexeieffa (Tan et al., 2002), který navrhoval jméno *Blastocystis entericola* (Stenzel a Boreham, 1996) a považoval tento organismus za neškodnou kvasinku (Sohaila et al., 2005). Rozsáhlý morfologický

popis zveřejnil a životní cyklus popsal Brumpt, který navrhoval jméno *Blastocystis hominis* pro organismy izolované z lidských výkalů, toto jméno bylo používáno nejčastěji a zachovalo se až do současné literatury (Stenzel a Boreham, 1996).

Blastocystis byl původně chybně klasifikován jako cysta bičíkovců, kvasinka, rostlinný materiál nebo plíseň (Tan, 2008). Až do sedmdesátých let minulého století bylo publikováno velmi málo údajů (Stenzel a Boreham, 1996), zájem o tento organismus obnovil až Zierdt, který provedl řadu studií převážně mezi lety 1970 a 1980 (Tan et al., 2002). Studie Zierdta poskytla první nesporný důkaz, že *Blastocystis* není plíseň nebo kvasinka, jak navrhovali různí autoři jako Alexeieffa, Brumpt, O'Connor, Beaurepaire – Araga, Knowles a Das Gupta a Laver. Dále poskytl důkaz, že se nejedná ani o cystu jiného organismu (např. *Trichomonas*), jak navrhovali Bensen, Bohne a Prowazek (Stenzel a Boreham, 1996). Právě Zierdt překvalifikoval na základě morfologických a fyziologických studií v roce 1967 *Blastocystis* na prvoka (Tan, 2008; Sohaila et al., 2005).

V roce 1978 byl *Blastocystis* klasifikován jako výtrusovec (Sporozoa), podřád *Blastocystina*, v roce 1988 byl zařazen do skupiny Sarcodina. Na základě molekulárních studií genu pro SSU rRNA však Jonson, Tganou, Boreham, Bacerstock v roce 1989 nenašli spojitost mezi *Blastocystis* a těmito organismy (Pérez-Cordón et al., 2007).

Johnson et al. (1989) došli k závěru, že *Blastocystis* fylogeneticky nesouvisí s kvasinkami, plísněmi, skupinou Sarcodina a ani s výtrusovci. Na základě molekulární analýzy SSU rDNA došli k závěru, že *Blastocystis* patří mezi Stramenopila (Tan, 2008). Stramenopila je synonymem Heterokonta, jedná se o komplexní a heterogenní skupinu, která zahrnuje jednobuněčné i mnohobuněčné organismy, jak heterotrofní tak i fotosyntetické zástupce (Tan et al., 2002; Tan, 2008). Jejich studie také ukázala, že *Blastocystis* je příbuzná bičíkovců rodu *Proteromonas*. Tyto dva organismy sdílejí některé rysy životního cyklu, oba jsou střevními endosymbionty obratlovců a jejich životní cykly zahrnují cystu odolnou k podmínkám prostředí. *Blastocystis* ale na rozdíl od *Proteromonas* nemají bičíky ani mikrotubuly (Tan et al., 2002).

Na základě nových molekulárně-fylogenetických studií se *Blastocystis* ukázal nejbliže příbuzný skupině Slopalinida, který zahrnuje právě bičíkovce čeledi Proteromonadidae a Opalinidae (opalinky) (Tan, 2004; Volf a Horák, 2007).

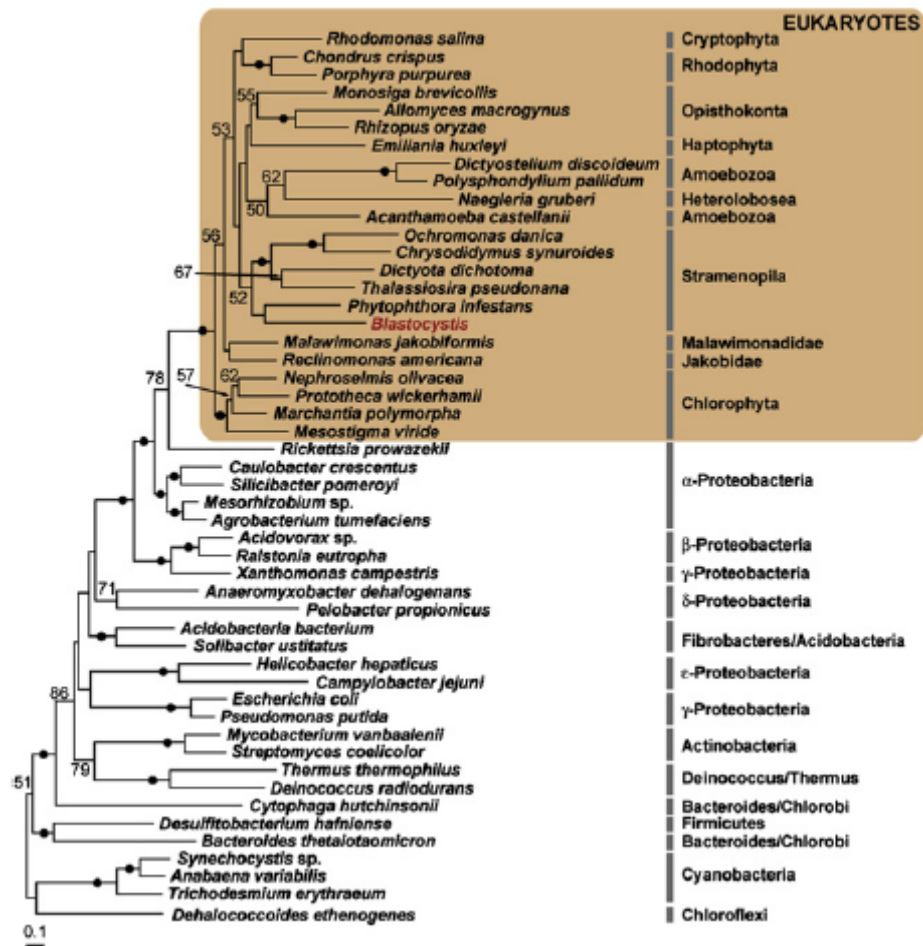
Taxonomická klasifikace rodu *Blastocystis* je velmi náročná (Tan, 2008), základní znalosti jeho biologie nám poskytly díky velkému úsilí hlavně Zierdt a další vědecké

skupiny vedené Borehamem a Stenzelem (mezi lety 1980 a 1990) a Yoshikawa a Singh v roce 1990 (Tan, 2004). K vyřešení této problematiky je třeba dalších studií.

2.2.2.2. Taxonomické zařazení rodu *Blastocystis*

- **Nadříše:** Eukaryota
- **Říše:** Chromaleveolata
- **Podříše:** Stramenopila (Heterokonta)
- **Kmen:** Slopalinida » **rod:** *Blastocystis* (Hausmann a Hülsmann, 2003; Volf a Horák, 2007).

Obrázek č. 1: Fylogenetická pozice *Blastocystis*



Zdroj: Stechmann et al., 2008

2.2.2.3. Genetická rozmanitost

Četné studie nám objasnily výskyt *Blastocystis* u lidí a v celé škále živočichů, do které patří prasata, opice, skot, morčata, plazi, ptáci, hlodavci, či švábi. V nedávně době byl také popsán z mořských měkkýšů, čímž se neustále zvyšuje rozsah hostitelů (Abe et al., 2002; Pérez-Cordón et al., 2007).

Blastocystis je geneticky velmi variabilní organismus (Stensvold et al., 2009), který by měl být rozdělen do jednotlivých podtypů (Iguchi et al., 2009). Není jasné kolik v současné době existuje podtypů, některé studie uvádějí 9 podtypů (Stensvold et al., 2007; Iguchi et al., 2009; Tan et al., 2010), jiné studie uvádějí až 12 existujících podtypů (Tan, 2008).

Genetická variabilita byla pozorována u obou skupin, *Blastocystis* izolovaných od lidí i od zvířat (Tan, 2008). Studie také ukázaly, že mohou existovat podobnosti mezi izoláty od různých hostitelů a naopak, že rozdíly mohou být patrné v izolátech od stejného hostitele (Tan, 2004). PFGE (elektroforéza) chromosomů ukázala různé karyotypy, tedy rozdíly ve velikosti a množství chromosomu u různých izolátů (Böhm – Gloning, 1997).

Pro detekci genetické rozmanitosti byly použity různé molekulární metody, což mimo jiné vedlo ke vzniku matoucí terminologie v určování a označování podtypů *Blastocystis* (Stensvold et al., 2007). Metody RAPD a RFLP se ukázaly jako nevhodné ve srovnání s molekulární metodou PCR, která se ukázala jako praktická a citlivější pro klasifikaci a identifikaci genotypů (Yiming et al., 2006). Jednotlivé podtypy byly popsány na základě genu pro RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA). V této souvislosti je použití termínu *Blastocystis hominis* nevhodné, místo toho by měl být parazit označen jen *Blastocystis* sp a příslušným podtypem n – nejlépe podle klasifikace dle Stensvolda et al. 2007 (Tan et al., 2010). Přehled dalších systémů klasifikace podtypů a jejich vzájemných vztahů je uveden v tabulce č. 1.

Následuje stručný přehled známých podtypů:

Podtyp 1 byl diagnostikován u lidí, prasat (Tan, 2004), dále u primátů, skotu a ptáků (Abe, 2004).

Podtyp 2 byl diagnostikován u ptáků – kachny, krůty a kuřat (Tan, 2004), u lidí a primátů (Abe, 2004) a u prasat (Tan, 2008).

Podtyp 3 je považován za lidský podtyp (Tan, 2008), ale v některých studiích byl popsán i u hlodavců (Tan, 2004), dobytka a prasat (Abe, 2004).

Podtyp 4 byl diagnostikován u primátů, ptáků, hlodavců (Abe, 2004; Tan, 2008).

Podtyp 5 byl diagnostikován u skotu a prasat (Abe, 2004; Tan, 2008).

Podtypy 6 - 7 jsou považovány za živočišné podtypy, protože byly izolovány pouze ze skotu a prasat (Yiming et al., 2006) a z ptáků (Tan, 2008).

Podtypy 8 - 9 byly nejvíce blízké podtypům 4 a 5. Je velmi málo informací o podtypech 8 a 9, podtyp 8 byl hlášen u bažantů, opic, a lidí. Podtyp 9 byl hlášen u lidí (Tan, 2008).

Současné dělení na jednotlivé podtypy poskytuje pouze předběžnou informaci o genetické příbuznosti mezi jednotlivými izoláty (Noël et al., 2005). Problémy ohledně určení druhů *Blastocystis* a metod, které by jednotlivé druhy rozlišily, nebyly zatím uspokojivě vyřešeny. Byly popsány druhy u kura domácího (*Blastocystis galli*), kachny domácí (*Blastocystis anatis*), domácí husy (*Blastocystis anseri*) (Belova 1991, 1992, podle Stenzel, 1996, Lee a Stenzel, 1999), avšak vzhledem k tomu, že tyto druhy byly popsány především na základě předpokládané hostitelské specifity a nebyly charakterizovány molekulárně, je prakticky nemožné je identifikovat s některým s výše zmíněných podtypů. Další druhy byly popsány např. z mořského hada *Lapemis hardwickii* (*Blastocystis lapemi*) (Surech et al., 1997; Yoshikawa et al., 2004), ze želvy *Geochelone elephantopus* (*Blastocystis geocheloni*) (Surech et al., 1997) a z krajty mřížkované (*Blastocystis pythoni*) (Chen et al., 1997).

Tabulka č. 1: Srovnání označení podtypů Blastocystis u různých autorů a návrh konsensní terminologie

Clade ^a	Subtypy ^b	Skupiny a subtypy ^c	Subtypy ^d	Ribodemy ^e f	Podskupiny ^g	Cluster ^h	Subtypy ⁱ	Subtypy
I	I	I/1	1	1;8 ¹	III	E	1;1	1
II	II	II/5	5	6	V	C;D	-	2
-	X	I+II/1+5	-	-	-	-	-	
III	III	III/3	3	2;7;4;5	I;II	A	3	3
IV	IV	IV/7	7	3	IV	B	-	4
-	IVa	IV/7	-	-	-	-	-	8
V	V	V/6	6	-	-	-	-	5
VI	VI	VI/4	4	9 ¹	-	-	4	6
-	VIa	VI/4	-	-	-	-	-	9
VII	VII	VII/2	2	10	VI ^m	-	2	7
-	VII	VII/2	-	-	-	-	-	7

^a„Clades“ podle Aurisue et al. a Yoshikawa et al.; ^bsubtypy podle Scicluna et al.; ^cskupiny podle Noel et al.; ^dSubtypy podle Yoshikawa et al.; ^eribodemy podle Clark a Yoshikawa et al.; ^fribodemy podle Clark; ^gpodskupiny podle Böhm – Gloning; ^hklastr podle Stensvold et al.; ⁱsubtypy podle Yoshikawa et al.; ¹ribodemy 8 a 9 podle Yoshikawa et al a Keneda et al.; ^mpodskupiny VI podle Thathaisong et al.

Zdroj: Stensvold et al., 2007

2.2.3. Morfologie jednotlivých forem

Blastocystis je polymorfní organismus, jehož hlavní a obecně uznávané formy jsou vakuolární, granulární, multivakuolární, vakuolární a améboidní formy a cysty (Tan, 2004). Ve skutečnosti *Blastocystis* může vytvářet zarážející množství forem v rámci jedné kultury. Rozsáhlá variabilita ve formách učinila studium buněčné biologie *Blastocystis* náročným, což vede čas od času k mylné interpretaci dat (Tan, 2008).

2.2.3.1. Vakuolární a granulární forma

Vakuolární forma je považována za typickou buněčnou formu *Blastocystis*. Tato forma je obecně používaná k diagnostice *Blastocystis*. Granulární forma má podobnou strukturu jako vakuolární forma, ale má odlišný obsah. Proto morfologie těchto dvou forem bude popsána společně (Stenzel a Boreham, 1996).

Vakuolární a granulární formy mají obvykle kulovitý či oválný tvar (Abe et al., 2002). Vakuolární formy se velmi liší ve velikosti, rozmezí je od 2 do 200 μm s průměrem od 4 do 15 μm (Stenzel a Boreham, 1996; Tan, 2008). Granulární formy jsou často o něco větší než vakuolární formy, průměr činí 10 až 60 μm (Stenzel a Boreham, 1996).

Centrální vakuola může zabírat až 90% buňky, obklopuje ji jen tenká vrstva cytoplazmy a obvykle obsahuje jemně zrnitý nebo vločkovitý materiál v případě vakuolární formy (Tan et al., 2002). V případě granulární formy může centrální vakuola obsahovat granula několika morfologických typů (Stenzel a Boreham, 1996). Přesná funkce centrální vakuoly není známa, dle různých autorů může mít následující funkce: skladování organel, zásobní funkce, reprodukční funkce, nebo ukládání apoptotických tělísek během programované buněčné smrti. Jedná se pouze o hypotézy, které nebyly testovány (Tan, 2004).

V cytoplazmě se nacházejí organely typické pro Eukaryota, které jsou pozorovatelné pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) (Zeman et al., 1998; Tan, 2008). Mitochondrie, lišící se v morfologii a počtu, obvykle obsahují malé množství krist. Golgiho komplex je přilehlý k jádru. Jader může být i několik, až čtyři, a v průměru jsou velká přibližně 1 μm (Stenzel a Boreham, 1996).

Buňky *Blastocystis* jsou často obklopeny povrchovou vrstvou o různé tloušťce, která je někdy označovaná jako fibrilární plášť. Fibrilární plášť je často silnější u čerstvě izolovaných *Blastocystis* a postupně se tenčí během dlouhodobé laboratorní kultury, důvod ztenčování je neznámý. Povrchový plášť obsahuje řadu sacharidů a předpokládá se, že hraje roli při zachycování bakterií sloužících jako výživa. Dále jako ochrana před osmotickým šokem nebo jako mechanická bariéra zabraňující vazbě proteinů imunitního systému (Tan, 2008).

2.2.3.2. Multivakuolární a avakuolární forma (Stenzel a Boreham, 1996)

Ve fekálním materiálu je v buňkách přítomen spíše větší počet malých vakuol různé velikosti a morfologie než jedna velká vakuola. Multivakuolární formy jsou menší než vakuolární a granulární formy, jejich velikost činí v průměru 5 až 8 μm . Není jasné, zda malé vakuoly přítomné v multivakuolární formě jsou vzájemně oddělené, nebo se jedná o propojenou síť. Buňky obsahují jedno nebo dvě jádra. Na povrchu mají silný glykoproteinový plášť zřejmě sloužící k zachycování bakterií, které slouží jako potrava.

V lidském střevě se mohou nacházet i menší formy, které mají průměr 5 μm , taktéž obsahují jedno nebo dvě jádra, ale nemají žádnou vakuolu.

Avakuolární forma není obklopena pláštěm a obsahuje mitochondrie rozdílné morfologie s četnými kristami.

2.2.3.3. Améboidní forma

Améboidní forma se vyskytuje jen vzácně a existují rozpory v popisu její morfologie, zejména při použití elektronové mikroskopie (Tan, 2008).

Dunn et al. (1989) pomocí TEM poskytl podrobné popisy struktury této formy. Améboidní formy byly nepravidelného tvaru a poměrně malé, v průměru od 2,6 do 7,8 μm . Ve vakuolách byly pozorovány pohlcené bakterie, které slouží jako výživa (Tan et al., 2002). K dispozici má jednu nebo dvě pseudopodie, které se nezdají být zapojeny do pohybu (Tan, 2004). Autoři této studie nenalezli centrální vakuolu a Golgiho komplex (Tan et al., 2002).

Studie Tan (2008) ale ukázala pomocí světelné a elektronové mikroskopie, přítomnost centrální vakuoly, povrchového pláště, Golgiho komplexu i četných

mitochondrií v buňkách améboidní formy. Vzhledem ke genetické rozmanitosti organismu je možné, že odlišnosti v popisech jsou způsobeny rozdíly mezi genotypy *Blastocystis* (Tan, 2008).

2.2.3.4. Cysta

Cysta je nejnověji popsána forma *Blastocystis*, pozdní objev je způsoben malou velikostí, která činí v průměru od 2 až do 5 μm . To mohlo vést k záměně s fekálním odpadem (Tan, 2008). Tato forma byla poprvé nalezena ve vzorcích čerstvých výkalů u pacienta s AIDS (Stenzel a Boreham, 1996).

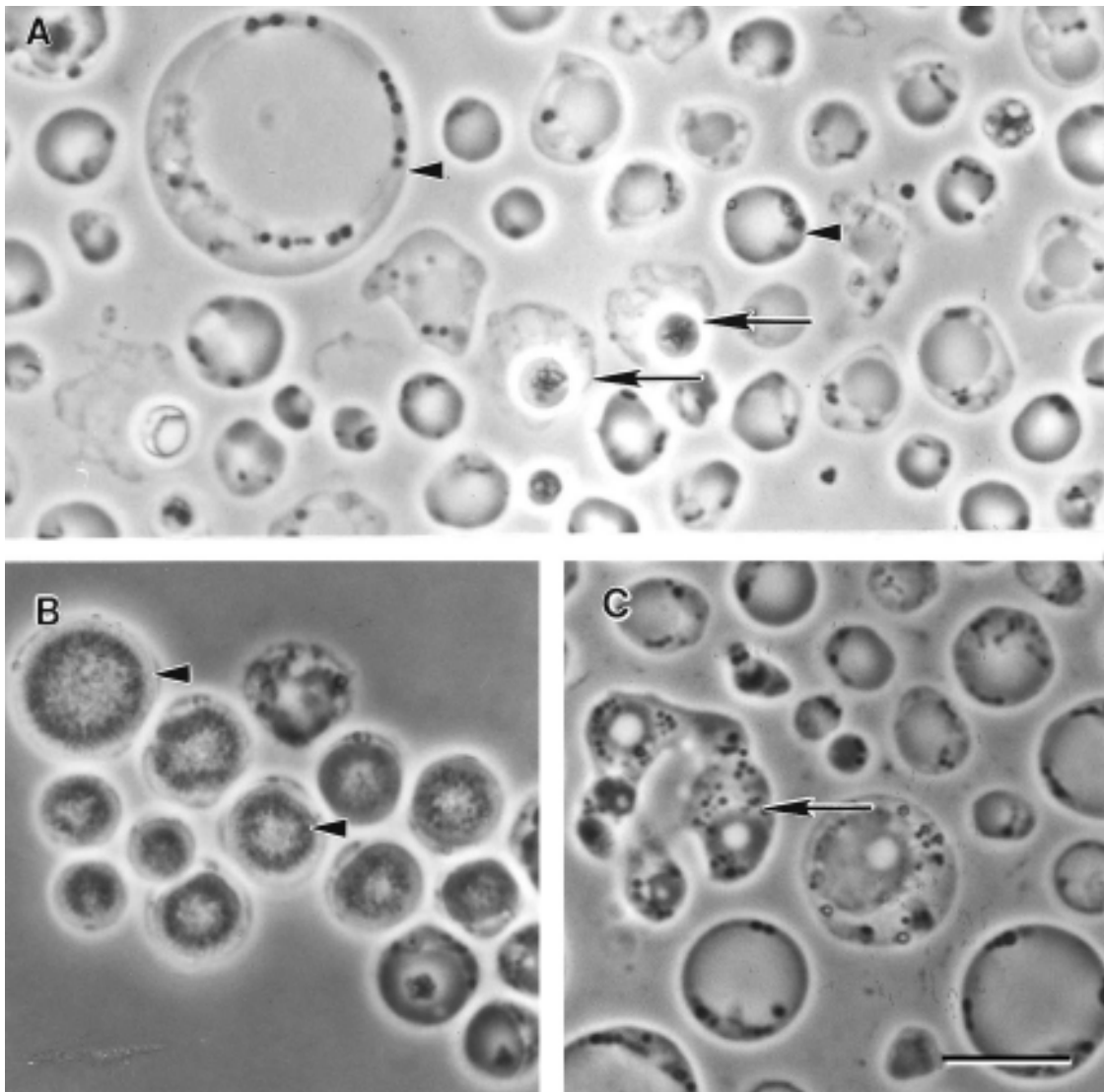
Cysty jsou variabilní ve tvaru, ale většinou mají vejčitý nebo kulovitý tvar. Jsou obklopeny tlustou stěnou, obsahují jedno až čtyři jádra, mitochondrie, malé vakuoly a ložiska glykogenů a lipidů (Tan, 2004; Tan, 2008).

Pozorovány byly dva typy cyst, jeden typ obsahoval fibrilární vrstvu a druhý nikoliv, což snad poukazuje na přítomnost různých druhů *Blastocystis* (Tan et al., 2002).

Cysty *Blastocystis* jsou zřejmě velmi odolné vůči nepříznivým podmínkám prostředí, jako je tomu i v případě mnoha jiných prvoků (Stenzel a Boreham, 1996). Tato forma je údajně schopna přežít ve vodě po dobu 19 dní při normální teplotě, studie ukázaly i schopnost přežít po dobu 1 měsíce při teplotě 25°C a 2 měsíce při teplotě 4°C. Cysty se ale ukázaly být citlivé na extrémní teploty a na dezinfekční prostředky (Tan, 2008).

Závěrem lze říci, že se jedná o nejvíce odolnou fázi v životním cyklu parazita a že hraje roli při přenosu (Tan, 2004).

Obrázek č. 2: Jednotlivé formy Blastocystis sp. ve fázovém kontrastu



A - Vakuolární forma a fekální cysta v in vitro axenické kultuře zobrazují rozsáhlou variaci ve velikosti.

B - Granulární forma s výraznou granulární inkuzí ve střední vakuole (hrot šípů).

C - Améboidní forma vytvářející pseudopodie.

Měřítko odpovídá 10 μm .

Zdroj: Tan, 2008

2.2.4. Životní cyklus

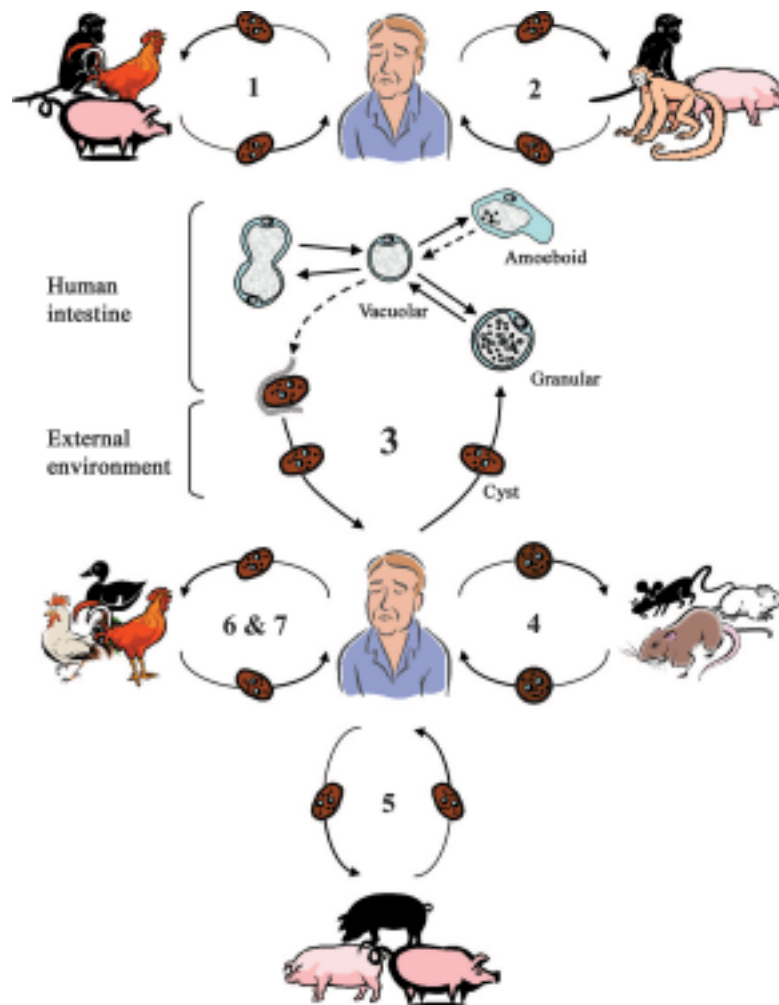
Byla navržena celá řada životních cyklů pro *Blastocystis*, ale mnohé z nich jsou plně nesrovnalostí (Stenzel a Boreham, 1996). Je to hlavně způsobeno absencí vhodného zvířecího modelu, což nám brání pochopit mnohé aspekty biologie *Blastocystis* a také polymorfní povahou organismu (Tan, 2004).

Existují studie, které tvrdí, že *Blastocystis* mají rozmanitý způsob rozmnožování, např.: binární dělení, schizogonii, pučení nebo tvorbu váčků (Stenzel a Boreham, 1996; Tan, 2004). Ale jediným prokazatelným způsobem reprodukce je binární dělení (Tan, 2008). Význam jednotlivých morfologických forem v životním cyklu parazita stále není úplně jasný (Stenzel a Boreham, 1996).

Životní cyklus (viz obr. č. 3) byl navržen s přihlédnutím na nedávné studie. Multivakuolární formy produkují cysty a ty jsou pak přeneseny do dalšího hostitele fekálně – orální cestou. Lidé a zvířata jsou nakaženi těmito fekálními cystami, které se vyvíjejí do vakuolární formy v tlustém střevě. Vakuolární forma se binárně dělí a může se vyvinout do améboidní či granulární formy. Vakuolární forma podstoupí během průchodu hostitelského střeva encystaci a následuje uložení ve výkalech. Fekální cysty mohou být chráněny fibrilární stěnou, která se postupně ztrácí v průběhu vývoje cyst. Autoři předpokládají, že tlustostěnné cysty mají význam pro externí přenos, zatímco tenkostěnné cysty mají význam pro autoinfekci (Tan, 2004; Tan, 2008).

Podle řady studií je obtížné stanovit v jakém pořadí se jednotlivé formy *Blastocystis* vyvíjejí. Za určitých kultivačních podmínek byl hlášen vývoj granulární formy z vakuolární formy. Z vakuolárních forem se pravděpodobně vyvíjejí améboidní formy. Informace o možnostech transformace z améboidní formy na vakuolární a avakuolární formy na cystu chybí (Tan, 2008).

Obrázek č. 3: Návrh životního cyklu Blastocystis s vyznačením hostitelské specifity a možností přenosu u jednotlivých podtypů



Hypotetické cesty jsou prezentovány tečkovanými čárami. Podtyp 1 je tvořen *Blastocystami* izolovanými ze savců a ptáků. Podtyp 2 tvoří *Blastocysty* izolované z primátů a prasat. Podtyp 3 je tvořen lidskými izoláty *Blastocystis*. Podtyp 4 tvoří *Blastocystis* izolované z dobytka a prasat. Podtyp 5 tvoří *Blastocystis* izolované z hlodavců, a podtypy 6 a 7 zahrnují ptačí izoláty *Blastocystis*. Navrhované schéma naznačuje, že lidé jsou potenciálně infikováni sedmi nebo i více podtypy *Blastocystis*, a že některá zvířata představují zdroj přenosu na člověka.

Zdroj: Tan, 2008

2.2.5. Infekce a onemocnění

2.2.5.1. Epidemiologie a prevalence

Údaje o prevalenci byly dříve neúplné a značně tak omezily naše chápání této infekce. V posledních letech byl i přes rozdíly v diagnostických metodách obnoven zájem o epidemiologii *Blastocystis*. Nedávné studie prevalence *Blastocystis* výrazně zlepšily poznatky o tomto parazitu – o jeho geografickém a demografickém rozšíření, způsobu přenosu, rizikových faktorech, patologii a dalších (Tan et al., 2010).

Výskyt infekce *Blastocystis* byl původně spojován s průjmy v tropických a subtropických oblastech, rozvoj příznaků byl také dáván do souvislosti s povětrnostními podmínkami, přičemž se infekce více vyskytovaly během horkých dnů a monzunových měsíců (Stenzel a Boreham, 1996).

V současné době je jasné, že infekce *Blastocystis* je celosvětově rozšířená a jedná se o nejčastěji parazitologicky izolovaného prvoka v tropických, subtropických a rozvojových zemích (Tan, 2004), dále u turistů, emigrantů, uprchlíků, dobrovolníků i adoptovaných dětí (Stenzel a Boreham, 1996; Sohaila et al., 2005). Obecně platí, že vyšší výskyt infekce je v rozvojových zemích (30 až 50 %) než v rozvinutých zemích (1,5 až 10 %), ale mohou existovat výjimky (Stenzel a Boreham, 1996), například prevalence u lidí v USA činí až 23 % (Tan, 2004). Vyšší prevalence *Blastocystis* v rozvojových zemích je pravděpodobně způsobena nedostatkem čisté vody, špatnými hygienickými podmínkami a návyky, špatnou kanalizací a odvozem odpadu (Sohaila et al., 2005). Vyšší prevalence je také zaznamenána v řadě studií u dětí a mladistvých. Nezdá se, že by existovaly zásadní rozdíly v prevalenci mezi muži a ženami. Výskyt infekce se tedy pravděpodobně neliší v závislosti na pohlaví jedince, ale může být ovlivněn věkem pacientů, jejich imunologickým stavem a faktory týkajícími se hygieny (Stenzel a Boreham, 1996).

Blastocystis je také běžně izolovaný prvok u celé řady zvířat, zejména u členovců, obojživelníků, plazů, ptáků a savců. Některá zvířata vykazují vysoký výskyt infekce, patří mezi ně potkani (60 %), prasata (70 až 95 %) a ptáci (50 až 100 %), zejména domácí slepice (95 až 100 %). Je zajímavé, že tato zvířata jsou také diskutována jako možný zdroj infekce při přenosu na člověka na základě fylogenetických a molekulárních studií. Prevalence u jiných zvířat je variabilní (Tan, 2004). Například

prevalence u psů v Německu a Malajsii byla 0 %, ale v Austrálii byla prevalence vysoká, až 71 %. Není zcela jasné, proč se výsledky prevalence liší, možným vysvětlením můžou být rozdílné podmínky chovu (Abe et al., 2002). Pozorování prevalence *Blastocystis* u jednotlivých zvířat vede některé autory k závěru, že potkani a krysy by mohli být dobrým zvířecím modelem (Tan, 2004).

2.2.5.2. Přenos

Četné studie prokázaly, že infekce *Blastocystis* je přenosná fekálně-orální cestou jako je tomu i u jiných gastrointestinálních prvoků (Stenzel a Boreham, 1996).

Přenos infekce je spojen se špatnými hygienickými návyky, expozice zvířecím hostitelům, konzumací kontaminovaných potravin a vody (Tan et al., 2010).

Je prokázáno, že cysta je jedinou přenosnou formou tohoto parazita (Yoshikawa et al., 2004).

K přenosu dochází mezi lidmi i mezi zvířaty, ale také ze zvířete na člověka a opačně, ze člověka na zvíře (Abe et al., 2002 a 2004, Noël et al., 2005; Eroglu a Koltas, 2010).

2.2.5.3. Klinické příznaky

Existuje mnoho vzájemně si odporujících zpráv, které tvrdí, že *Blastocystis* je nebo není příčinou onemocnění. Studie z posledních desetiletí naznačují patogenní potenciál tohoto parazita (Tan, 2008).

Ke klinickým příznakům onemocnění, které bylo způsobené *Blastocystis*, patří gastrointestinální symptomy, např. průjem, bolesti břicha, zvracení, nechutenství, nadýmání, pokles tělesné hmotnosti, potravinová intolerance a další nespecifické příznaky (Giacometti et al., 1999; Elwakil a Hewedi, 2010). *Blastocystis* dokonce může napadnout střevní tkáň. Becker et al. (1988) aplikoval injekčně *Blastocystis hominis* do podkoží potkanů, což vedlo k akutním reakcím a procesům souvisejícím s odumřením tkáně a k ohniskovému krvácení (Moe et al., 1998). Tento parazit však není nalézán pouze u pacientů s gastrointestinálními symptomy, ale také u zdravých jedinců bez jakýchkoliv příznaků (Yoshikawa et al., 2004; Iguchi et al., 2009).

K jiným příznakům spojeným s infekcí *Blastocystis* patří toxické a alergické reakce (Moe et al., 1998), některé zprávy poskytují přesvědčivé důkazy, že parazit způsobuje kožní onemocnění, zejména kopřivku (Tan et al., 2010).

Průzkumy ukazují, že některé populace mohou být náchylnější k infekcím způsobeným *Blastocystis*. U imunodeficitních jedinců, pacientů s HIV/AIDS, je zaznamenán vyšší výskyt této infekce, průjem je nejčastějším příznakem. *Blastocystis* je také jedním z nejčastěji izolovaných parazitů u pacientů s rakovinou, mezi nejčastější příznaky patří bolesti břicha, průjem a nadýmání. Vysoký výskyt infekce byl také pozorován u imunokompetentních dětí a mladistvých se sníženou imunitou a u dětí užívajících kortikosteroidy pro nefritický syndrom (Iguchi et al., 2009; Tan et al., 2010). Také u pacientů s alkoholickou cirhózou a chronickým výskytem hepatitidy B je zvýšené riziko získání infekce a může dojít k rozvoji závažnějším příznaků (Sohaila et al., 2005).

Blastocystis má vyšší prevalenci i v některých profesích, které zahrnují expozici zvířecím hostitelům, např. zaměstnanci na jatkách (Abe et al., 2003).

2.2.5.4. Diagnostika

Blastocystis byl dříve obvykle identifikován mikroskopicky přítomností vakuolární formy, která je snadno rozpoznatelná díky své velikosti a charakteristickému vzhledu a standardně se používala pro klinickou diagnózu (Stenzel a Boreham, 1996). Velké variace ve velikosti parazita (v rozmezí 5 až 40 μm) znesnadňovaly diagnózu, stejně jako mechanické porušení parazita bez pevné buněčné stěny. Nedávno studie ukazují také na přítomnost multivakuolární a vakuolární formy a cyst ve vzorcích stolice. Neznalost těchto menších forem mohla vést k přehlédnutí při diagnostice. Nákaza je běžná i za současného napadení jinými střevními patogeny, např. *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* nebo *Dientamoeba fragilis*. Přednostním způsobem diagnostiky je příprava trvalých barvených nátěrů ze vzorků stolice. K dispozici jsou ELISA testy, ty ale nejsou běžně prováděny. Molekulární metoda PCR je používána běžně pro výzkumné účely (Sohaila et al., 2005). Serologické metody poskytují rychlou a citlivou detekci mikrobiálních specifických protilátek, ale je jen hrstka studií, které používají tento postup pro diagnostiku *Blastocystis* (Tan et al., 2010).

2.2.5.5. Terapie

Léčba u infekce *Blastocystis* je předepsána pouze tehdy, když jiné etiologie odpovídajících zdravotních problémů byly vyloučeny. U přetrvávajících symptomů je vhodný antiprotozoální lék metronidazol (Tan et al., 2010). Inhibiční účinek na růst *Blastocystis* také ukázaly emetin dihydrochlorid, iodoquinol, furazolidon, a TMP-SMX. Nejběžněji používaný postup léčby je Metronidazol 750 mg (dávka u dětí 10mg / kg) perorálně třikrát denně po dobu 5 až 10 dní (Sohaila et al., 2005). Co-trimoxazol a paromomycin jsou často předepsané alternativy k metronidazolu. Při nesnášenlivosti těchto léků je třeba identifikovat alternativní možnosti léčby této infekce (Tan et al., 2010).

Tabulka č. 2: Možnosti léčby a režimy při infekci Blastocystis

	Dávka pro dospělé	Dětská dávka
Metronidazol	750 mg 3x denně po dobu 10 dnů 500 mg 3x denně po dobu 10 dnů 1,5 g 1x denně po dobu 10 dnů	15 mg/kg/den po dobu 10 dnů 20-30 mg/kg/den po dobu 10 dnů
TMP-SMX	320 mg TMP a 1,600 mg SMX 2x denně po dobu 7 dnů	6 mg/kg TMP a 30 mg/kg SMX 2x denně po dobu 7 dnů
Nitazotamide	500 mg 2x denně po dobu 3 dnů	100 mg 2x denně po dobu 3 dnů (od 1 do 3 let) 200 mg 2x denně po dobu 3 dnů (od 4 –do 11 let)

TMP-SMX - trimethoprim-sulfamethoxazole.

Zdroj: Tan et al., 2010

2.2.5.6. Prevence

Blastocystis je přenášen fekálně-orální cestou a zvířata a jejich exkrementy představují rizikový faktor pro nákazu lidí (Stenzel a Boreham, 1996).

Prevence spočívá v dobré hygieně, v přístupu k nezávadné pitné vodě, bezpečné likvidaci odpadů, předcházení úniku odpadů do pitné vody. U turistů by pitná voda měla být převařená nebo chlorovaná – ta by se měla použít nejen k pití, ale i k čištění zubů. Dále by se turisté měli vyvarovat konzumaci syrové zeleniny a ovoce (Sohaila et al., 2005).

3. Materiál a metody

Nejprve jsem ve vybraném zemědělském družstvu v jižních Čechách v průběhu roku 2010 odebírala vzorky výkalů od prasat. Vzorky jsem odebrala z podlahy kotce dřevěnou špachtlí do plastického kelímku a ještě tentýž den jsem vzorky zapracovala v parazitologické laboratoři. Bakteriologickou kličkou či špejlí jsem odebrala část výkalu a naočkovala do tekutého média připraveného podle metody Dobell-Leidlaw, poté jsem zkumavky vložila po dobu tří dní do termostatu s teplotou 37 °C. Po třech dnech jsem obsah zkumavky přeočkovala a opět po dobu tří dní kultivovala v termostatu. Po kultivaci jsem přenesla na podložní sklíčko několik kapek tekutiny a takto zhotovený nativní preparát jsem prohlížela ve světelném mikroskopu při 400násobném zvětšení.

Po domluvě s Doc. Ing. M. Kváčem, Ph.D., který je vedoucí parazitologické laboratoře na AV ČR a má již vyizolované vzorky DNA z výkalů prasat, jsem využila tuto možnost a použila pro další vyšetření tyto vzorky. Z molekulárních metod jsem použila nested PCR a „klasickou“ jedнокrokovou PCR, elektroforézu a sekvenování. Poté následovaly fylogenetické metody pomocí kterých jsem se pokusila charakterizovat prasečí kmeny *Blastocystis* a stanovit, do kterého genotypu patří.

3.1. Kultivace vzorků výkalů ve dvoufázovém médiu podle Dobella – Leidlawa (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 při teplotě 80°C po dobu jedné hodiny. 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.

3.1.1. Složení Ringerova roztoku

Chemikálie:

Roztok A

- NaCl 3,25 g
- NaHCO₃ 0,1 g
- KCl 0,07 g
- NaH₂PO₄ · H₂O 0,005 g
- Destilovaná voda do 450 ml

Roztok B

- CaCl₂ · H₂O 0,08 g
- Destilovaná voda do 50 ml

Pracovní postup:

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

3.2. PCR

Nested PCR byla prováděna v termocykleru. Složení reakční směsi pro primární a sekundární PCR je uvedeno v tabulce č. 4. Nastavení teplotního cyklu je uvedeno v tabulce č. 5, s použitím vyhřívaného víka. Annealingová teplota byla 59°C pro primární a 60°C pro sekundární reakci. Pro primární PCR byl použit jako forward primer RD5 (Scicluna et al., 2006), jako reverse primer byl použit MedlinB (Medlin et al., 1988). Pro sekundární PCR byl jako forward primer použit námi navržený Blast98 a jako reverse primer byl použit BhrRDr (Scicluna et al., 2006), viz tabulka č. 3.

Přítomnost, počet a délka nested PCR fragmentů byla ověřena elektroforézou po proběhnutí reakce.

Kromě nested PCR byla vyzkoušena i varianta, kdy byly v reakci použity přímo primery specifické pro *Blastocystis* (tj. Blasto98 a BhrRDr) v „klasické“, tedy v jednokrokové PCR, kdy templátem byla přímo izolovaná DNA.

Tabulka č. 3: Použité primery v PCR

Primer	20-mer
RD5	5'- ATC TGG TTG ATC CTG CCA GT -3'
MedlinB	5'- CCT TCT GCA GGT TCA CCT AC -3'
Blasto98	5'- AAC TGC GAA TGG CTC ATT AT -3'
BhrRDr	5'- GAG CTT TTT AAC TGC AAC AAC G -3'

Tabulka č. 4: Složení reakční směsi

Primární (59°C)			Sekundární (60°C)		
H ₂ O	----	11,30	H ₂ O	----	12,10
MgCl ₂	(25 mM)	1,20	MgCl ₂	(25 mM)	1,20
10Xbuffer	----	2,00	10Xbuffer	----	2,00
dNTP	10 mM	0,40	dNTP	10 mM	0,40
Forward	10 µM	0,40	Forward	10 µM	0,40
Reverse	10 µM	0,40	Reverse	10 µM	0,40
BSA	(10 mg/ml)	0,80	BSA	----	----
Tag	(1U/1 µl)	0,50	Tag	(1U/1 µl)	0,50
DNA	----	3,00	DNA	----	3,00
Sum	----	20,00	Sum	----	20,00

Tabulka č. 5: Nastavení teplotního cyklu v termocykleru pro amplifikaci SSU

Počet opakování	Teplota	Čas
1x	94°C	4 min
35x	94 °C	45 s
	Annealingová teplota	45 s
	72°C	1 min
1x	72°C	10 min

3.3. Elektroforéza

Chemikálie:

- TBE pufr (89 mM TrisHCl, 89 mM kys. boritá, 2 mM EDTA)
- agaróza
- ethidiumbromid

Přístroje a nástroje:

- aparatura pro provedení elektroforézy
- zdroj stejnosměrného proudu
- UV transiluminátor
- automatické pipety
- laboratorní sklo a plastik

Pracovní postup:

Kvalita DNA a výsledky PCR byly ověřeny na horizontální elektroforéze v TBE pufru na 1% agarózovém gelu o délce 8 cm při gradientu 10 V.cm⁻¹. DNA byla zviditelněna ethidiumbromidem pod UV světlem. Ethidiumbromid byl do gelu přidán při přípravě gelu ve finální koncentraci cca 350 ng/ml gelu. Gel prosvícený UV zářením na transiluminátoru byl vyfocen digitálním fotoaparátem.

3.4. Sekvenování

Sekvence byla provedena v laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin (AV ČR). Tato laboratoř je vybavena přístrojem ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems. Analýza je založena na Sangerově metodě (Sanger et al., 1977).

3.5. Fylogenetické analýzy

3.5.1. Příprava alignmentu

Použité programy:

- CLUSTALx (Larkin et al., 2007)
- BioEdit (Hall, 1999)

Pracovní postup:

Pro primární ověření původu získaných sekvencí byl využit program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), v současné době se zřejmě jedná o nejrozšířenější heuristický algoritmus určený pro vyhledávání podobných sekvencí. Sekvence, které dle výsledků BLASTu byly takřka identické (podobnost 99 % a vyšší) s SSU rDNA jiných organismů než *Blastocystis*, byly z dalšího analyzování vyřazeny. Použitím veřejného serveru NCBI BLAST (národní centrum pro biotechnologické informace), se lze zároveň dostat do GenBanku, odkud byly staženy sekvence pro analýzu a porovnání s mými sekvencemi.

Poté následovalo alignování stažených sekvencí s mými, aby odpovídající baze u různých sekvencí byly ve stejné pozici. To spočívá zejména v doplnění mezer na vhodná místa za použití programu CLUSTALx. Postup vlastní konstrukce přiřazení s sebou nese nevyhnutelný zdroj artefaktů. Proto nám nezbývá než zkontrolovat výstup programu ručně, odstranit pozice, kde díky vysoké variabilitě není možné se na alignment spolehnout, případně opravit přiřazení pozic ve zřetelně špatně vyhodnocených případech. Tento postup kontroly a ruční úpravy byl proveden v programu BioEdit.

3.5.2. Tvorba fylogenetických stromů

Použité programy:

- PAUP (Swofford, 2003)
- RAxML (Stamatakis, 2006)

Pracovní postup:

Když je alignment hotov, počítají se fylogenetické stromy za použití programu PAUP. V tomto programu byly hledány topologie stromu pomocí metody maximální parsimonie a pomocí Fitch-Margoliashovy metody nejmenších čtverců s LogDet vzdálenostmi. K hledání výsledného stromu pomocí metody maximální věrohodnosti (likelihood) byl použit program RAxML. Stromy pak lze prohlížet v programu TreeView.

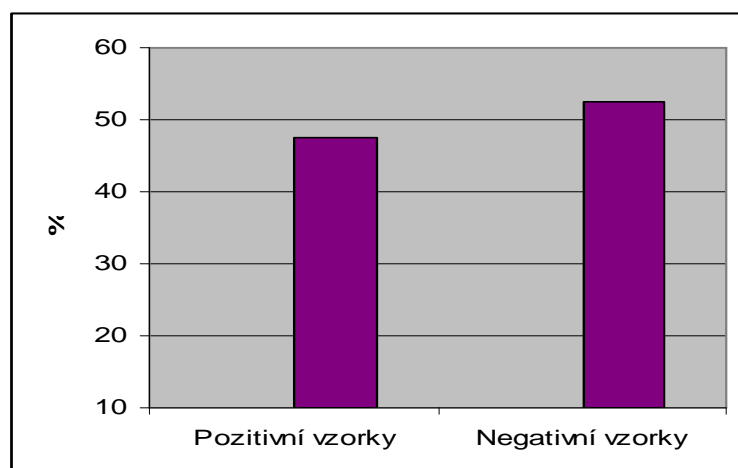
4. Výsledky

4.1. Kultivace a mikroskopie

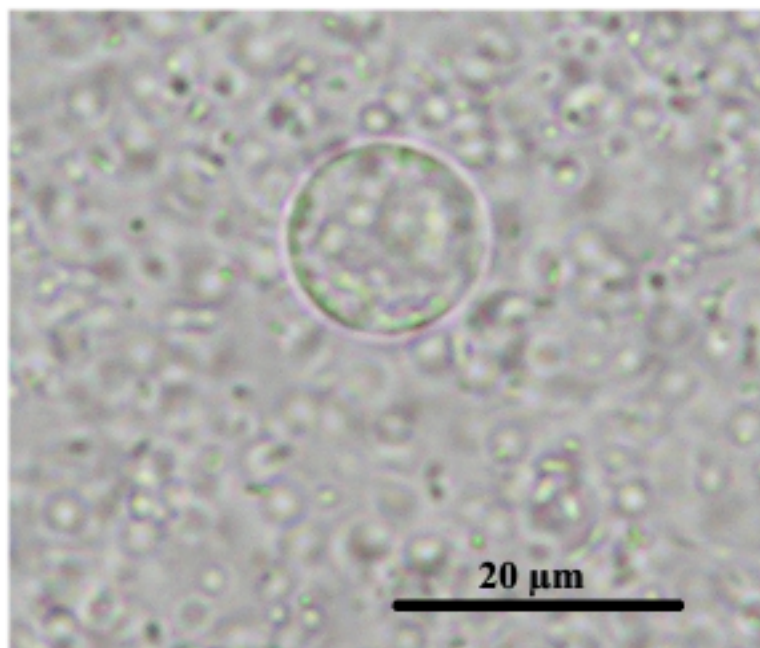
Blastocystis byly převedeny do kultury a byly pěstovány ve dvoufázovém médiu Dobell-Leidlaw. Šlo vždy o polyxenické agnotobiotické kultury, kromě *Blastocystis* rostly v médiu i další eukaryotické organismy, nejčastěji trichomonády. Zhotovený nativní preparát byl prohlížen ve světelném mikroskopu při 400násobném zvětšení a byl vyfocen digitálním fotoaparátem, viz obrázek č. 4. *Blastocystis* byla kultivačně prokázána v 47,5 % vyšetřovaných vzorků, viz graf č. 1 – v 19 vzorcích z celkového počtu 40 vzorků.

Jelikož první výsledky z nested PCR naznačovaly, že promořenost prasat je mnohem vyšší (blížily se 100 %), upustila jsem od této kultivace a dále již postupovala pomocí molekulárních a fylogenetických metod.

Graf č. 1: Celkový výskyt *Blastocystis* v průběhu roku 2010



Obrázek č. 4: Blastocystis sp. (zvětšeno 400x)



4.2. PCR a sekvenování

Nested PCR

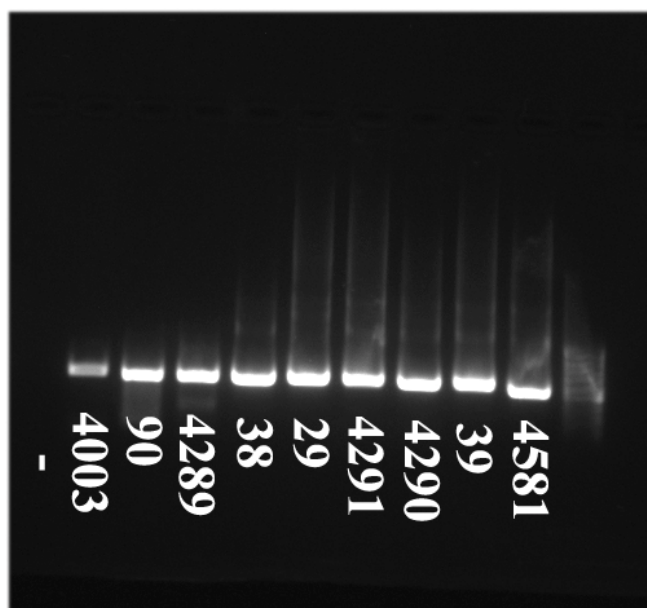
Pomocí nested PCR bylo celkem analyzováno 25 vzorků izolované DNA z výkalů prasat. Pozitivní výsledek ve formě proužku na elektroforéze dalo všech 25 vzorků. Sekvence byla provedena u 6 vzorků, u 4 vzorků se jednalo o sekvenci *Blastocystis*, u 1 vzorku se jednalo o sekvenci blíže neurčené dvouděložné rostliny a u jednoho vzorku se jednalo o nečitelnou sekvenci v obou (forward, reverse) směrech.

Klasická jednokroková PCR

Pomocí „klasické“ jednokrokové PCR bylo celkem analyzováno 7 vzorků, z toho pozitivní proužek na elektroforéze byl ve 4 případech. Sekvence byla provedena u 2 vzorků a v obou případech se jednalo o *Blastocystis*.

Jeden vzorek z „klasické“ jednokrokové PCR odpovídá jednomu vzorku z nested PCR, celkem tedy bylo získáno 5 sekvencí.

Obrázek č. 5: Elektroforéza, výsledek jednoho z PCR experimentů



Výsledek jednoho z PCR experimentů – nested PCR prasečích vzorků – vizualizovaný pomocí elektroforézy. Indikuje pozitivitu na *Blastocystis* u všech zkoumaných vzorků (jejich čísla dle databáze parazitologické laboratoře jsou uvedena u příslušných proužků). Symbol „-“ označuje negativní kontrolu.

4.3. Fylogenetické analýzy

Při konstrukci fylogenetických stromů byly také použity sekvence SSU rDNA různých *Blastocystis*, které byly získány z databáze GenBank. Jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Přehled sekvencí z databáze GenBank, které byly použity při tvorbě fylogenetických stromů

Accession	Hostitel	Accession	Hostitel
DQ232789	opice	AB107969	makak červenolící
DQ232785	chápan vlnatý	AB070997	makak červenolící

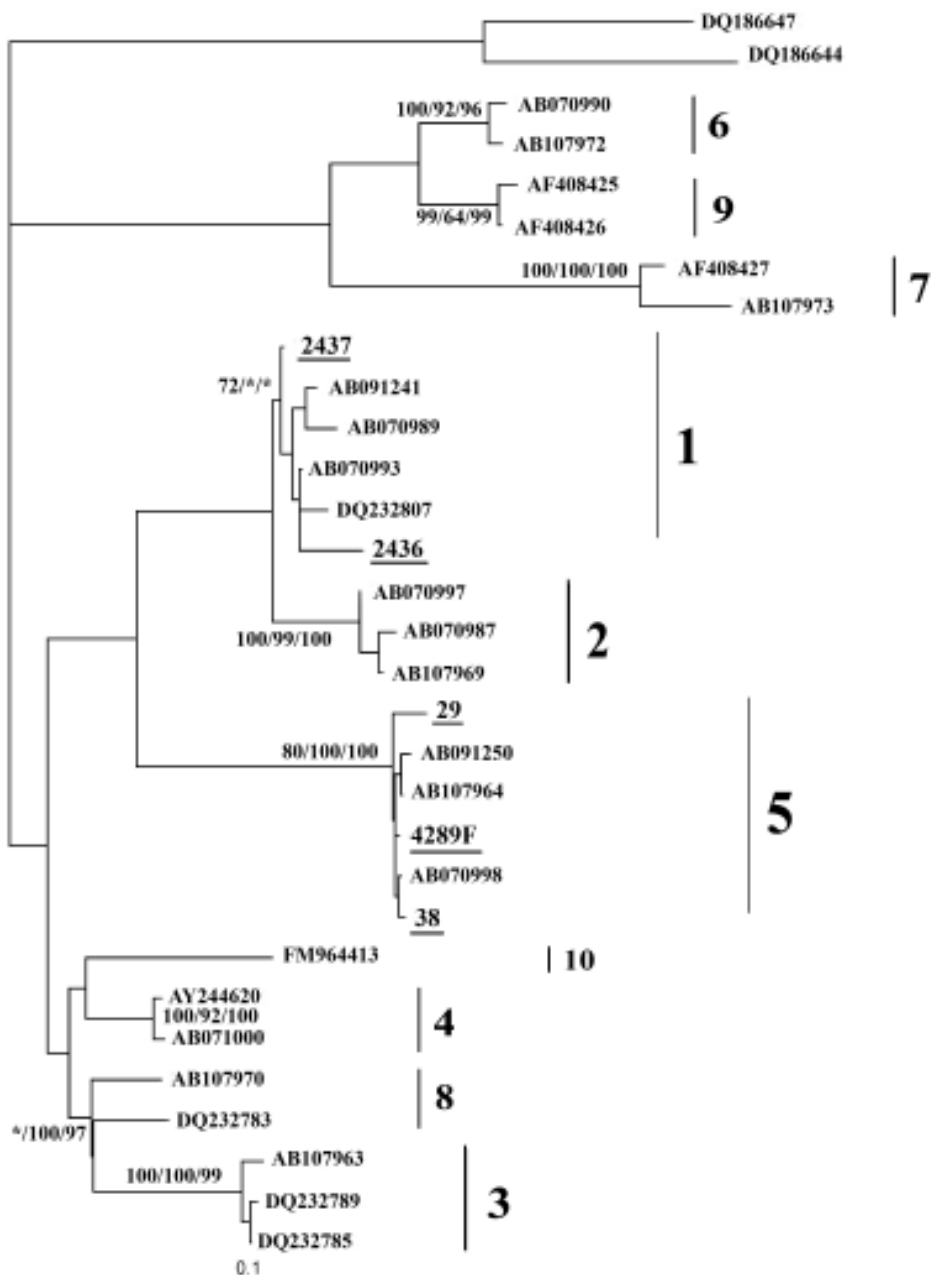
AB107963	prase	AB091250	prase
DQ232783	chápan vlnatý	AB070998	prase
AB107970	lemur vari	AB070990	člověk
AY244620	člověk	AB107972	kur bambusový
AB071000	potkan	AF408425	člověk
FM164413	skot	AF408426	člověk
AB091241	kuře	AF408427	člověk
AB070989	člověk	AB107973	husa domácí
AB070993	kuře	DQ186644	šváb
DQ232807	chápan vlnatý	DQ186647	šváb
AB070987	člověk	AB107964	prase

Sekvence, které jsem získala a sekvence z databáze GenBank, byly analyzovány fylogenetickými metodami za použití následujících metod: maximální parsimonie (MP), Fitch-Margoliashovy metody nejmenších čtverců s LogDet vzdálenostmi (LD) a maximální věrohodnosti (ML).

Před analýzou byl připraven alignment, který byl upraven v programu BioEdit – variabilní úseky (kde nebylo jisté, zda jsou sekvence správně alignovány) byly odstraněny. Sekvence byly na obou koncích „ořezány“, aby začínaly a končily všechny ve stejné pozici.

Výsledný fylogenetický strom sestrojený ze sekvencí, které jsem získala a ze sekvencí získaných z databáze GenBank je zobrazen na obrázku č. 6. Všechny sekvence, které jsem analyzovala bylo možné dobře zařadit do podtypu 1 (vzorek č. 2436, 2437) a podtypu 5 (vzorek č. 29, 38 a 4289). Větev podtypu 5 je ve stromě statisticky podpořena vysokými hodnotami bootstrapu pro všechny tři použité metody (LD/ ML/ MP). Podpora podtypu 1 je zejména v případě ML a MP nižší (< 50 %), což je však způsobeno vysokou podobností sekvencí podtypu 2 sekvencím podtypu 1. To se v bootstrapových replikátech projevovalo častým arteficiálním umístěním větve podtypu 2 v rámci podtypu 1, který se tak stal vůči podtypu 2 parafyletickým.

Obrázek č. 6: Výsledný fylogenetický strom. Mnou získané sekvence jsou zvýrazněny podtržením. Čísła u větvi jednotlivých podtypů (jež uvedena po pravé straně) jsou hodnoty bootstrapu pro metodu LD, ML a MP. Symbol „*“ označuje hodnotu bootstrapu nižší než 50.



5. Diskuse

V průběhu roku 2010 jsem zjišťovala výskyt *Blastocystis* ve výkalech prasat. Ve vybraném zemědělském družstvu jsem prokázala výskyt *Blastocystis*, k diagnostice tohoto parazita jsem použila kultivační metodu podle Dobell-Leidlaw (1926). Molekulární metody, nested PCR, „klasickou“ jednokrokovou PCR, elektroforézu, sekvenování a fylogenetické analýzy, jsem použila při detekci DNA *Blastocystis* ve vzorcích izolované DNA poskytnutých parazitologickou laboratoří AV ČR. Pomocí těchto metod jsem celkem získala 5 sekvencí *Blastocystis*, které bylo možné dobře zařadit do podtypu 1 a podtypu 5. Tento nálezn se shoduje s autory Abe (2004) a Tan (2004 a 2008), kteří taktéž uvádějí podtypy 1 a 5 diagnostikované u prasat. Yiming et al. (2006) uvádějí, že diagnostikované u prasat jsou ale také podtypy 6 a 7.

V případě nested PCR všechny analyzované vzorky vykazovaly na elektroforetickém gelu pozitivní výsledek testu výskytu *Blastocystis*, ale po sekvenaci vybraných produktů se bohužel ukázalo, že některé sekvence byly nekvalitní (a tudíž jejich původ nebylo možné prokázat), některé byly jiných organismů (blíže neurčené dvouděložné rostliny) a jen 4 sekvence patřily skutečně *Blastocystis*. Z toho vyplývá, že nemůžeme tvrdit, že všechny pozitivní proužky viditelné na elektroforetických gelech prokazují *Blastocystis*. Ukazuje se, že specifita primerů není 100%. Podle výsledků „klasické“ jednokrokové PCR byla pozitivita vzorků nižší. To může být způsobené tím, že „klasická“ jednokroková PCR je méně citlivá a nested PCR je tím pádem vhodnější metoda. Nebo je nested PCR méně specifická a zachycuje DNA nejen *Blastocystis*, ale i jiných organismů.

Existují i jiné modifikace PCR diagnostiky za použití jiných primerů - buď specifických pro *Blastocystis* s následnou sekvenací pro zjištění podtypu, nebo specifické přímo pro jednotlivé podtypy (Yoshikawa et al., 2003; Yoshikawa et al., 2009). V budoucnu bude zřejmě třeba zabývat se i těmito způsoby detekce *Blastocystis*.

6. Souhrn

Ve vybraném zemědělském družstvu v jižních Čechách jsem během roku 2010 odebírala vzorky výkalů prasat dřevěnou špachtlí z podlahy kotce pro parazitologické vyšetření. Celkem bylo odebráno a vyšetřeno 40 vzorků podle metody Dobell-Leidlaw (1926). Z celkového počtu vzorků výkalů bylo pozitivních na *Blastocystis* 19 vzorků (47,5 %). Vyšetřovací metodou, která byla použita, jsem diagnostikovala i přítomnost dalších eukaryotických organismů, nejčastěji se jednalo o trichomonády.

Výsledky z nested PCR naznačovaly, že promořenost prvoky rodu *Blastocystis* je mnohem vyšší (100 %), dále se proto postupovalo pouze pomocí molekulárních a fylogenetických metod. Pomocí nested PCR bylo celkem analyzováno 25 vzorků, ze kterých byly získány 4 sekvence SSU rDNA *Blastocystis*. Pomocí „klasické“ jednokrokové PCR bylo celkem analyzováno 7 vzorků, ze kterých byly získány 2 sekvence *Blastocystis*. Jeden vzorek z „klasické“ jednokrokové PCR odpovídá jednomu vzorku z nested PCR, celkem tedy bylo získáno 5 unikátních sekvencí.

Všechny sekvence analyzované fylogenetickými metodami bylo možné dobře zařadit do podtypu 1 (vzorek č. 2436, 2437) nebo podtypu 5 (vzorek č. 29, 38 a 4289). Statistická podpora podtypu 5 byla velmi vysoká, v případě podtypu 1 byla uměle snížena vysokou podobností sekvencí podtypů 1 a 2.

Podařilo se prokázat, že u prasat v ČR se vyskytují *Blastocystis* dvou podtypů (1 a 5), což se shoduje i s nálezem autorů Abe (2004) a Tan (2004 a 2008). Odhad prevalence na základě PCR vypadal vysoký (až 100 %), ale ve skutečnosti ho neumíme potvrdit na základě vyskytlých problémů. V budoucnu je důležité zabývat se kvalitou a citlivostí primerů.

7. Summary

On a chosen farm in South Bohemia, I collected during the year 2010 samples of pig faeces directly from the floor of their pens. A total of 40 samples were cultured by the method of Dobell-Leidlaw (1926). Of them, 19 (47,5 %) were positive for Blastocystis. Other eukaryotic organisms (usually trichomonads) were also cultured.

The results of nested PCR have shown that prevalence of Blastocystis in pigs is much higher (100 %), so we decided to utilize only molecular and phylogenetic methods in our studies. Using nested PCR, 25 samples were diagnosed for Blastocystis – from four of them, SSU rDNA sequences were obtained. Seven samples were also checked by direct (one-run) PCR, from these samples were obtained 2 sequences. One of the sequenced samples was the same as in nested-PCR. Thus, five unique sequences of Blastocystis from pigs were acquired.

All of the Blastocystis sequences obtained were clearly shown by phylogenetic methods to belong to subtype 1 (samples nr. 2436, 2437) or subtype 5 (samples nr. 29, 38 and 4289). Bootstrap values were very high in the latter case, those of subtype 1 were lowered due to a high similarity of subtype 1 and 2 sequences.

It has been shown that pigs in the Czech Republic harbor Blastocystis subtypes 1 and 5. It is in accordance with findings of Abe (2004) and Tan (2004, 2008). Although the prevalence estimated on the basis of PCR was 100 %, specificity problems of PCR arose and we cannot be sure of the high prevalence. Quality and sensitivity of primers must be dealt with in the future.

8. Seznam použité literatury

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. ABE N. (2004). Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Veterinary parasitology*, 120: 235-142.
4. BELOVA L.M. (1991). *Blastocystis anatis* sp. n. (Rhizopoda, Lobosea) from *Anas platyrhynchos*. *Zool. Zl.*, 70: 5 – 10.
5. BELOVA, L.M. (1992). *Blastocystis anseri* (Protista, Rhizopoda) from Domestic Goose. *Parazitologii*, 26: 80-82.
6. BÖHM-GLONING B., KNOBLOCH J., WALDERICH B. (1997). Five subgroups of *Blastocystis hominis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Tropical medicine and international health*, 8: 771-778.
7. ELWAKIL H.S., HEWEDI I.H. (2010). Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitology research*, 107: 685-689.
8. EROGLU F., KOLTAS I.S. (2010). Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR metod. *Parasitology research*, 107: 841-845.

9. GIACOMETTI A., CIRIONI O., FIORENTINI A., FORTUNA M., SCALISE G. (1999). Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 18: 436-439.
10. HALL T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic acids symposium series*, 41: 95–98.
11. HAUSMANN, K., HÜLSMANN, N. (2003): Protozoologie. 1. vyd. Praha: Academia, 347 s.
12. CHEN X.Q., SINGH M., HO L.Ch., TAN S.W., NG G.C. (1997). Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. *Parasitology research*, 83: 313-318.
13. IGUCHI A., EBISU A., NAGATA S., SAITOU Y., YOSHIKAWA H., IWATANI S., KLIMATA I. (2007). Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitology international*, 56: 107-112.
14. JÍROVEC O. et al. (1977): Parasitologie pro lékaře. 3 vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 800 s.
15. LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., McGETTIGAN P.A., McWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., TTOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G., (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
16. LEE M.G., STENZEL D.J. (1999). A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitology research*, 85: 109-117.
17. MOE K.T., SINGH M. GOPALAKRISHNAKONE P., HO L.Ch., TAN S.W. CHEN X.Q., YAP E.H. (1998). Cytopathic effect of *Blastocystis hominis* after intramuscular inoculation into laboratory mice. *Parasitology research*, 84: 450-454.

18. NOËL CH., DUFRÈNEZ F., GERBOD D., EDGCOMB V.P., DELGADO-VISCOGLIOSI P., HO L.CH. SINGH M., VINTJENS R., SOGIN M.L., CAPRON M., PIERCE R., ZENNER L., VISCOGLIOSI E. (2005). Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of clinical microbiology*, 348-355.
19. PAKANDL, M. (1999). *Blastocystis* sp. from pigs: ultrastructural changes occurring during polyxenic cultivation in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitology research*, 85: 743-748.
20. PÉREZ-CORDÓN G., ROSALES M.J., DEL MAR GAVIRA M. VALDEZ R.A., VARGAS F., CÓRDOVA O. (2005). Finding of *Blastocystis* sp. in bivalves of the genus *Donax*. *Revista Peruana biología*, 2005. 14: 301-302.
21. RYŠAVÝ B., ČERNÁ Ž., CHALUPSKÝ J., ORSZÁCH I., VOJTEK J. (1989): *Základy parazitologie*. 1. vyd. Praha: státní pedagogické nakladatelství, ISBN 80-04-20864-9. 215 s.
22. SANGER F.S., NICKLEN S., COULSON A.E. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences USA* 74, 5463-5467.
23. SCICLUNA S.M, TAWARI B., CLARK C.G. (2006). DNA Barcoding of *Blastocystis*. *Protistology*, 157: 77-85.
24. SOHAIL M.R., FISHER P.R. (2005). *Blastocystis hominis* and travelers. *Travel medicine and infectious disease*, 3: 33-38.
25. STAMATAKIS A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood based phylogenetic analysis with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22 (21), 2688 – 2690.
26. STECHMANN A., HAMBLIN K., PERÉZ-BROCAL V., GASTON D., RICHMOND G.S., GIEZEN M., CLARK C.G., ROGER A.J. (2008). Organelles in

Blastocystis that blur the distinction between mitochondria and Hydrogenosomes. *Current biology*, 18: 580-585.

27. 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.

28. 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.

29. SURECH K. MAK J.W., CHOUNG L.S., RAGUNATHAN T., INIT I. (1997). Sac-like pouches in *Blastocystis* from the house lizard *Cosymbotus platyrus*. *Parasitology research*, 83: 523-525.

30. SWOFFORD D.L. (2003). PAUPn. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts.

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. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary parasitology*, 126: 121–144.

33. TAN K.S.W. (2008). New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical microbiology reviews*, 639–665.

34. TAN K.S.W., MIRZA H., TEO J.D.V., WU B., MACARY P.A. (2010). Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Current infectious disease reports*, 12: 28–35.

35. VOLF P., HORÁK P. (2007): Paraziti a jejich biologie. Triton, 318 s. ISBN 978-80-7387-9.
36. YIMING Y., SHUILIAN S., RIYONG L., HUA, L., JINHUA Y., XIAOBO L., XIAOTING L., GUIFENG Ch. (2006). Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol research*, 99: 597–601.
37. YOSHIKAWA H., NAGANO I., WU Z., YAP E.H., SINGH M., TAKAHASHI Y. (1998). Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Molecular and cellular probes*, 12: 153-159.
38. YOSHIKAWA H., WU Z., NAGANO I., TAKAHASHI Y. (2003). Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *Parasitology*, 3: 585–594
39. YOSHIKAWA H., YOSHIDA K., NAKAJIMA A., YUMANARI K., IWATANI S., KIMATA I. (2004). Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology research*, 94: 391-396.
40. YOSHIKAWA H., MORIMOTO K., WU, Z., SINGH M., HASHIMOTO T. (2004). Problems in speciation in the genus *Blastocystis*. *TRENDS in parasitology*, 20: 251-255.
41. YOSHIKAWA H., WU Z., PANDEY K., PANDEY B.D., SHERCHAND J.B., YANAGI T., KANBARA H. (2009). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Veterinary parasitology*, 160: 295–300.
42. ZEMAN V., HOWE J., Hg M. (1998). Scanning elektron microscopy of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitology research*, 84: 476-477.
43. ZIERD CH. H., SWAN J.C. (1981). Generation time and growth rate of the human intestinal parasite *Blastocystis hominis*. *Parasitology*, 28: 483- 485.