

**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 domácího ptactva

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Martin Kostka, Ph.D.

Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Autor diplomové práce:

Bc. Jaroslava Hrdličková

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaroslava HRDLIČKOVÁ**
Osobní číslo: **Z09732**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Živočišné biotechnologie**
Název tématu: **Blastocystis u domácího ptactva**
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: zjistit výskyt blastocystis u domácího ptactva (drůbeže, holubů). Charakterizovat vybrané izoláty molekulárně a stanovit, o jaké genotypy se u domestikovaných ptáků jedná. Metodika: po odebrání vzorů výkalů ptáků se studentka pokusí vykultivovat střevní prvoky, především Blastocystis, na kultivačních médiích, která si sama připraví. Z izolované DNA pomocí PCR získá sekvence SSU rDNA Blastocystis. Získané sekvence budou analyzovány fylogenetickými metodami. Výsledky práce budou prezentovány pomocí obrázků, tabulek a grafů.

Finanční zajištění: finance na materiální zajištění práce budou poskytnuty z grantu MSM60076658

Rozsah grafických prací: obrázky, grafy a tabulky
Rozsah pracovní zprávy: přibližně 40-50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- 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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13 ④
370 05 České Budějovice

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

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 domácího ptactva 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Ve Strakoniciích dne 29.4.2011

.....

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Mgr. Martinu Kostkovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat Doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků z Parazitologického ústavu AV ČR.

Diplomová práce na téma „*Blastocystis* u domácího ptactva“ byla zpracována v rámci výzkumného záměru MSM 6007665806.

ABSTRAKT

V jednom anonymním domácím chovu jsme v roce 2010 odebírali vzorky trusu pro parazitologické vyšetření na přítomnost prvoků rodu *Blastocystis*. Celkem bylo vyšetřeno 55 vzorků (z toho po 10 vzorcích trusu od slepic, kachen a hus a 25 od holubů). Vzorky byly kultivovány v médiu dle Dobell-Leidlaw a následně mikroskopovány. Tento postup však vedl k nízké záchytnosti, pouze dva vzorky byly pozitivní na *Blastocystis* (od slepice a holuba), proto byla následně použita PCR a nested-PCR se specifickými primery pro spolehlivější detekci *Blastocystis*.

Vzorky pro tyto reakce již nebyly odebírány z výše zmíněného chovu, ale byla využita sbírka vzorků z Parazitologického ústavu AV ČR, kde byla již DNA ze vzorků trusu slepic, kachen a holubů vyizolovaná. Výsledky klasické i nested-PCR byly ověřeny elektroforézou a sekvenací. Získané sekvence ptačích kmenů byly analyzovány fylogenetickými metodami a zařazeny do podtypu 7.

Klíčová slova: *Blastocystis*, kultivace, PCR, podtyp

ABSTRACT

During 2010, faeces samples for parasitology research oriented on *Blastocystis* were collected from an anonymous farm. A total of 55 samples were collected (of them for 10 faeces samples from hens, ducks and geese and 25 from pigeons). The samples were cultured in Dobell-Leidlaw medium and viewed by light microscopy. However, this method led to only two findings of *Blastocystis* (one from hen, the other from pigeon). Thus, PCR and nested-PCR with specific primers were later used for better detection of *Blastocystis*.

The samples for PCR detection were not collected from the aforementioned farm, but they originated from a collection of isolated DNA samples that was available on the Parasitology institute of AS CR. The results of PCR were checked after electrophoresis and verified by sequenation. The obtained sequences of bird-isolated *Blastocystis* were phylogenetically analysed and as described to subtype 7.

Keywords: *Blastocystis*, cultivation, PCR, subtype

OBSAH:

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1 Parazitologické pojmy	10
2.1.1 Rozdělení parazitů	10
2.1.2 Rozdělení hostitelů	11
2.1.3 Parazitologická charakteristika <i>Blastocystis</i>	11
2.2 <i>Blastocystis</i>	12
2.2.1 Základní charakteristika	12
2.2.2 Taxonomie parazita	13
2.2.2.1 Historie.....	13
2.2.2.2 Taxonomické zařazení	16
2.2.3 <i>Blastocystis</i> jako původce zoonotického onemocnění	16
2.2.4 Morfologie	18
2.2.4.1 Vakuolární a granulární formy	18
2.2.4.2 Multivakuolární a avakuolární formy	20
2.2.4.3 Améboidní forma	21
2.2.4.4 Cysty	22
2.2.4.5 Jiné formy	23
2.2.5 Druhy	24
2.2.5.1 Podtypy	24
2.2.5.1.1 Sjednocení terminologie podtypů	24
2.2.5.1.2 Rozšíření podtypů	25
2.2.6 Vývojový cyklus	27
2.2.7 Příznaky	29
2.2.8 Diagnostika	30
2.2.9 Léčba a prevence	31
3. MATERIÁL A METODY	33
3.1 Kultivace	34
3.1.1 Dobell-Leidlawovo médium	34
3.2 PCR metody	35
3.2.1 Klasická PCR.....	35

3.2.2 Nested-PCR	36
3.3 Elektroforéza	37
3.3.1 Příprava gelu	37
3.4 Sekvenování.....	38
3.5 Fylogenetické analýzy	38
3.5.1 Příprava alignmentu	38
3.5.2 Tvorba dendrogramu.....	39
4. VÝSLEDKY	40
4.1 Kultivace	40
4.2 Klasická PCR.....	40
4.3 Nested-PCR	40
4.4 Fylogenetické analýzy	42
5. DISKUZE	44
6. SOUHRN	46
7. SUMMARY	48
8. POUŽITÁ LITERATURA	50

1. ÚVOD

Onemocnění gastrointestinálního traktu je u ptáků (drůbeže, holubů) poměrně časté. Na jeho vzniku se podílí řada činitelů. Jedním z nich jsou parazitičtí prvoci rodu *Blastocystis*, kteří se vyskytují v trávicím traktu u širokého spektra hostitelů včetně člověka. Hostitelé se nakazí požitím cyst vylučovaných s trusem.

Existují doklady, že *Blastocystis* v některých případech přispívá k rozvoji průjemových onemocnění a dalších problémů. Rozsah poškození sliznice přitom závisí na množství přítomných parazitů. Množení parazitů je regulováno imunitním systémem hostitelů a kvalitou jejich trávicích procesů (pH střevního obsahu, přítomností zdravé střevní mikroflóry aj.).

Dlouho u těchto prvků nebylo jasné taxonomické zařazení. Fylogenetické analýzy prokázaly, že rod *Blastocystis* je nejpříbuznější rodu *Proteromonas*. Rod *Proteromonas* zahrnuje bičíkovce ze skupiny Stramenopila, kam byl na základě výše zmíněných analýz zařazen i rod *Blastocystis*. Zajímavé je ale to, že blastocysty nemají bičíky.

Na základě předpokládané hostitelské specifity a patrně ne zcela spolehlivých morfologických kritérií bylo u ptáků popsáno několik ptačích druhů, *Blastocystis galli* u kuřat a krůt, *Blastocystis anatis* u kachen a *Blastocystis anseri* u hus. Vzhledem k tomu, že určování dalších druhů je spojeno s problémy, jsou *Blastocystis* nyní zařazovány do podtypů na základě analýzy sekvence SSU rDNA, ale i zde se vyskytují určité neshody.

Vývojový cyklus rodu *Blastocystis* zahrnuje několik forem. Bylo navrženo několik způsobů rozmnožování, ale jako nejpravděpodobnější se jeví binární dělení.

Cílem naší práce bylo zjistit výskyt *Blastocystis* u domácího ptactva. Charakterizovat vybrané izoláty molekulárně a zjistit, o jaké genotypy se u domestikovaných ptáků jedná.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Parazitologické pojmy

Parazitismus (cizopasnictví) je biologický jev, který je v živočišné říši velmi rozšířen. Je to jev, který nelze chápat jako nějakou výjimečnou nebo náhodnou formu života, ale musíme jej chápat jako jev, který je logickým důsledkem působení širokého komplexu různých činitelů ve vývoji organismů a jejich vzájemných vztahů. Má v živočišné říši důležitou úlohu jako faktor, který pomáhá za určitých podmínek udržovat ekologickou rovnováhu v ekosystémech (Ryšavý et al., 1989).

Parazit (cizopasník) je takový organismus, který žije po celý svůj život nebo po jistou jeho část na těle, nebo uvnitř jiného organismu (hostitele), živí se na jeho úkor a různým způsobem ho ohrožuje. Cizopasník „nemá zájem“ na tom, aby svého hostitele poškozoval či dokonce usmrtil, naopak čím déle je jeho hostitel naživu, tím lépe i pro parazita (Jírovec et al., 1977).

Hostitel je organismus, který slouží cizopasníkovi jako dočasné nebo trvalé životní prostředí a současně i jako zdroj potravy (Lýsek, Hejtmánková, 1984).

2.1.1 Rozdělení parazitů

Podle místa, kde cizopasí, rozdělujeme parazity na **ektoparazity** (vnější) a **endoparazity** (vnitřní) (Rebanová, 1998). Endoparazity pak podle orgánů, které v těle hostitelů napadají, dělíme na čtyři skupiny: parazity **střevní**, **krevní**, **tkáňové** a **dutinové** (Jírovec et al., 1977). **Tkáňové** parazity dále rozdělujeme na **intracelulární** (žijí uvnitř buněk různých tkání), případně až **intranucleární** (uvnitř jádra buněk), dále **epicelulární** (na povrchu buněk), **intercelulární** (mezi tkáňovými buňkami) (Rebanová, 1998).

Vazba parazita na hostitele může být **trvalá** nebo **přechodná** (Jírovec et al., 1977). U trvalé vazby rozeznáváme parazity **obligatorní** (nucené) (jsou zcela odkázáni na cizopasný způsob života a na svých hostitelích jsou jednostranně ekologicky a fyziologicky závislí) (Rebanová, 1998), **permanentní** (žijí po celé období své dospělosti uvnitř nebo na povrchu těla svého hostitele) (Ryšavý et al., 1988), **periodické**

(střídají se stádia cizopasná se stádii volně žijícími) a u přechodné parazity **temporérní** (vyhledávají hostitele jen přechodně) a **fakultativní** (náhodné) (jsou živočichové volně žijící a jen příležitostně se stávají cizopasníky).

Podle počtu napadených hostitelů se dělí na **stenoxenní** (jsou úzce specializováni na jeden druh hostitele) a **euryxenní** (žijí v různých hostitelích patřících ke stejné čeledi nebo třídě). Podle počtu hostitelů, které potřebují ke svému vývoji, jsou **monoxenní** (vývoj probíhá jen v jednom druhu hostitele) nebo **heteroxenní** (ke svému vývoji parazit potřebuje dva a více hostitelů) (Rebanová, 1998).

2.1.2 Rozdělení hostitelů

Hostitelé se rozdělují na definitivní, mezihostitele, paratenické, nebo také na vlastní a pomocné. V **definitivním** (hlavním) hostiteli parazit pohlavně dospívá a rozmnožuje se (Jírovec et al., 1977). **Mezihostitel** je živočich, ve kterém proběhne část vývoje parazita, ale parazit v něm nedosáhne stadia pohlavní zralosti. **Paratenický hostitel** (transportní) je živočich, který stojí mimo vlastní cyklus parazita (Ryšavý et al., 1988).

Vlastní hostitel (notosit) je ten, ve kterém parazit prožívá větší část svého vývoje. **Pomocný hostitel** (xenosit) je ten, kde parazit čeká až se dostane do hlavního hostitele, ve kterém dokončí svůj vývoj (Rebanová, 1998).

2.1.3 Parazitologická charakteristika *Blastocystis*

Charakteristika *Blastocystis* z hlediska výše definovaných parazitologických hledisek je shrnuta v tab. 1.

Tab. 1: Charakteristika parazita

Parazit - <i>Blastocystis</i>		
Podle:	lokalizace parazita na hostiteli	endoparazit
	orgánů, které v těle hostitele napadá	střevní parazit
	vazby parazita na hostitele	obligatorní parazit
	dosažení aktivní fáze v hostiteli	permanentní parazit
	počtu napadených hostitelů	euryxenní parazit
	počtu hostitelů, které potřebují ke svému vývoji	monoxenní parazit

2.2 *Blastocystis*

U ptáků byla zjištěna vysoká prevalence tohoto parazita, ale zatím nebyly provedeny rozsáhlé výzkumy, které by poskytly dostatek informací (Lee, Stenzel, 1999).

Nejvíce poznatků je získáno o *Blastocystis hominis*, která převážně parazituje u lidí, ale byla také nalezena ve střevním traktu prasat, opic, drůbeže a hlodavců (Sohail, Fischer, 2005).

Především tohoto druhu (či skupiny příbuzných druhů) se bude týkat následující text.

2.2.1 Základní charakteristika

Blastocystis patří mezi nejrozšířenější parazitické prvoky (Eroglas, Koltas, 2010). Jsou polymorfní (Tanizaki et al., 2005; Tan, 2008) a obligátně anaerobní (Silberman et al., 1996; Stenzel, Boreham, 1996). Vyskytují se u širokého spektra hostitelů. Způsobují onemocnění označované jako blastocystóza (Tan et al., 2010).

Napadají střevní trakt (Stenzel, Boreham, 1996; Tan, 2004) savců, např. prasat (Singh et al., 1995; Stenzel, Boreham, 1996; Tan, 2004), skotu (Abe et al., 2003), primátů (např. šimpanzů, orangutanů), jelenů, zajíců (Abe et al., 2002), hlodavců (např. krysy) (Stenzel, Boreham, 1996; Abe et al., 2003; Tan, 2004), u ptáků byli tito parazité popsáni např. ze slepic, pštrosů, krůt, kuřat, perliček, bažantů, kachen (Singh et al., 1996; Abe et al., 2002; Abe et al., 2003), dále se vyskytují i u obojživelníků (Stenzel, Boreham, 1996; Tan, 2004; Stensvold et al., 2009), plazů (např. hadů, ještěrek, krokodýlů, želv) (Singh et al., 1996; Stensvold et al., 2009), hmyzu (např. švábů) (Yoshikawa et al., 1996; Abe et al., 2003; Jones et al., 2009), u kroužkovců, členovců, ryb (Stensvold et al., 2009), a v neposlední řadě také člověka (Singh et al., 1996). Yamada et al. (1987), König a Müller (1997), Abe et al. (2002) popsali častý výskyt tohoto parazita u skotu, prasat, primátů a ptáků (Abe, 2004).

Buňka základní (vakuolární) formy *Blastocystis* obsahuje velkou centrální vakuolu (Yoshikawa et al., 2004), jejíž funkce je neznámá, ale předpokládá se její role v reprodukci a metabolismu (Vdovenko, 2000). Dále jedno nebo více jader (Stenzel, Boreham, 1996; Lee, Stenzel, 1999; Tan, 2004), přičemž vícejaderné formy mají jádra oddělená, často se u nich nacházejí na opačných pólech buňky (Lee, Stenzel, 1999). Kromě toho buňka obsahuje další organely typické pro eukaryota, jako jsou hladké a

drsné endoplasmatické retikulum, Golgiho komplex a mitochondrie (Stenzel, Boreham, 1996; Tan, 2004). Golgiho komplex se nachází obvykle v blízkosti jádra, mitochondrie jsou značně variabilní ve tvaru (Lee, Stenzel, 1999).

Povrch buňky je tvořen povrchovou vrstvou. U některých buněk má sama tato vrstva ještě dvě odlišné dílčí vrstvy, vnější a vnitřní. Vnější vrstva je hustší a více fragmentovaná než vnitřní. Je známo, že na tento povrch obvykle adherují bakterie, předpokládá se, že přilnutí může být začátkem jejich fagocytózy, ale nejsou o tom důkazy. Vzácně jsou bakterie viděny v cytoplasmě parazita (Zaman et al., 1997).

Blastocystis nemají bičinky (Silberman et al., 1996; Volf, Horák et al., 2007) ani povrchové mikrotubuly (Volf, Horák et al., 2007).

V životním cyklu je známo několik forem (Volf, Horák et al., 2007): vakuolární, granulární, multivakuolární, avakuolární, améboidní (Stenzel, Boreham, 1996; Tan, 2004), včetně odolných cyst (Volf, Horák et al. 2007). Množí se asexuálně, s největší pravděpodobností binárním dělením (Sohail, Fisher, 2005).

K infekcím dochází prostřednictvím cyst vyloučených ve výkalech nakažených jedinců (Sohail, Fisher, 2005). Projevují se různými intestinálními i extraintestinálními příznaky (Tan et al., 2010).

2.2.2 Taxonomie parazita

2.2.2.1 Historie

Systematické zařazení tohoto parazita bylo dlouho nejasné. Alexeieff et al. (1911, podle Stenzel, Boreham, 1996) zahrnovali tento organismus mezi kvasinky a houby. To však vyvrátili Zierdt et al. (1967, podle Stenzel, Boreham, 1996), kteří poskytli první nesporný důkaz o tom, že tomu tak není. Zabývali se studiem ultrastruktury *Blastocystis* a zjistili, že jejich ultrastruktura neodpovídá kvasinkám a houbám. Zierdt zařadil *Blastocystis* mezi prvoky (dle Sohail, Fisher, 2005).

Bensen et al. (1909, podle Stenzel, Boreham, 1996) tvrdili, že se jedná o cystu jiného organismu např. rodu *Trichomonas*. V pozdější studii Zierdt (1978) zařazoval *Blastocystis* do podkmene Sporozoa, třídy Blastocystea a řádu Blastocystida. O deset let později Zierdt reklasifikoval organismus do podkmene Sarcodina, řádu Amoebida a do samostatného podřádu Blastocystina (Stenzel, Boreham, 1996).

Johnson et al. v roce 1989 na základě analýzy sekvencí SSU rRNA potvrdili, že není monofyletický s kvasinkami (např. *Saccharomyces*), houbami (např. *Neurospora*), amébami jako jsou *Naegleria*, *Acanthamoeba* a *Dictyostelium* nebo výtrusovci (např. *Sarcocystis* a *Toxoplasma*) (Tan et al., 2002).

V roce 1993 Jing a He (podle Stenzel, Boreham, 1996) navrhli zařazení do podkmene Blastocysta, třídy Blastocystea a rodu *Blastocystis*. Pro takto nově vzniklé zařazení však chybělo dostatek důkazů.

V roce 2005 byla provedena fylogenetická analýza genu pro RNA malé ribosomální podjednotky, přičemž byla zjištěna 90% podobnost se sekvencí téhož genu u hub z rodu *Glomus*, *Archaeospora* a 94% podobnost se sekvencí *Proteromonas lacertae*.

Na základě podobnosti se skupinou Stramenopila (synonymum Heterokonta), kam patří i výše zmíněný bičíkovec *Proteromonas*, zařadili Hoevers a Snowden *Blastocystis* do této skupiny. Stramenopila je velmi různorodou skupinou organismů (Hoevers, Snowden, 2005). Zahrnuje typické rostlinám podobné zástupce, jako hnědé řasy či rozsivky (Hausmann, Hülsmann, 2003; Perkins, 2010), ale také organismy podobné houbám (např. oomycety) a bičíkaté formy s živočišným chováním a výživou (Hausmann, Hülsmann, 2003).

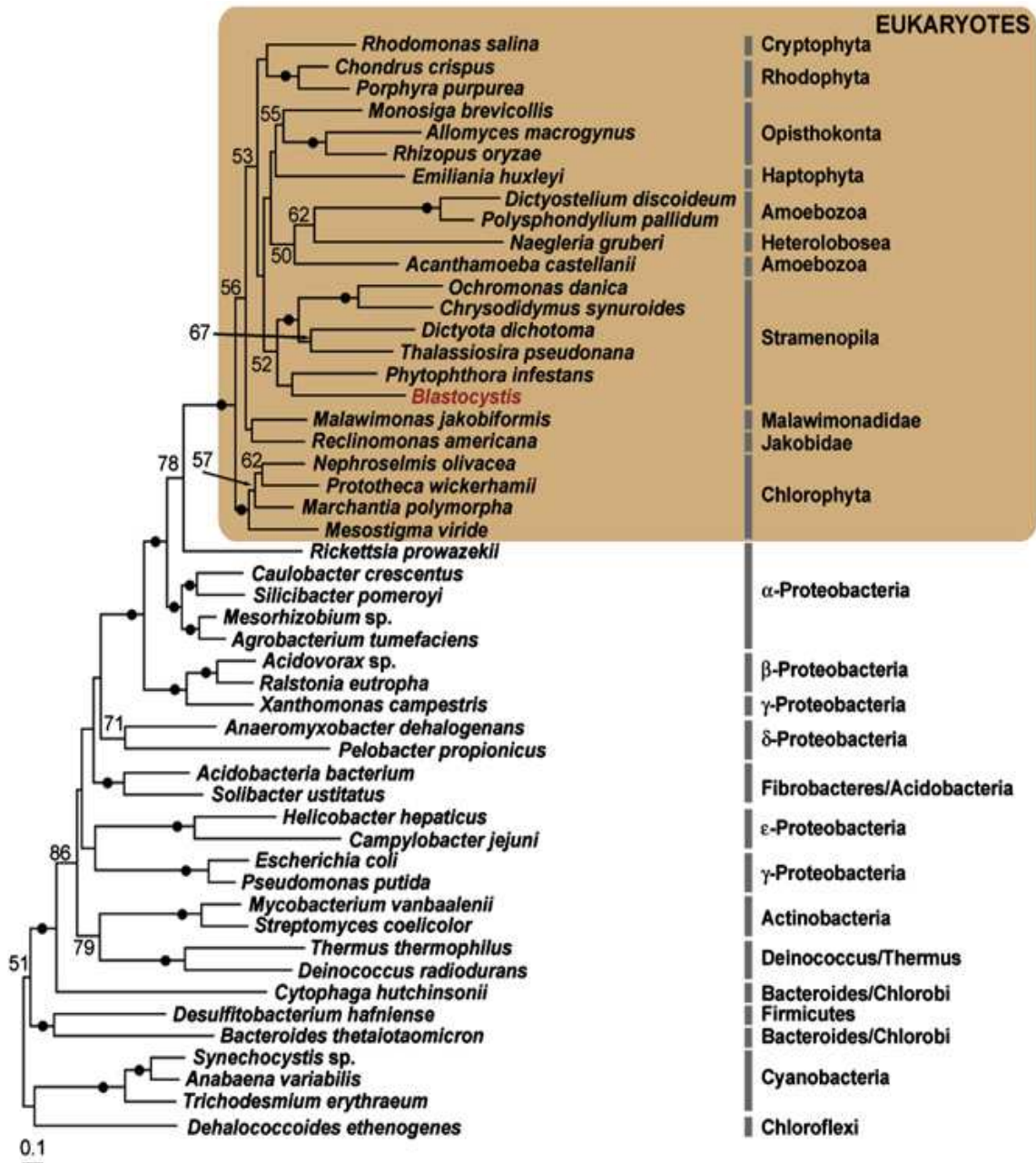
Její členové se vyznačují tím, že mají dva heterokontní bičíky, na předním bičíku jsou trojdílné rozvětvené mastigonemy (retronemy=stamenopily), zpětný bičík je holý (Volf, Horák et al., 2007). Mastinogemy se tvoří v cisternách endoplasmatického retikula či Golgiho komplexu a po exocytóze se připojí na vnější povrch buněčné membrány bičíku. Tyto mastinogemy se považují za autapomorfii infraříše Heterokonta a termín stramenopily pro ně navrhl Patterson v roce 1991. Další společnou charakteristikou je přítomnost tzv. přechodových spirál (spirálních tělísek), což jsou bílkovinné komplexy nalézající se v přechodové oblasti mezi kinetosomem a tělem bičíku. Někteří bičíkovci (a to právě rod *Proteromonas*) mají stramenopily umístěné ne na bičíku, ale na zadní části buňky. Takové přívěšky se označují jako somatonemy (Hausmann, Hülsmann, 2003).

Blastocystis spp. jsou v rámci skupiny Stramenopila velmi neobvyklé (Jeffrey, Mitchell et al., 1996) nemají bičíky (Silberman, 1996; Volf, Horák et al., 2007; Tan, 2008) a jsou nepohyblivé, což znamená, že výše zmíněné morfologické znaky postrádají a do skupiny Stramenopila jsou řazeny pouze na základě molekulárních znaků. Jsou zařazeny do nově vytvořené třídy Blastocystea (Tan, 2008).

V kapitole 2.2.2.2 je uvedeno taxonomické zařazení *Blastocystis* spp. podle Tan,

Singh, Yap (2002) a Tan (2008).

Obr. 1: *Fylogenetický strom Blastocystis spp. založený na fylogenetické analýze šesti mitochondriálních proteinů (Nad2, Nad3, Nad4, Nad6, Nad9 a Rps10) metodou maximální věrohodnosti (ML-maximum likelihood)*



Zdroj: Stechman et al., 2008; upraveno

2.2.2.2 Taxonomické zařazení

Říše: Chromista

Podříše: Chromobiota

Infraříše: Heterokonta

Podkmen: Opalinata

Třída: Blastocystea

Rod: *Blastocystis*

Druh: *Blastocystis* sp.

2.2.3 *Blastocystis* jako původce zoonotického onemocnění

Blastocystis hominis je jedním z nejběžnějších střevních parazitů u lidí (Eroglas, Koltas, 2010). Byl objeven v roce 1870 ruským lékařem Fedorem Alexandrovičem Leshem (Sukthana, 2001). Popsán byl až v roce 1912 (Villar et al., 1999; Kaneda et al., 2001; Yoshikawa et al., 1996, 2004, 2007).

Tento parazit je celosvětově rozšířen. Výskyt se značně liší od země k zemi a v rámci různých komunit téže země (Tan, 2008). Rozvojové země včetně Argentiny, Brazílie, Kuby, Egypta a Indonésie mají vysoký výskyt rozšíření *Blastocystis hominis*, prevalence se pohybuje mezi 30-50 % (Termmathurapoj et al., 2004; Sohail, Fischer, 2005). V rozvinutých zemích, jako je Japonsko a Singapur (Tan, 2008) bývá prevalence nižší (přibližně 1,5-10 %) (Stenzel, Boreham, 1996; Sohail, Fischer, 2005), ale existují i výjimky (Stenzel, Boreham, 1996). Tyto rozdíly v rámci jedné země mohou odrážet skutečné rozdíly mezi komunitami, a to zejména v případě, že byla použita stejná technika k identifikaci parazita (Tan, 2008).

Blastocystis hominis je přenášen fekálně-orální cestou (Sukthana, 2001; Sohail, Fischer, 2005; Pérez-Cordón et al., 2007). Člověk se může nakazit kontaminovanou pitnou vodou, ta by raději měla být převařená nebo chlorovaná (Sohail, Fischer, 2005), dále konzumací kontaminovaných potravin, či kontaktem s nemocnými zvířaty (Stenzel, Boreham, 1996).

Nimri (1993) a Nimri, Batchoun (1994) ve své studii uvádí, že starší děti a dospělí mají nižší výskyt infekce a méně příznaků než mladší děti. To je ale v rozporu s jinými studiemi, které uvádějí vyšší výskyt infekce u dospělých než u dětí (Stenzel, Boreham,

1996). Tan et al. (2010) uvádějí, že děti jsou velmi vnímavé k infekcím *Blastocystis*. Děti, které užívají kortikosteroidy pro léčbu nefrotického syndromu jsou citlivější k infekcím.

Řada studií ukázala, že *Blastocystis hominis* může být původcem mnoha onemocnění např. enteritidy, kolitidy, artritidy. Také je spojována s diabetem a leukémií (Stenzel, Boreham, 1996).

Po celém světě jsou hlášeny symptomatické i asymptomatické infekce. U symptomatických infekcí byly zaznamenány různé příznaky, od mírného průjmového onemocnění a chronického průjmu až k akutní gastroenteritidě. Také byly zaznamenány poruchy střev, zácpa, kožní projevy např. akutní nebo stresová kopřivka, angioedém (Tan, 2008), svědění, dále bolesti kloubů, chronická únava aj. Mechanismus vzniku těchto kožních projevů je nejasný (Tan et al., 2010). Nejčastějšími příznaky jsou bolesti břicha, průjem a zácpa (Jones et al., 2009). Také byl nalezen u pacientů se syndromem dráždivého tračnicku (Sohail, Fischer, 2005). Příznaky jsou závažnější u pacientů s imunodeficiencí v důsledku onemocnění např. cirhózou, diabetem, rakovinou či pacientů s lupus erythematoses nežli u imunokompetentních osob. Několik starších studií uvádí, že se příznaky objevují při velkém počtu jedinců tohoto parazita v organismu hostitele, ale to je v rozporu s jinými studiemi, které nenašly žádný vliv mezi počtem parazitů v hostiteli a závažností příznaků (Stenzel, Boreham, 1996).

Vysoký výskyt tohoto parazita byl hlášen u pacientů s HIV/AIDS, rakovinou (Tan et al., 2010), imunosuprimovaných jedinců, u lidí trpících alergickými kožními poruchami (Tan, 2008) a také u homosexuálních mužů (Church et al., 1992, podle Tan et al., 2010). Kukoschke a Müller (1992, podle Stenzel, Boreham, 1996) našli zvýšený výskyt tohoto parazita u zdravých a asymptomatických osob v porovnání se symptomatickými pacienty. U pacientů s HIV/AIDS a rakovinou je nejčastějším příznakem průjem, dále pak bolesti břicha a nadýmání. Jedna studie uvádí přemnožení tohoto parazita po karcinomu, kdy došlo ke střevní obstrukci a u pacienta s adenokarcinomem, vlivem perforace střev (Tan et al., 2010). U imunosuprimovaných pacientů může být *Blastocystis hominis* oportunní patogen, ale přesvědčivé důkazy o tom nebyly předloženy (Stenzel, Boreham, 1996). Poněkud rozporuplné výsledky klinických studií mohou souviset s faktem, že *Blastocystis* je podle molekulárních studií značně variabilní organismus, přičemž jednotlivé podtypy mohou být různě virulentní.

Podtypy, které byly izolovány od symptomatických i asymptomatických pacientů, a také od pacientů s rakovinou a HIV/AIDS jsou uvedeny v kapitole 2.2.5.1.2. Tato

kapitola se zmiňuje i o zoonotických podtypech.

2.2.4 Morfologie

U *Blastocystis* rozlišujeme několik forem. V roce 1973 Tan a Zierdt popsali tři formy: vakuolární, granulární a améboidní. Singh et al. (1995) uvedli vakuolární, multivakuolární a améboidní formu. V roce 1996 Stenzel a Boreham a později v roce 2002 Tan et al. popsali ve své studii několik forem: vakuolární a granulární, multivakuolární a avakuolární, améboidní formy a cysty.

2.2.4.1 Vakuolární a granulární formy

Vakuolární a granulární formy (obr. 2) jsou obvykle kulovitého tvaru, ale mohou mít také nepravidelný tvar, obsahují centrální vakuolu (Stenzel, Boreham, 1996). Jsou obklopeny povrchovou vrstvou, někdy označovanou jako fibrilární vrstva nebo kapsule, o různé tloušťce (Tan, 2008).

Povrchová vrstva obsahuje řadu sacharidů. Předpokládá se, že hrají roli v zachycování a degradování bakterií pro výživu, v ochraně proti osmotickému šoku nebo poskytují mechanickou ochranu pro funkčně důležité bílkoviny plasmatické membrány před imunitním systémem. Tato povrchová vrstva je nejsilnější při vyloučení parazita, po nějaké době kultivace dochází ke ztenčování vrstvy, důvod je neznámý (Tan, 2008).

Vakuolární forma je považována za typickou formu *Blastocystis*. Obsahuje jedno až čtyři jádra (Stenzel, Boreham, 1996; Sohail, Fischer, 2005), centrální vakuolu, která zabírá až 90 % její velikosti (Tan, 2008; Tan et al., 2002). Vakuola obsahuje jemně zrnitý nebo vločkovitý materiál, který je v ní nerovnoměrně uspořádán (Stenzel, Boreham, 1996).

Jádra, mitochondrie a Golgiho komplex jsou umístěny v cytoplasmatickém lemu (Tan, 2004). Buňka vakuolární formy dosahuje velikosti od 2-200 μm .

Granulární forma má strukturu podobnou vakuolární formě. Její centrální vakuola obsahuje granula několika morfologických typů: reprodukční, metabolická a lipidová granula. Reprodukční a metabolická granula byla popsána na základě světelné (Zierdt et al., 1967) a transmisní elektronové mikroskopie (Tan, Zierdt, 1973, podle Stenzel, Boreham, 1996). Podíl granul na reprodukci, který byl Zierdtem navržen v době, kdy

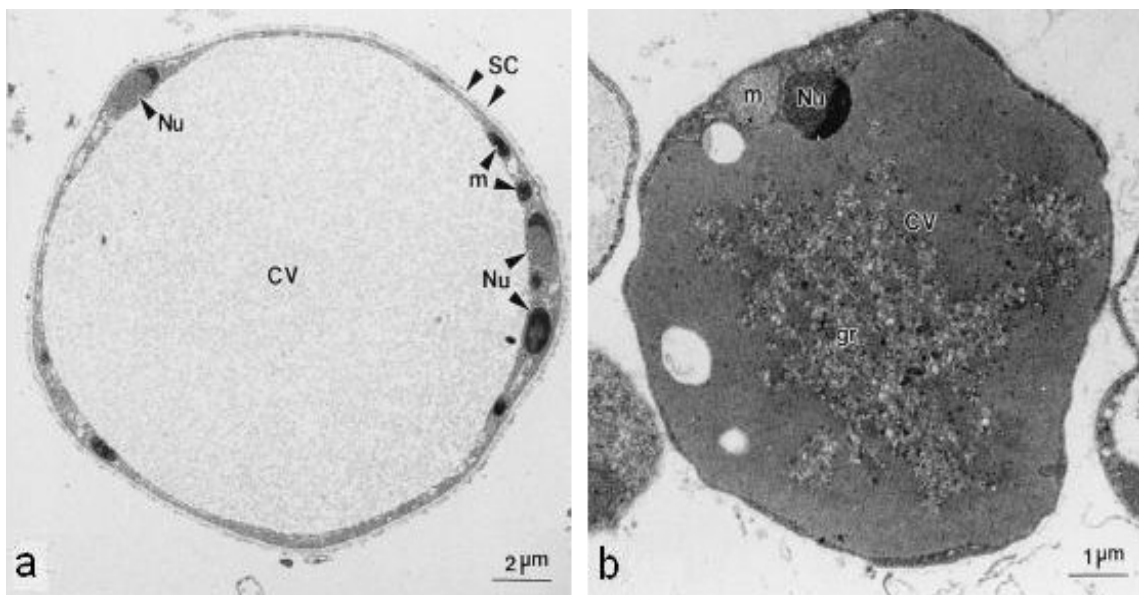
byly k dispozici jen fragmentární údaje o biologii *Blastocystis*, je již v dnešní době vyloučen. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie byla zjištěna přítomnost dalšího typu granulí (lipidová granula). Metabolická a lipidová granula byla také zaznamenána v cytoplasmě. Nebylo to však potvrzeno.

Dunn et al. (1989, podle Stenzel, Boreham, 1996) popsali v centrální vakuole myelinovou inkluzi, malé puchýřky, krystalická granula a lipidové kapénky. Lipidové kapénky a krystalická granula (v malých vakuolách a váčcích) také zaznamenali v cytoplasmě.

Granulární formy jsou často o něco větší než vakuolární (Stenzel, Boreham, 1996), ve velikostech buněk však nalézáme značnou variabilitu. Tan a Zierdt (1973) uvádí velikost 15-25 μm ; Stensvold, Boreham (1996) 6,5-80 μm ; Zierdt, Williams (1974) 3-80 μm a Dunn, Boreham, Stenzel (1989) 6,5-19,5 μm (Stenzel, Boreham, 1996).

Buňka obvykle obsahuje více jader, jádra jsou kulovitá, jemně zrnitá. Mitochondrie jsou menší než u améboidní formy (Tan, Zierdt, 1973).

Obr. 2: Vakuolární a granulární forma



Popis obrázku:

a) vakuolární forma, CV: centrální vakuola, **Nu:** jádra, **SC:** povrchové vrstvy, **m:** mitochondrie; **b) granulovaná forma, CV:** centrální vakuola, **Nu:** jádro, **m:** mitochondrie, **gr:** granule

Zdroj: Stenzel, Boreham, 1996; upraveno

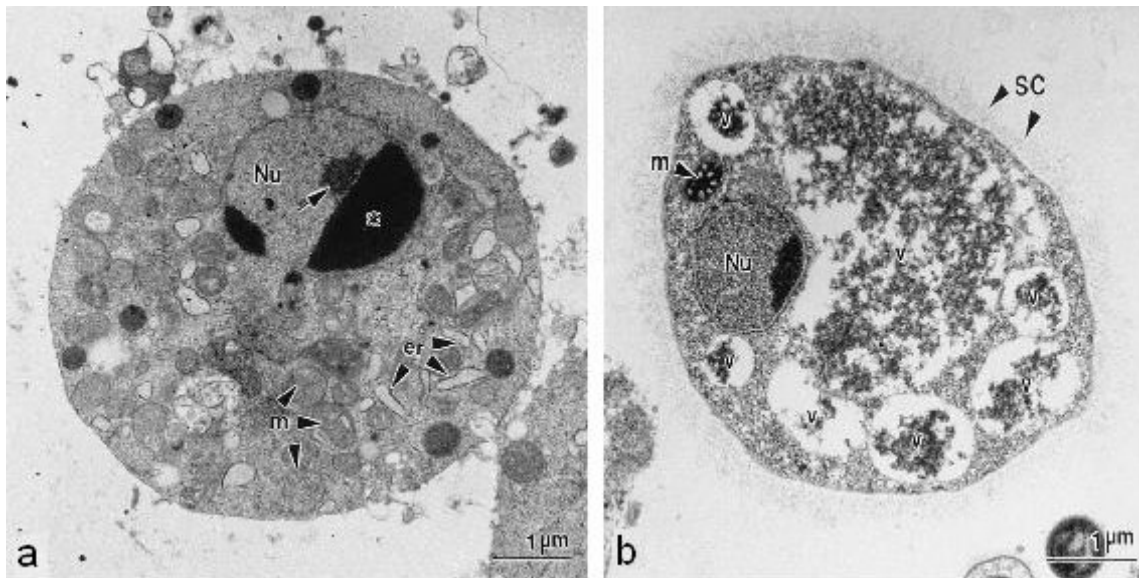
Vakuolární a granulární formy jsou citlivější na změny teplot, hypertonické a hypotonické prostředí a působení vzduchu (Tan et al., 2002).

2.2.4.2 Multivakuolární a avakuolární formy

Multivakuolární forma (obr. 3) je menší než vakuolární a granulární formy, dosahuje velikosti 5-8 μm (Stenzel, Boreham, 1996; Tan et al., 2002; Sohail, Fischer, 2005). Buňky obsahují jedno nebo dvě jádra, mají silnou povrchovou vrstvu, na kterou se váží bakterie. Multivakuolární formy mají místo centrální vakuoly více malých vakuol. Její mitochondrie obsahuje malé množství tubulárních krist (Stenzel, Boreham, 1996; Tan, 2008).

Avakuolární formy mají jedno nebo dvě jádra, chybí jim povrchová vrstva a centrální vakuola. Rozměry buňky jsou $\sim 5 \mu\text{m}$ (Stenzel, Boreham, 1996; Sohail, Fischer, 2005).

Obr. 3: Avakuolární a multivakuolární forma



Popis obrázku:

a) avakuolární forma, Nu: jádro, **m:** mitochondrie, **er:** drsné endoplasmatické retikulum

b) multivakuolární forma, Nu: jádro, **m:** mitochondrie, **SC:** fibriální vrstva, **v:** vakuoly

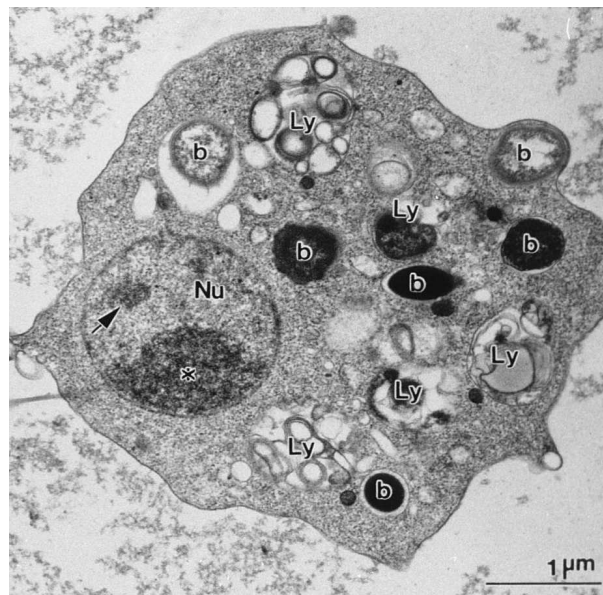
Zdroj: Stenzel, Boreham, 1996; upraveno

2.2.4.3 Améboidní forma

Améboidní forma (obr. 4) se vyskytuje vzácně. Existuje řada protichůdných zpráv o její morfologii. Dunn et al. (1989) popsali tuto formu jako nepravidelnou, laločnatou s pseudopodií vyčnívající z buňky, s jedním nebo dvěma jádry. Velikost buňky améboidní formy je 3-8 μm . Golgiho komplex, povrchová vrstva, mitochondrie ani velká centrální vakuola nebyla zaznamenána. Naproti tomu Tan et al. (2002) ve své studii uvedli přítomnost centrální vakuoly, Golgiho komplexu, endoplasmatického retikula a mitochondrie.

Tan a Zierdt (1973) popsali odlišnou morfologii. Améboidní forma byla podle jejich pozorování oválného tvaru, s jednou nebo dvěma velkými pseudopodiemi (Singh et al., 1996; Tan et al., 2002) a velkou centrální vakuolou. Velikost buňky se pohybovala v průměru od 10-15 μm . Golgiho komplex a mitochondrie byly zaznamenány. Mitochondrie byly charakteristicky velké (1 μm). Golgiho komplex se nacházel vedle jádra a skládal se z mnoha krátkých tubulárních segmentů. Povrch buňky je pokryt jemně vláknitou vrstvou (Tan, Zierdt, 1973).

Obr. 4: Améboidní forma



Popis obrázku:

améboidní forma, b: bakterie, **Nu:** jádro, **Ly:** lysozomy

Zdroj: Stenzel, Boreham, 1996; upraveno

Suresh et al. (1994) a Singh et al. (1995) se domnívají, že améboidní forma je přechodná mezi formou vakuolární a cystou, což však nelze považovat za prokázané (Stenzel, Boreham, 1996).

2.2.4.4 Cysty

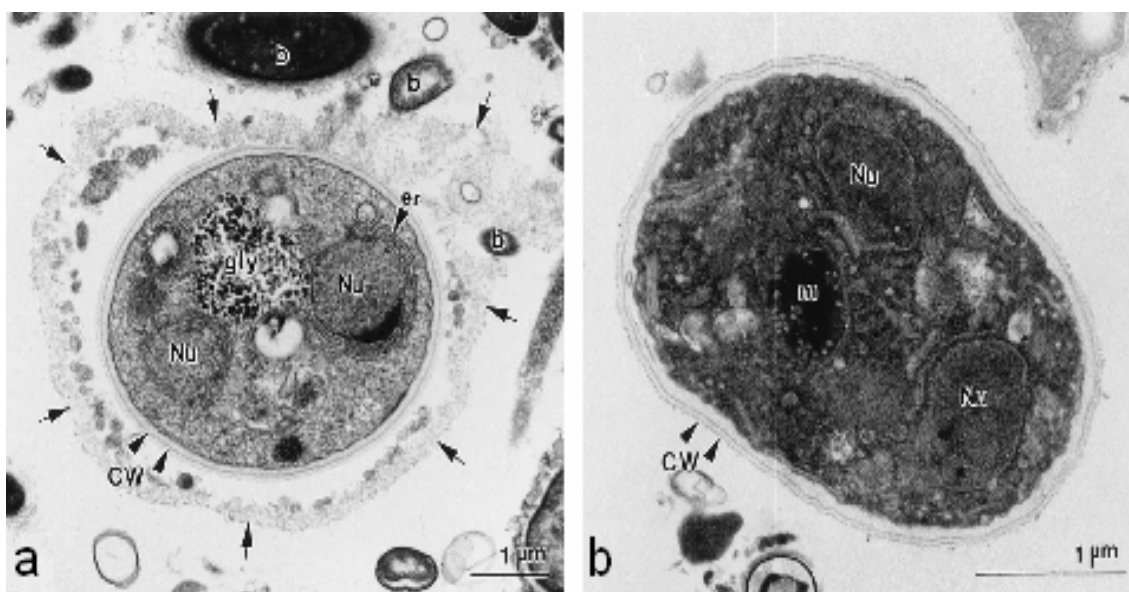
Cysta je nejnověji popsána forma parazita (Tan, 2008). Je mnohem menší než ostatní formy (Tan, 2004). Tan (2004) uvádí velikost 2-5 μm , zatímco Stenzel, Boreham (1996) 3-10 μm a Sohail, Fischer (2005) 5 μm . Cysty jsou variabilní ve tvaru, jsou většinou vejčité nebo kulovité. Jsou obklopeny silnou stěnou složenou z několika vrstev. Nemají centrální vakuolu (Tan, 2004), obsahují jedno až čtyři jádra (Stenzel, Boreham, 1996; Tan et al., 2002; Tan, 2004), mitochondrii, malé vakuoly (Tan, 2008), glykogen a tukové kapénky (Tan, 2004; Tan et al., 2002).

Rozlišujeme dva typy cyst: s vnějším fibriálním pláštěm a bez vnějšího fibriálního pláště (obr. 5). Cysty s vnějším fibriálním pláštěm jsou přítomny v trávicím traktu a cysty bez vnějšího fibriálního pláště jsou vylučovány ve výkalech do vnějšího prostředí (Zaman et al., 1997).

Studie odhalily, že cysty jsou rezistentní k vodnímu prostředí, kde jsou schopny přežít při pokojové teplotě po dobu až 19 dnů (Tan et al., 2002; Tan, 2004; Sohail, Fischer, 2005). Jsou však citlivé na extrémní teplo, chlad a na běžné dezinfekční prostředky (Tan et al., 2002; Tan, 2004) např. chlor (Erogles, Koltas, 2010). Také dokáží přežít v destilované vodě až 1 měsíc při teplotě 25 °C a 2 měsíce při teplotě 4 °C (Tanizaki et al., 2005; Tan, 2008).

Stenzel, Lee, Boreham (1997) našli cysty u makaků a kuřat. Lišily se ve tvaru, počtu jader a velikosti. U opic byly cysty většinou kulaté, některé měly prodloužený či nepravidelný tvar. Větší cysty obsahovaly 4 a více jader, menší 1-2 jádra, velikost byla 12-15 μm . U kuřat byly cysty oválné, jednojaderné, 3-4 μm velké, u některých byla velikost > 5 μm .

Obr. 5: *Cysta*



Popis obrázku:

a) cysta s vícevrstevnou stěnou a fibriální vrstvou, **CW:** vnější fibriální vrstva, **Nu:** dvě jádra, **gly:** velké množství glykogenu v cytoplasmě, **er:** endoplasmatické retikulum, **b:** bakterie; **b)** cysta s vícevrstevnou stěnou bez fibriální vrstvy, **Nu:** jádra, **m:** mitochondrie, **CW:** vnější fibriální vrstva

Zdroj: Stenzel, Boreham, 1996; upraveno

2.2.4.5 Jiné formy

Zierdt (1991) zaznamenal v kulturách řadu jiných buněčných forem, ale jejich existence nebyla ověřena jinými studiemi.

Dunn (1992), Stenzel (1995), Stenzel et al. (1991) se zabývali účinky kultivačních podmínek na morfologii, zejména vlivy osmolarity, pH, teploty a chemického složení kultivačního média. Zdá se, že vliv těchto parametrů na kultivované kmeny není vždy zcela jasný. Zierdt (1993) navrhl, že metabolický stav buňky také ovlivňuje morfologii.

Proto, než popisovat nové formy, je nezbytné vzít v úvahu morfologické rozdíly vyvolané prostředím, fyziologií buněk a odlišit různé fáze životního cyklu (Stenzel, Boreham, 1996).

2.2.5 Druhy

U ptáků byly popsány tyto druhy: *Blastocystis galli* u kuřat a krůt (Belova, Kostenko, 1990; podle Tanizaki et al., 2005), *Blastocystis anatis* u kachen a *Blastocystis anseri* u hus (Belova, 1991 a 1992; podle Lee, Stenzel, 1999; Tanizaki et al., 2005), na základě omezených morfologických kritérií (Lee, Stenzel, 1999).

Dále byly popsány druhy z mořského hada *Lapemis hardwickii* (*Blastocystis lapemi*), želvy uhlířské (*Blastocystis geocheiloni*), leguána nosorohého (*Blastocystis cycluri*), krajty mřížkované (*Blastocystis pythoni*) (Singh et al., 1996) a krysa (*Blastocystis ratti*) (Chen et al., 1997).

Určení těchto i dalších druhů je spojeno s problémy, neboť *Blastocystis* jsou polymorfni v morfologii (Tanizaki et al., 2005; Yoshikawa et al., 2007) a nejsou dosud známé všechny morfologické charakteristiky, které by umožnily rozlišit další druhy (Tanizaki et al., 2005).

2.2.5.1 Podtypy

V současné době autoři spíše rezignují na zařazování izolátů *Blastocystis* do druhů a využívají variabilitu genu SSU rDNA (což je gen pro rRNA malé ribozomální podjednotky) k definování několika dobře vymezených skupin označovaných jako podtypy. Na základě molekulární analýzy genu pro SSU rRNA rozlišili Stensvold et al. (2009) a Perkins (2010) deset podtypů. V dnešní době je již popsáno třináct podtypů (Parkar et al., 2010). Tyto podtypy jsou uvedeny v kapitole 2.2.5.1.2.

2.2.5.1.1 Sjednocení terminologie podtypů

Rozdělení do podtypů je neucelené a jednotliví autoři se liší. Někteří nepoužívají podtypy, ale např. třídy, skupiny, podskupiny aj. O sjednocení různých klasifikací se pokusil Stensvold et al. (2007) viz tab. 2.

Tab. 2: *Různé označení podtypů Blastocystis a návrh na sjednocení terminologie*

Clade ^a	Podtypy ^b	Skupiny a podtypy ^c	Podtypy ^d	Ribodemy ^{e,f}	Podskupiny ^g	Klastry ^h	Podtypy ⁱ	<i>Blastocystis</i> sp.
I	I	I/1	1	1, 8	III	E	1	podtyp 1
I	II	II/5	5	6	V	C, D	-	podtyp 2
II	III	III/3	3	2, 7, 4, 5	I, II	A	3	podtyp 3
IV	IV	IV/7	7	3	IV	B	-	podtyp 4
-	IVa	IV/7	-	-	-	-	-	podtyp 8
V	V	V/6	6	-	-	-	-	podtyp 5
VI	VI	VI/4	4	9	-	-	4	podtyp 6
-	VIa	VI/4	-	-	-	-	-	podtyp 9
VII	VII	VII/2	2	10	VI	-	2	podtyp 7
-	VII	VII/2	-	-	-	-	-	podtyp 7

Popis obrázku:

^a„Clade“ popsali Arisue et al. (2003) a Yoshikawa et al. (2004), ^bPodtypy Scicluna et al. (2006), ^cSkupiny a podtypy Noël et al. (2005), ^dPodtypy Yoshikawa et al. (1998, 2000), ^eRibodemy Clark (1997) a Yoshikawa et al. (2000), ^fRibodemy Clark (2004), ^gPodskupiny Böhm-Gloning et al. (1997), ^hKlastry Stensvold et al. (2006), ⁱPodtypy Yoshikawa et al. (1998).

Zdroj: Stensvold et al., 2007; upraveno

2.2.5.1.2 Rozšíření podtypů

Z lidí bylo izolováno několik podtypů *Blastocystis*. Studie Yoshikawa et al. (2004, podle Tan, 2008), která se zaměřila na oblast Bangladéše, Německa, Japonska, Pákistánu a Thajska uvádí, že nejdominantnější podtyp mezi těmito populacemi kromě Thajska byl podtyp 3 (41,7-92,3 %), následovaný buď podtypem 1 (7,7 až 25 %) nebo podtypem 6 (10 na 22,9 %). Podobné je rozšíření genotypů v Singapuru (78 % podtyp 3 a 22 % podtypu 1), Číně (60,4 % podtyp 3 a 24,5 % podtypu 1), Řecku (60 % podtyp 3 a 20 % podtypu 1), Německu (54 % podtyp 3 a 21 % podtypu 1) a Turecku (75,9 % podtyp 3).

Souppart et al. (2009) ze symptomatických pacientů izolovali podtypy 1-4. Böhm-

Gloning et al. (1997) zaznamenali u symptomatických pacientů podtypy I-IV, které podle Stensvold et al. (2007) odpovídají podtypům 1-4. Také byly nalezeny u pacientů s rakovinou a HIV/AIDS (Tan et al., 2009). Yiming et al. (2006) u symptomatických pacientů stanovili podtyp I. Podle Stensvold et al. (2007) se tento podtyp shoduje s podtypem 1. Ale Katsarou-Katsari et al. (2008, podle Jones et al., 2009) izolovali od symptomatických pacientů v Řecku podtyp III, který podle Stensvold et al. (2007) odpovídá podtypu 3. U asymptomatických nosičů byly stanoveny podtypy 1, 3, 4, a 7 (Souppart et al., 2009). Yiming et al. (2006) u asymptomatických pacientů stanovili podtyp III, což opět podle Stensvold et al. (2009) se shoduje s podtypem 3. Naproti tomu Böhm-Gloning et al. (1997) u asymptomatických určili podtypy I-V, které podle Stensvold et al. (2007) odpovídají podtypům 1-5.

Dále byly u člověka sporadicky nalezeny podtypy 7 (Tan, 2008; Stensvold et al., 2009), 8 a 9. Podtyp 9 byl izolovaný pouze z lidí (Noël et al., 2005, Stensvold et al., 2009) v ojedinělých případech (Noël et al., 2005).

Jako zoonotické Arisue et al. (2003, podle Abe, 2004) určil skupiny I, II, IV, VI a VII. Skupiny I, II, IV a VII podle Stensvolda et al. (2007) odpovídají podtypům 1, 2, 4 a 7, ale skupina VI odpovídá jak podtypu 6 tak i příbuznému podtypu 9.

Dalšími hostiteli podtypu 1 jsou např. psi (Eroglu, Koltas, 2010), ptáci (bažant, kuře) (Yoshikawa et al., 2004), hospodářská zvířata (kůň, prase, skot) (Thathaisong et al., 2003, Abe et al., 2003) a také primáti (Abe et al., 2003, 2004; Parkar et al., 2007).

U prasat byl nalezen i podtyp 2 (Navarro et al., 2008), 3 (Stensvold et al., 2009) a 5 (Stensvold et al., 2009). Podtyp 2 také nalezen u psů a primátů (Parkar et al., 2007).

Ze skotu, primátů (Abe et al., 2003), koček, ptáků a psů (Eroglu, Koltas, 2010) byl izolován podtyp 3. Podtyp 4 je podtypem izolovaným z hlodavců (krysy, morče), vačnatců (vačice) a primátů. Podtyp 5 byl izolován u skotu a primátů (Stensvold et al., 2009).

Podtypy 6 a 7 byly izolovány hlavně z ptáků. Podtyp 6 se např. vyskytuje u kuřat (Noël et al., 2003; Yoshikawa et al., 2004), perliček, bažantů (Abe et al., 2003) a podtyp 7 např. u kachen (Noël et al., 2003), hus (Abe, 2004), koroptví, tetřevů (Abe et al., 2004).

Podtyp 10 byl nalezen u hospodářských zvířat (skot, ovce), primátů a volně žijících zvířat (jelen) (Stensvold et al., 2009). Parkas et al. (2010) ve své studii popsali nové podtypy 11, 12 a 13. Podtyp 11 byl izolován ze slonů, podtyp 12 z žiraf, klokanů a podtyp 13 z klokanů.

2.2.6 Vývojový cyklus

Ohledně vývojového cyklu panuje určitá nejistota. Byly navrženy tyto způsoby asexuálního rozmnožování: binární dělení, pučení (Singh et al., 1995; Suresh, 2002), sporulace, schizogonie (Suresh, 2002), endogygonie a tvorba zvláštních váčků (Tan, 2008).

Pučení bylo pozorováno „in vitro“ po podání metronidazolu (Suresh, Anuar, 2002), kdy nový jedinec vznikl jako výrůstek mateřské buňky, tento výrůstek se oddělil a sám dorostl (Rebanová, 1998). **Sporulace** byla popsána u izolátů pocházející z drogově závislých lidí s neúspěšnou léčbou. **Schizogonie** (mnohonásobné dělení) byla hlášena v čistých kulturách (Suresh, Anuar, 2002), při schizogonii se jádro mnohonásobně dělí a mateřská buňka se rozpadne na větší počet dceřinných jedinců (Rebanová, 1998).

Není známo, zda tyto procesy jsou výsledkem dlouhodobého přizpůsobování na příslušného hostitele, kdy pomáhají *Blastocystis* přežít v různých hostitelích (Suresh, Anuar, 2002).

Tan (2004) ve své studii uvádí, že jediným věrohodně doloženým způsobem dělení je tzv. **binární dělení**, při němž se jedna mateřská buňka rozdělí na dvě dceřinné (Ryšavý et al., 1989). Aby vznikly dvě identické dceřinné buňky, musí být všechny buněčné organely zdvojeny (Hausmann, Hülsmann, 2003). Přibližně stejné množství jader, mitochondrie, Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula se dělí mezi dceřinné buňky (Tan, Zierdt, 1973).

Zvířata a člověk se nakazí po požití fekálních cyst (Tan, 2004). Ty jsou nejběžnější ve starších výkalech než v čerstvých, což naznačuje, že tato forma se vyvíjí v reakci na opouštění z hostitele nebo na faktory životního prostředí. Po požití cyst vhodným hostitelem dochází k excystaci. K excystaci dochází v důsledku působení žaludeční kyseliny nebo žaludečních enzymů, jako to bylo popsáno u rodu *Giardia* (Stenzel, Boreham, 1996).

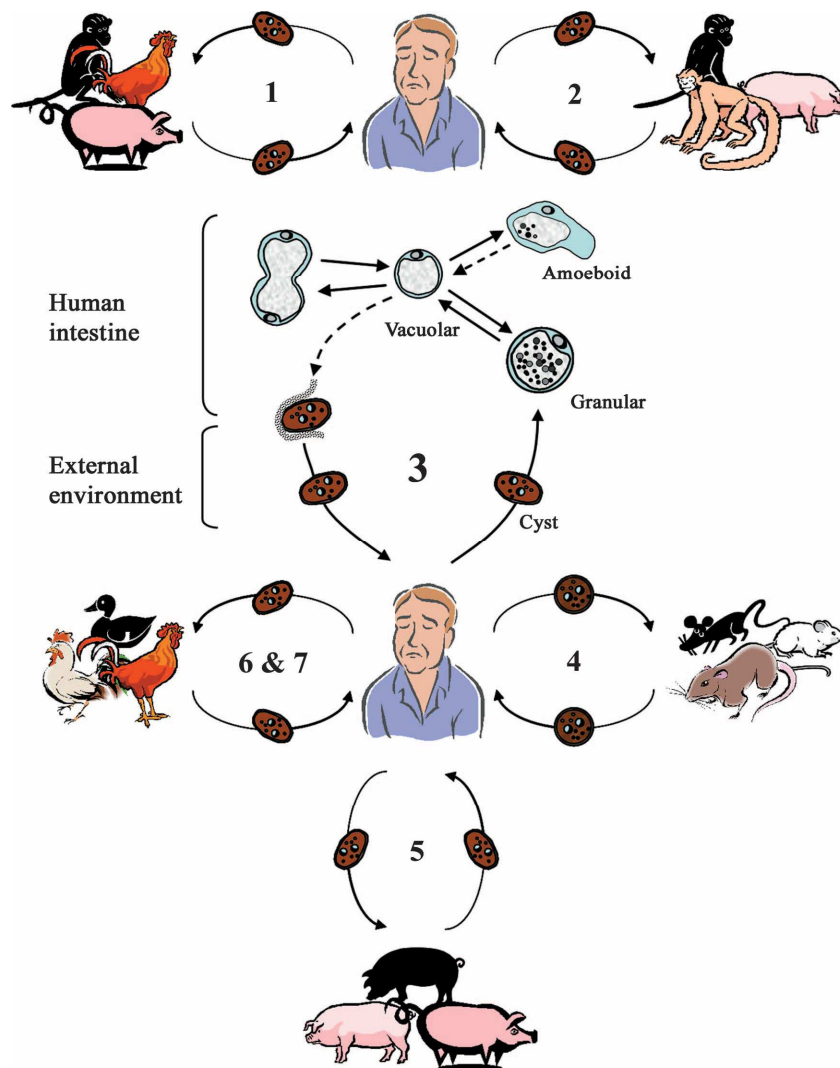
Stenzel a Boreham (1996) ve své studii popsali přeměnu cyst na avakuolární formy, které se poté mohou stát améboidními nebo multivakuolárními. O přeměně avakuolárních forem na améboidní je velmi málo informací, taková zpětná přeměna je však pravděpodobně možná. Multivakuolární formy jsou obklopeny silnou povrchovou vrstvou a jsou vylučovány do vnějšího prostředí, kde se přemění na cysty. Ty jsou pak požitý hostitelem a cyklus se opakuje. Tato teorie by se shodovala s pozorováním

Vdovenka (2000), který uvedl, že v životním cyklu nehrají roli vakuolární a granulární formy.

Naproti tomu Tan (2008) ve své studii uvedl, že cysty se vyvinou do vakuolárních forem, které se následně množí binárním dělením. Některé vakuolární formy se přemění na cysty. Ty jsou pak vylučovány ve výkalech do vnějšího prostředí. Po požití těchto cyst se cyklus opakuje. Bližší popis je uveden u obr. 6.

Životní cyklus a způsoby reprodukce zatím nebyly vyčerpávajícím způsobem prozkoumány, je zapotřebí dalších studií, které pomohou k jejich objasnění (Stenzel, Boreham, 1996).

Obr. 6: Vývojový cyklus *Blastocystis*



Popis obr. 6 ze strany 28

Lidé a zvířata se nakazí po požití fekální cysty, která se vyvine v tlustém střevě do vakuolární formy. Tato forma se rozdělí binárním dělením a může se vyvinout do améboidní nebo granulární formy. V hostitelském střevě se z vakuolární formy vytvoří cysta, která může být obklopena tlustou fibriální vrstvou, ta se ztratí během průchodu do vnějšího prostředí. Informace o přechodu z améboidní na vakuolární formu a z vakuolární formy na cystu chybí (na obrázku jsou znázorněny přerušovanými čarami).

Čísla v obrázku označují jednotlivé podtypy *Blastocystis* s naznačenou specifitou a možností nákazy člověka. Podtyp 1 savci a ptáci, podtypy 2, 3, 4 a 5 primáti/prasata, člověk, skot/prasata a hlodavci, podtypy 6 a 7 ptáci.

Lidé jsou potenciálně infikováni sedmi nebo i více podtypy *Blastocystis* a některá zvířata jsou rezervoárem infekce pro přenos na člověka.

Zdroj: Tan, 2008; upraveno

2.2.7 Příznaky

Zatím není jasné, zda je *Blastocystis* pro organismus škodlivá, komenzální nebo patogenní (Tan, 2004). Patogenita zůstává sporná a je v současné době předmětem diskuze (Elvakil, Hewedi, 2010). Některé studie naznačují, že patogenita může být důsledkem vysokého počtu jedinců tohoto parazita v hostiteli (Suresh, Anuar, 2002).

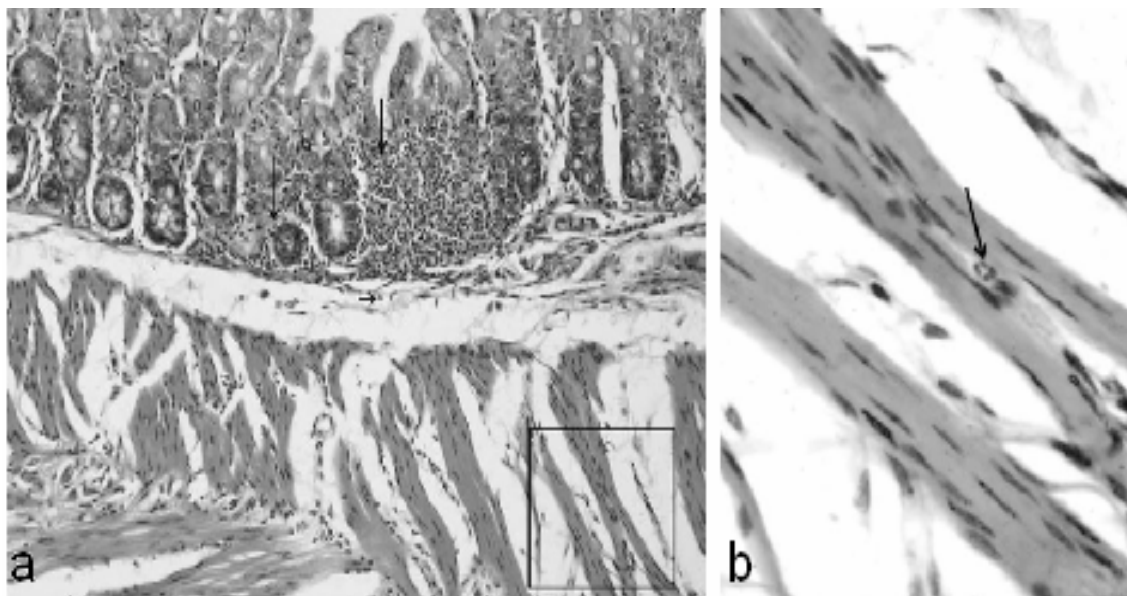
Blastocystis je schopná napadnout slizniční a podslizniční vazivo a svalovou vrstvu sliznice tlustého střeva (obr. 7) (Elvakil, Hewedi, 2010).

Příznaky jsou nespecifické a zahrnují průjem, bolesti břicha (Stenzel, Boreham, 1996; Suresh, Anuar, 2002), křeče, nepříjemné pocity, nevolnost (Stenzel, Boreham, 1996; Sukthana, 2001) a zvracení (Elvakil, Hewedi, 2010). V závažnějších případech mohou nastat profuzní vodnaté průjmy a horečky (Tan, 2004), i když mohou být méně výrazné u chronických případů. Také únava, deprese, bolesti kloubů, zácpa (Jones et al., 2009), nechutenství, nadýmání a další nespecifické gastrointestinální účinky mohou být spojeny s infekcí tímto parazitem (Stenzel, Boreham, 1996). Mezi nejčastěji zaznamenané příznaky patří bolesti břicha a průjem (Tan, 2008).

Některé studie uvádějí výskyt horečky při akutních stavech. K dalším často vyskytujícím příznakům patří eozinofilie, hepatomegalie, splenomegalie, krvácení z konečníku, přítomnost kožních vyrážek a svědění.

Často se vyskytují bezpříznakové infekce. Je možné, že se příznaky projevují jen v určité fázi životního cyklu (Stenzel, Boreham, 1996).

Obr. 7: Vakuolární formy v tlustém střevě myši



Popis obrázku:

a) infikované tlusté střevo s vakuolárními formami ve slizničním a podslizničním vazivu, ve svalové vrstvě sliznice; **b)** zvětšená oblast z obr. a, vakuolární forma se čtyřmi jádry a centrální vakuolou

Zdroj: Elvakil, Hewedi, 2010

2.2.8 Diagnostika

Blastocystis hominis byla nejčastěji zjišťována pomocí světelné mikroskopie (Stenzel, Boreham, 1996). K diagnostice slouží např. flotačně-centrifugační metoda podle Sheathera. Následné barvení se provádí podle Giemsy, trichromem, modifikovanou metodou Ziehl-Neelsena, safranin-metylovou modří aj.

Nejlépších výsledků je dosahováno safranin-metylovou modří a modifikovanou metodou dle Ziehl-Neelsena, tyto metody jsou rychlé a snadno proveditelné. Barvení trichromem není tak jednoznačné a je časově velmi náročné. Metoda podle Giemsy také není moc efektivní (Khalifa, 1999).

Transmisní elektronová mikroskopie se může používat při potvrzení atypických forem, drobných cyst s velkými lipidickými nebo glykogenovými inkluzemi apod. Tato

metoda se doporučuje provést ihned po odebrání fekálního materiálu, aby se minimalizovaly morfologické změny a buněčná degradace. Fixace se provádí pomocí glutaraldehydu (Stenzel, Boreham, 1996).

Někteří autoři mikroskopické vyšetření nedoporučují z důvodu nízké záchytnosti *Blastocystis* spp. (Windson et al., 2002). Z tohoto důvodu se doporučuje molekulární metoda PCR se specifickými primery.

2.2.9 Léčba a prevence

Existuje jen velmi málo údajů o léčbě. Volba a dávkování léků zůstává do jisté míry empirická. Léčba se považuje za úspěšnou, pokud došlo k úplnému vymizení, nebo snížení počtu parazitů, a ke zmírnění nebo odstranění příznaků (Stenzel, Boreham, 1996).

K léčbě se používá např. metronidazol, iodoquinol, tetracyklin, furazolidon, ornidazol, tinidazol, trimetoprim-sulfamethoxazol a mnoho dalších.

Metronidazol lze podávat v dávkách 750 mg 3x denně po dobu 5 (Stejskal, 2005) až 10 dnů (Stenzel, Boreham, 1996; Tan et al., 2010), 200 mg 4x denně po dobu až 7 dnů, nebo 2 g denně po dobu 5 dnů. Iodoquinol byl podáván v dávkách 300 mg 3x denně po dobu 10 dnů, nebo 650 mg 3x denně po dobu 20 dní. V některých případech byla léčba metronidazolem a iodoquinolem neúspěšná (Stenzel, Boreham, 1996). Alternativou k metronidazolu jsou co-trimoxazol a paromomycin. Nitazoxanid se podává v dávce 500 mg 2x denně po dobu 3 dnů, trimetoprim-sulfamethoxazol v dávce 320 mg trimetoprimu a 1, 600 mg sulfamethoxazolu denně (Tan et al., 2010).

U jedinců s oslabenou imunitou byl účinný metronidazol (v dávce 1-2 g na den), trimetoprim-sulfamethoxazol a kombinace metronidazolu a iodoquinolu.

Zierdt et al. (1983), Dunn a Boreham (1991) zkoumali účinky léků v podmínkách „in vitro“. Zierdt et al. (1983) označili jako inhibiční emetin dihydrochlorid, metronidazol, furazolidon, trimetoprim-sulfamethoxazol aj., mírně inhibiční iodoquinol a chlorochin, a neinhibiční diloxanid fuorát a paromomycin sulfát.

Dunn a Boreham (1991) zjistili, že nejvíce účinné byly emetin dihydrochlorid, furazolidon, satranidazol. Také flunidazol, ronidazol, quinacrin dihydrochlorid, niridazol a metronidazol byly účinné. Ornidazol, tinidazol, trimetoprim a secnidazol byly účinné v menší míře (Stenzel, Boreham, 1996).

Jak už bylo uvedeno v předchozích kapitolách, *Blastocystis* se přenáší fekálně-orální cestou. Z hlediska prevence tohoto onemocnění u zvířat se doporučuje dodržovat zoohygienické podmínky, podávat kvalitní krmivo, zabránit kontaminaci krmiva, vody a udržovat dobrý zdravotní stav všech zvířat v chovu.

3. MATERIÁL A METODY

V roce 2010 jsme z jednoho anonymního domácího chovu odebírali vzorky trusu od kachen, hus, slepic a holubů. Celkem jsme odebrali 55 vzorků. Z toho po 10 vzorcích trusu od slepic, kachen a hus a 25 od holubů. V těchto vzorcích jsme se pokoušeli prokázat *Blastocystis* kultivačně. Vzhledem k tomu, že tento postup vedl k nízké záchytnosti *Blastocystis* spp., rozhodli jsme se v tomto postupu dále nepokračovat.

Z Parazitologického ústavu AV ČR jsme využili nabídky Doc. Ing. Martina Kváče, Ph.D., který nám poskytl sbírku vzorků izolované DNA. Vzorky byly vybírány tak, aby mezi nimi byly zastoupeny izoláty z širšího spektra hostitelů (kachen, slepic a holubů). Tyto vzorky izolované DNA jsme použili jako templát v PCR reakci s *Blastocystis*-specifickými primery. Zejména jsme použili nested-PCR, jíž jsme si chtěli ověřit vyšší citlivost záchytu *Blastocystis* spp. Celkem bylo použito 20 vzorků DNA izolované z ptačího trusu, všechny byly analyzovány pomocí nested-PCR, jen 11 z nich také pomocí klasické PCR. Dále byla prováděna elektroforéza a sekvenování.

Získané sekvence SSU rDNA *Blastocystis* jsme analyzovali fylogenetickými metodami.

3.1 Kultivace

Vzorky pro kultivaci jsme odebírali z podlah do předem očíslovaných kelímků pomocí špachtle. Následující den byly vzorky zpracovány v parazitologické laboratoři. Vyšetření byla zaměřena na sledování střevních prvoků rodu *Blastocystis*, ačkoliv námi použitá kultivační metoda zachytila i další střevní prvoky, např. trichomonády.

Do předem připravených zkumavek s dvoufázovým médiem dle Dobella-Leidlawova (viz níže) jsme pomocí špejle přenesli malé vzorky trusu a přenesli do zkumavek. Takto připravené zkumavky jsme umístili do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C po dobu 3 dnů. Po třech dnech byly vzorky přeočkovány sterilní Pasteruovou pipetou do zkumavek s novým médiem a opět vráceny do termostatu. Čtvrtý den jsme vzorky pozorovali pomocí světelného mikroskopu při 400násobném zvětšení.

3.1.1 Dobell-Leidlawovo médium

Dobell-Leidlawovo médium se skládá z tekuté a pevné složky. Obě složky se připravují odděleně a médium je zkompletováno bezprostředně před použitím.

Pevnou složku představuje 1,5 ml koagulovaného koňského séra, které jsme napipetovali do zkumavek. Zkumavky jsme se sérem nechali koagulovat v šikmé poloze v horkovzdušném sterilizátoru jednu hodinu při teplotě 80 °C. Tento postup jsme druhý den opakovali, pro zničení případných kontaminujících organismů klíčících ze spor přeživších první fázi sterilizace. Zkumavky s pevnou fází jsme skladovali v lednici.

Tekutá složka média se skládá z 500 ml Ringerova roztoku a 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku. Složení Ringerova roztoku je uvedeno v tab. 3.

Tab. 3: Složení Ringerova roztoku

Roztok A	
NaCl	3,25 g
NaHCO ₃	0,1 g
KCl	0,07 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,01 g
destilovaná voda	do 450 ml

Roztok B	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,08 g
destilovaná voda	do 50 ml

Oba roztoky jsou připraveny a autoklávovány odděleně, abychom předešli vysrážení fosfátů za přítomnosti vápenatých kationtů. Po zchladnutí jsme oba roztoky smíchali a přidali 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku (přibližně ze dvou vajec). Takto připravenou tekutou složku jsme pak uchovávali v lahvi v lednici.

Před použitím média jsme převrstvili pevnou složku 3 ml tekuté složky.

3.2 PCR metody

3.2.1 Klasická PCR

Reakční směs byla připravena pro amplifikaci SSU rDNA podle tab. 4. V této reakční směsi byly použity tyto primery:

forward - Blasto98 (5'- AAC TGC GAA TGG CTC ATT AT -3')

- mámi navržený primer pro *Blastocystis* spp.

reverse - BhRDr (5'- GAG CTT TTT AAC TGC AAC AAC G -3')

- specifický primer pro *Blastocystis* spp. (Scicluna et al., 2006)

Tab. 4: Složení reakční směsi pro amplifikaci SSU rDNA *Blastocystis*

Primární		
H ₂ O	-----	11,30
MgCl ₂	(25 mM)	1,20
10Xbuffer	-----	2,00
dNTP	10 mM	0,40
Forward primer	10 μM	0,40
Reverse primer	10 μM	0,40
BSA	(10 mg/ml)	0,80
Taq polymeráza	(1U/1μl)	0,50
DNA	-----	3,00
sum	-----	20,00

Tab. 5: *Nastavení teplotního cyklu v termocykleru pro amplifikaci SSU rDNA*

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

PCR reakci jsme nechali proběhnout v termocykleru, tato reakce byla dokončena cca za 2 hodiny. Nastavení teplotního cyklu (s použitím vyhřívaného víka) v termocykleru je uveden v tab. 5. Annealingová teplota byla nastavena na 59 °C.

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

3.2.2 Nested-PCR

Nested-PCR se skládá ze dvou reakcí z primární a sekundární amplifikace SSU rDNA. Reakční směs pro primární amplifikaci je stejná jako u klasické PCR v kapitole 3.2.1 a reakční směs pro sekundární amplifikaci byla připravena podle tab. 6.

Tab. 6: *Složení reakční směsi pro sekundární amplifikaci SSU rDNA Blastocystis*

Sekundární		
H ₂ O	-----	12,10
MgCl ₂	(25 mM)	1,20
10Xbuffer	-----	2,00
dNTP	10 mM	0,40
Forward primer	10 µM	0,40
Reverse primer	10 µM	0,40
Taq polymeráza	(1U/1µl)	0,50
DNA	-----	3,00
sum	-----	20,00

V reakční směsi primární amplifikace byly použity primery:

forward - RD5 (5'- ATC TGG TTG ATC CTG CCA GT -3')

- specifický eukaryotický primer (Scicluna et al., 2006)

reverse - MedlinB (5'- CCT TCT GCA GGT TCA CCT AC -3')

- specifický eukaryotický primer (Medlin et al., 1988)

V reakční směsi sekundární amplifikace byly použity stejné primery jako u klasické PCR: **Blasto98** (forward) a **BhRDr** (reverse).

Nested-PCR byla také prováděna v termocykleru. Nastavení teplotního cyklu bylo stejné jako u PCR. Lišila se jen annealingová teplota, která byla 60 °C. Reakce byla také dokončena cca za 2 hodiny.

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

3.3 Elektroforéza

Výsledky PCR i nested-PCR produktu jsme ověřovali horizontální elektroforézou. Gel pro elektroforézu jsme připravili podle tab. 7. Elektroforéza probíhala při gradientu napětí cca 10 V.cm⁻¹ a trvala cca 1 hodinu.

Poté jsme gel sledovali pod UV světlem. Následně byl vyfocen digitálním fotoaparátem.

3.3.1 Příprava gelu

Tab. 7: Chemikálie pro přípravu gelu

Chemikálie	Množství
agaróza	0,5 g
TBE pufr	50 ml
ethidiumbromid	1 µl

Do Ehrlenovy baňky jsme odvážili 0,5 g agarózy a 50 ml TBE pufru. Směs jsme

zahřívání v mikrovlnné troubě za občasného promíchávání až do bodu varu (cca 5 minut). Tuto směs jsme zchladili pod proudem tekoucí vody. Po zchlazení na zhruba 50-60 °C jsme připipetovali 1µl ethidiumbromidu a následně promíchali. Takto připravený gel jsme nalili do formy na gel a vložili hřeben daných rozměrů. Gel jsme nechali tuhnout cca 30 minut.

3.4 Sekvenování

Sekvence DNA byla provedena v laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin (AV ČR). Tato laboratoř je vybavena přístrojem ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems.

Tato laboratoř používá k analýze klasickou metodu sekvenování, tzv. Sangerovu metodu (Sanger et al., 1977).

3.5 Fylogenetické analýzy

3.5.1 Příprava alignmentu

Použité programy:

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

Bezprostředně po získání sekvence byl její původ nejprve ověřen prostřednictvím algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), jež je k dispozici na serveru NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvence, které dle BLASTu zjevně nepatřily *Blastocystis* (byly z 99 – 100 % identické se sekvencemi SSU rDNA jiných organismů), byly z dalších analýz vyřazeny.

Z internetových stránek NCBI jsme se zároveň připojili k databázi GenBank, odkud jsme stáhli sekvence SSU rDNA reprezentantů jednotlivých podtypů *Blastocystis*. Jejich přístupové kódy i hostitelské organismy těchto kmenů jsou uvedeny na obr. 9. Tyto sekvence jsme následně fylogeneticky analyzovali společně s našimi sekvencemi.

Před vlastním analyzováním je třeba připravit tzv. alignment tak, aby odpovídající

báze u různých sekvencí byly ve stejné pozici. To spočívá zejména v doplnění mezer na vhodná místa za použití programu CLUSTALx. Výsledný alignment byl dále zkontrolován a upraven v programu BioEdit, šlo zejména o odstranění příliš variabilních pozic, kde jsme neměli jistotu, že si báze v těchto pozicích skutečně odpovídají, případně o poopravení případů, které algoritmus programu CLUSTALx vyhodnotil zjevně nesprávně.

Tímto způsobem je alignment hotov. Postup tvorby dendrogramů je uveden níže v kapitole 3.5.2.

3.5.2 Tvorba dendrogramu

Použité programy:

- PAUP (Swofford, 2003)
- RAxML (Stamatakis, 2006)
- TreeView (Page, 1996)

Když je alignment hotov, počítá se dendrogram za použití programu PAUP. V tomto programu byly hledány topologie dendrogramu pomocí metody maximální parsimonie (MP - maximum parsimony) a Fitch-Margoliashovy metody nejmenších čtverců s LogDet vzdálenostmi.

Dále jsme použili program RAxML, který slouží pro hledání výsledného dendrogramu pomocí metody maximální věrohodnosti (ML - maximum likelihood).

Výsledné dendrogramy jsme prohlíželi v programu TreeView.

4. VÝSLEDKY

4.1 Kultivace

Z 55 vzorků byly dle výsledků kultivačních experimentů na *Blastocystis* pozitivní pouze dva vzorky, od slepice a holuba. I tak byla kultura *Blastocystis* velmi málo početná a po další kultivaci již v ní *Blastocystis* nebyly nalezeny vůbec. V kulturách jsme také zaznamenali trichomonády a měňavky (patrně rodu *Entamoeba*) u hus, a oocysty kokcií rodu *Eimeria* a vajíčka helmintů rodu *Capillaria* u holubů - v tomto případě šlo samozřejmě o pozorování pozůstatku jejich množství ze vzorku trusu, nikoli o kulturu.

4.2 Klasická PCR

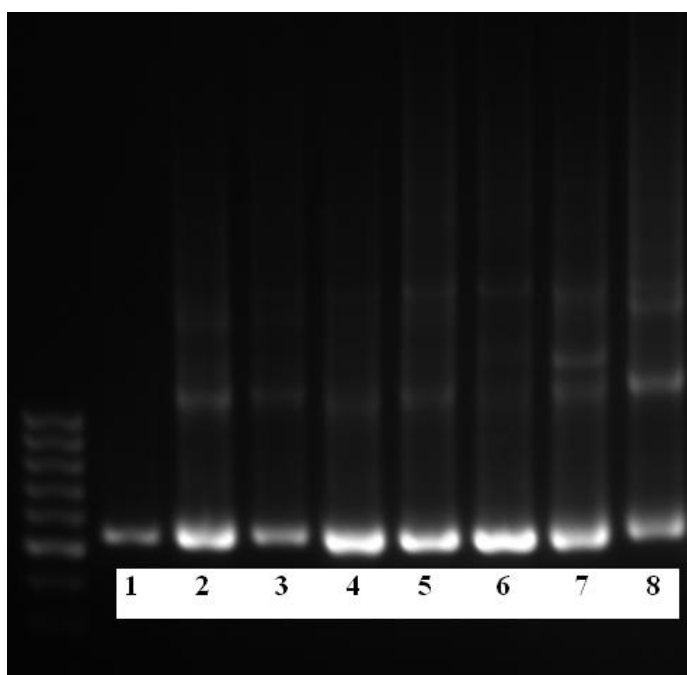
Celkem bylo klasickou PCR analyzováno 11 vzorků, z toho 3 slepičí a 8 kachních. Výsledky této PCR vizualizované na elektroforetickém gelu naznačovaly 100% prevalenci *Blastocystis* u kachen a třetinovou prevalenci u slepic. Sekvenování čtyř získaných fragmentů však poskytlo doklady o tom, že některé amplikony nebyly původem z *Blastocystis*. Sekvence SSU rDNA patřící *Blastocystis* byla získána pouze z jednoho vzorku, a to od kachny. Zároveň byly naamplifikovány SSU rDNA kokcií rodu *Eimeria* (vzorek z kachny) a pravděpodobně i hlísta (Nematoda), jedna ze sekvencí nebyla dostatečně kvalitní k prokázání jejího původu (oba vzorky ze slepic).

4.3 Nested-PCR

Celkem bylo metodou nested-PCR analyzováno 20 vzorků, z toho 6 slepičích, 11 kachních a 3 holubí. Tato metoda naznačovala 100% výskyt *Blastocystis* spp. u vyšetřovaných ptáků (vzhledem k přítomnosti proužků očekávané délky na elektroforetických gelech) viz obr. 8. Původ sedmi amplikonů byl ověřen sekvenací - ve čtyřech případech (1x vzorek z holuba, 3x z kachny) byl prokázán jejich původ z prvoků rodu *Blastocystis*, ve dvou případech (1 x vzorek ze slepice, 1 x z kachny) byla

sekvence nekvalitní a její původ nebylo možné určit, v jednom případě však sekvence pocházela z kokcidií rodu *Eimeria* (jde o tentýž kachní vzorek, ze kterého byla získána sekvence kokcidií i v případě „klasické“ PCR).

Obr. 8: Výsledek elektroforézy pro nested-PCR. Ukázka výsledků jednoho z nested-PCR experimentů, jejichž cílem bylo diagnostikovat *Blastocystis* u ptáků. Ve všech vzorcích DNA izolované z ptačího trusu proběhla amplifikace produktu očekávané délky. Původ vzorků viz níže uvedená tab. 8.



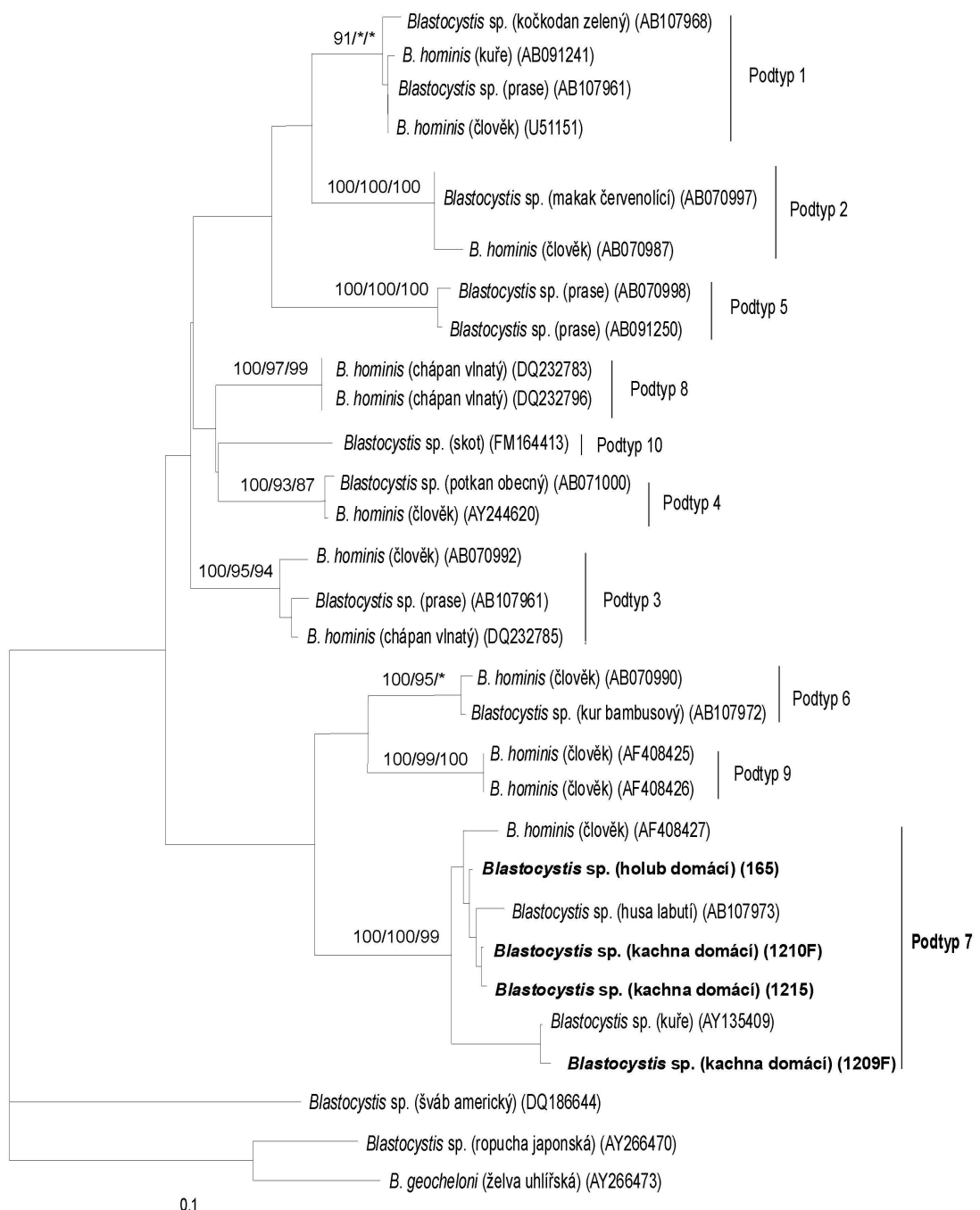
Tab. 8: Hostitelé a čísla vzorků použitých v nested-PCR, jejíž výsledky ukazuje obr. 8

	Vzorek č.	Hostitel
1	4289	pozitivní vzorek
2	1099	slepice
3	1098	slepice
4	1202	slepice
5	1209	kachna
6	1210	kachna
7	1211	kachna
8	1213	kachna

4.4 Fylogenetické analýzy

Výsledky fylogenetických analýz jsou znázorněny v obr. 9. Z něho je zřejmé, že všechny kmeny *Blastocystis*, z nichž byly v rámci této práce získány sekvence SSU rDNA, patří do podtypu 7. Ten je dobře statisticky podpořen vysokými hodnotami bootstrapu pro všechny použité metody rekonstrukce fylogeneze *Blastocystis*.

Obr. 9: Výsledný dendrogram fylogenetických analýz



Popis obr. 9 ze strany 42

Dendrogram konstruovaný metodou LogDet (Fitch-Margoliashova metoda nejmenších čtverců s Log-Det vzdálenostmi) na základě sekvencí SSU rDNA. K zakořenění stromu byly použity sekvence tří kmenů *Blastocystis* izolovaných ze studenokrevných a bezobratlých hostitelů: švába amerického, ropuchy japonské a želvy uhlířské. V obrázku jsou uvedeny hodnoty bootstrapu pro jednotlivé podtypy. Jedná se o hodnoty pro metody nejmenších čtverců s LogDet vzdálenostmi, maximální parsimonie a maximální věrohodnosti.

* označuje bootstrapové hodnoty nižší než 50; námi získané sekvence jsou v obrázku vyznačeny tučně

5. DISKUZE

Naše práce byla zaměřena na střevní prvoky rodu *Blastocystis*. Nejprve jsme vzorky, které byly odebírány z jednoho anonymního domácího chovu, kultivovali v Dobell-Leidlawovu médiu a po kultivaci byly vzorky pozorovány ve světelném mikroskopu. Pozitivní vzorky na *Blastocystis* spp. byly pouze dva, jeden od husy a jeden od holuba.

Nízká záchytnost mohla být způsobena nízkou prevalencí *Blastocystis* ve sledovaném chovu, jako pravděpodobnější příčina se nám však vzhledem k výsledkům molekulární diagnostiky jeví nevhodnost použitého média pro citlivou diagnózu pomocí kultivace. Vyšší záchytnost PCR metodiky vůči kultivaci naznačují i některé studie porovnávající různé diagnostické metody (Stensvold et al., 2006, 2007).

Bohužel, naše experimenty poukázaly na to, že použité primery nejsou zcela specifické, neboť byly schopny amplifikovat i částečnou sekvenci SSU rDNA jiných organismů. Z toho vyplývá, že nelze s jistotou rozhodnout, zda vzorky, jež bylo možno pouze na základě PCR a následné elektroforézy prohlásit za *Blastocystis* - pozitivní, tohoto parazita skutečně obsahovaly. Teprve získání sekvence z příslušného amplikonu umožnilo rozhodnout, zda se jedná o *Blastocystis*. Pro budoucí studie je třeba se tímto problémem dále zabývat a patrně je třeba vyzkoušet i alternativní PCR diagnostické metody založené na odlišných primerech (např. Yoshikawa et al., 2009).

Na základě sekvencí SSU rDNA byl zkonstruován dendrogram metodou LogDet (Fitch-Margoliashova metoda nejmenších čtverců s Log-Det vzdálenostmi). K zakořenění stromu jsme použili sekvence tří kmenů *Blastocystis* izolovaných ze studenokrevných a bezobratlých hostitelů: švába amerického, ropuchy japonské a želvy uhlířské.

Všechny naše ptačí sekvence (1 od holuba domácího a 3 od kachny domácí), které jsme analyzovali fylogenetickými metodami, byly zařazeny do podtypu 7, což se shoduje s výsledky jiných autorů. U kachen byl nalezen podtyp 7 např. kolektivem Noël et al., 2003. I u dalších ptáků byl tento podtyp opakovaně nalezen (Abe et al., 2003; Arisue et al., 2003; Yoshikawa et al., 2004; Hess et al., 2006; podle Stensvold et al., 2009), avšak v literatuře se nám nepodařilo nalézt zmínku o výskytu tohoto podtypu u holubů - jsme tedy pravděpodobně první, komu se tuto skutečnost podařilo prokázat. Holubi přitom mohou patřit mezi významné vektory tohoto parazita vzhledem ke svému hojnému výskytu ve městech. Někteří autoři také uvádějí, že ptačím podtypem je i

podtyp 6. Ten se nám nepodařilo v námi zkoumaných vzorcích zachytit.

6. SOUHRN

V roce 2010 jsme z jednoho anonymního domácího chovu odebírali vzorky trusu od slepic, kachen, hus a holubů. Celkem jsme vyšetřili 55 vzorků. Vyšetření byla zaměřena na přítomnost střevních prvoků rodu *Blastocystis*. Vzorky jsme nejprve kultivovali v médiu dle Dobell-Leidlaw a poté pozorovali při 400násobném zvětšení ve světelném mikroskopu.

Z vyšetřených vzorků byly pouze dva vzorky pozitivní na přítomnost *Blastocystis* a to vzorky od slepice a holuba. Po dalších kultivacích těchto pozitivních vzorků již v ní *Blastocystis* nebyly nalezeny vůbec. V kulturách jsme také zaznamenali trichomonády a měňavky u hus, pravděpodobně rodu *Entamoeba*, oocysty kokcií rodu *Eimeria* a vajíčka helmintů rodu *Capillaria* u holubů - v tomto případě šlo samozřejmě o pozorování pozůstatku jejich množství ze vzorku trusu, nikoli o kulturu. Protože záchyt *Blastocystis* spp. tímto postupem byl velice nízký, dosahoval pouze 3,6 %, rozhodli jsme se od tohoto postupu upustit a dále v něm nepokračovat.

Proto jsme použili PCR a nested-PCR. Vzorky pro tyto reakce jsme již neodebírali z výše zmíněného chovu. Využili jsme vzorky z Parazitologického ústavu AV ČR, kde byla již DNA ze vzorků slepic, kachen a holubů vyizolovaná. Tuto izolovanou DNA jsme použili jako templát pro výše zmíněné reakce.

Celkem jsme použili 20 vzorků DNA izolované z ptačího trusu. Všechny vzorky (6 slepičích, 11 kachních a 3 holubí) jsme analyzovali pomocí nested-PCR, jen 11 (3 slepičí a 8 kachních) z nich také pomocí klasické PCR.

Výsledky PCR i nested-PCR byly zobrazeny na elektroforetickém gelu a následně byly vybrané amplikony sekvenovány. Výsledky PCR ověřené sekvenací naznačovaly 100% prevalenci *Blastocystis* u kachen a třetinovou prevalenci u slepic. Sekvenování čtyř získaných fragmentů však poskytlo doklady o tom, že některé amplikony nebyly původem z *Blastocystis*. Sekvence SSU rDNA patřící *Blastocystis* byla získána pouze z jednoho vzorku, a to od kachny. Jedna ze sekvencí nebyla dostatečně kvalitní k prokázání jejího původu (vzorek ze slepice). Nested-PCR opět jako klasická PCR naznačovala 100% výskyt *Blastocystis* spp. Ze sedmi amplikonů, které jsme ověřovali sekvenací, jsme potvrdili jejich původ z *Blastocystis* ve čtyřech případech (1x vzorek z holuba, 3x z kachny). Ve dvou případech (1x vzorek ze slepice, 1x z kachny) byla sekvence nekvalitní a její původ nebylo možné určit. Jak u PCR, tak nested-PCR se

podářilo naamplifikovat SSU rDNA kokcidií rodu *Eimeria* (řlo o stejný kachní vzorek). Pomocí PCR byl také naamplifikován pravděpodobně hlíst (Nematoda) ze slepičího vzorku.

Klasická PCR má patrně menší citlivost oproti nested-PCR. Metoda nested-PCR je tudíž oproti klasické PCR vhodnější. Ale jak klasická PCR, tak nested-PCR nejsou námi použitými primery 100% specifické, obě tyto metody zachytily DNA jiných organismů.

Získané sekvence SSU rDNA *Blastocystis* byly analyzovány fylogenetickými metodami a bylo potvrzeno zařazení ptačích sekvencí do podtypu 7.

7. SUMMARY

During 2010, we collected faeces samples from hens, ducks, geese and pigeons from an anonymous farm. A total of 55 samples were examined. The samples were cultured in Dobell-Leidlaw medium and then checked by light microscopy at magnification of 400x for the presence of intestinal protozoans of the genus *Blastocystis*.

Only two of the examined samples were *Blastocystis*-positive: one originating from a hen and another originating from a pigeon. After prolonged cultivation, the cultures of *Blastocystis* were lost. Other protists such as trichomonads or amoebas (in geese samples), probably of the genus *Entamoeba*, were also found in cultures, as were *Eimeria* oocysts and *Capillaria* eggs from pigeons (in these cases were of course found just remnants of the original numbers of these stages in faeces samples, these were not cultures). Because the number of successfully diagnosed *Blastocystis* infections using culturing was very low. It reached only 3,6 %. We decided to use other methods in our future studies.

For these reasons PCR and nested-PCR were used. Samples examined with these methods were of different origin: we used samples prepared in Parasitology institute of AS CR from a collection of isolated DNA containing also samples from various domestic birds. These DNA samples served as template in PCR.

Of the aforementioned samples, 20 (6 from hens, 11 from ducks and 3 from pigeons) were analysed by nested PCR, 11 (3 from hens and 8 from ducks) of them also with classical PCR.

The results of PCR were checked by electrophoretic gel and chosen amplicons were sequenced. All reactions based on duck samples resulted in positive band on electrophoretic gels, as well as one third of those based on hen samples. However, sequencing of four PCR products has shown that only one sequence belonged to *Blastocystis*, the other three were either from different organisms (*Eimeria* and a Nematode) or their quality was too low to decide on their origin. The results of nested-PCR were quite similar (100% of „positive“ bands), only 4 of 7 sequenced products were shown to originate from *Blastocystis* (one sample from pigeon and three duck samples), one sequence originated from *Eimeria*, two sequences were not readable in a sufficient quality.

Nested-PCR is probably more sensitive than classical PCR. Sadly, both PCR

methods were not 100% specific with the primers we used. Both amplified also DNA of other organisms.

The obtained SSU rDNA sequences of four *Blastocystis* strains were phylogenetically analysed and were assigned to the subtype 7.

8. 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) ABE N. (2004). Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Veterinary Parasitology*, 120: 235-242.
- 4) 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*, 2: 771-778.
- 5) ELWAKIL H.S., HEWEDI I. H. (2010). Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitology Research*, 107: 685-689.
- 6) EROGLU F., KOLTAS I. S. (2010). Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitology Research*, 107: 841-845.
- 7) 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.
- 8) HAUSMANN K., HÜLSMANN N. (2003): Protozoologie. 1. vyd. Praha, Academia, 347 s.
- 9) HOEVERS J.D. and SNOWDEN K.F. (2005). Analysis of the ITS region and partial ssu and isu rRNA genes of *Blastocystis* and *Proteromonas lacertae*. *Parasitology*, 131:

187-196.

10) CHEN X.Q., SINGH M., HO L.C., TAN S.W., NG G.C. (1997). Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. *Parasitology Research*, 83: 313-318.

11) JÍROVEC O. et al. (1977): *Parasitologie pro lékaře*. 3. vyd. Praha, Avicenum, 798 s.

12) JONES M.S., WHIPPS C.M., GANAC R.D., HUDSON N.R., 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.

13) KANEDA Y., HORIKI N., CHENG X.I., FUJITA Y., MARUYAMA M. and TACHIBANA H. (2001). Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 65: 393-396.

14) KHALIFA A.M. (1999). Diagnosis of *Blastocystis hominis* by different staining techniques. *Journal of the Egyptian Society Parasitology*, 29: 157-165.

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., THOMPSON 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) LÝSEK H., HEJTMÁNKOVÁ N. (1984): *Základy biologie parazitů*. 1. vyd. Olomouc, RUP Olomouc, 161 s.

18) MEDLIN L., ELWOOD, H.J., STICKEL, S. and SOGIN, M.L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71: 491–499.

- 19) MOE K.T., SINGH M., HOWE J., HO L.C., TAN S.W., CHEN X.Q., YAP E.H. (1999). Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Research*, 85: 103-108.
- 20) PAGE R.D.M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- 21) PARKAR U., TRAUB R.J., VITALI S., ELLIOT A., LEVECKE B., ROBERTSON I., GEURDEN T., STEELE J., DRAKE B., THOMPSON R.C.A. (2010). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*, 169: 8-17.
- 22) PERÉZ-CORDÓN, G., ROSALES, M. J., DEL MAR GAVIRA, M., VALDEZ, R. A., VARGASY, F., CÓRDOVA, O. (2007). Finding of *Blastocystis* sp. in bivalves of the genus *Donax*. *Revista Peruana de Biología*, 2: 301-302.
- 23) PERKINS S. (2010). *Blastocystis hominis*. [online]. [cit. 3.2.2011]. Dostupný z WWW: <http://dailyparasite.blog.com/2010/12/december-15-blastocystis-hominis.html>
- 24) REBANOVÁ V. (1998): Protozoologie. 1. vyd. České Budějovice, JU ZF, 141 s.
- 25) RYŠAVÝ B., ČERNÁ Ž., CHALUPSKÝ J., ORSÁGH, I., VOJTEK J. (1989): Základy parazitologie. Praha, SPN, 215 s.
- 26) SANGER F.S., NICKLEN S. and COULSON A.E. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74: 5463-5467
- 27) SCICLUNA S.M., TAWARI B. and Clark C.G. DNA Barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157: 77-85.
- 28) SILBERMAN J.D., SOGIN M.L., LEIPE D.D., CLARK C.G. (1996). Human parasite finds taxonomic home. *Nature*, 380: 398.

- 29) SINGH M., HO L.C., YAP A.L.L., NG G.C., TAN S.W., MOE K.T., YAP E.H. (1996). Axenic culture of reptilian *Blastocystis* isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitol Research*, 82: 165-169.
- 30) SOHAIL M.R., FISCHER P.R. (2005). *Blastocystis hominis* and travelers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 3: 33-38.
- 31) SOUPPART L., SANCIU G., CIAN A., WAWRZYNIAK I., DELBAC F., CAPRON M., DEI-CAS E., BOOROM K., DELHAES L., VISCOGLIOSI E. (2009). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolate in France. *Parasitology Research*, 105: 413-421.
- 32) STAMATAKIS A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum likeli-hood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 21: 2688–2690.
- 33) STECHMAN A., HAMBLIN K., PÉREZ-BROCAL V., GASTON D., RICHMOND G.S., VAN DER GIEZEN M., GRAHAM CLARK C., ROGER A.J. (2008). Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current Biology*, 18: 580-585.
- 34) STEJSKAL F. (2005). Améboza střevní a extraintestinální, ostatní střevní protozoa. [online]. [cit. 3.2.2011]. Dostupný z WWW: med.mum.cz/~mpesl/trafficjam/infekcni/amebosa.pdf
- 35) STENZEL D.J. and BOREHAM P.F.L. (1996). *Blastocystis hominis* Revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 9: 563-584.
- 36) STENZEL D.J., LEE M.G., BOREHAM P.F.L. (1996). Morphological differences in *Blastocystis* cyst - an indication of different species. *Parasitology Research*, 83: 452-457.
- 37) STENSVOLD C.R., BRILLOWSKA-DABROWSKA A., NIELSEN H.V. and ARENDRUP M.C. (2006). Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool

specimens by using polymerase chain reaction. *The Journal of Parasitology*, 92: 1081-1087.

38) STENSVOLD C.R., ARENDRUP M.C., JESPERGAARD C., MØLBAK K., NIELSEN H.V. (2007). Detection *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59: 303-307.

39) STENSVOLD C.R., SURESH K., TAN K.S.W., THOMPSON R.C A., TRAUB R.J., VISCOGLIOSI E., YOSHIKAWA H. and CLARK G. (2007). Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *TRENDS in Parasitology*, 23: 93-96.

40) 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.

41) SUKTHANA Y. (2001). Is *Blastocystis hominis* a human pathogenic protozoan? *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 24: 16-22.

42) SURESH K.G., ANUAR A.K. (2002). Multiple reproductive processin *Blastocystis*. *Trends in Parasitology*, 18: 528.

43) SWOFFORD D.L. (2003). PAUP *. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

44) TAN H.K. and ZIERDT C.H. (1973). Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde Parasitology Research*, 42: 315-324.

45) TAN K.S.W., SINGH M., YAP E.H. (2002). Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal of Parasitology*, 32: 789-804.

46) TAN K.S.W. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: new insights using

modern methodologies. *Veterinary Parasitology*, 126: 121-144.

47) TAN K.S.W. (2008). New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 639-665.

48) TAN T.C., ONG S.C., SURESH K.G. (2009). Genetic variability of *Blastocystis* sp. Isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitology Research*, 105: 1283-1286.

49) TAN K.S.W, MIRZA H., TEO J.D.W., WU B., MACARY P.A. (2010). Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Current Infectious Disease Reports*, 12: 28-35.

50) TANIZAKI A., YOSHIKAWA H., IWATANI S. and KIMATA I. (2005). Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. *Parasitology Research*, 96: 57-61.

51) TERMMATHURAPOJ S., LEELAYOOVA S., AIMPUN P., THATHAISONG U., NIMMANON T., TAAMASRI P., MUNGTHIN M. (2004). The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Research*, 93: 445-447.

52) VDOVENKO A.A. (2000). *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitology Research*, 86: 8-10.

53) VILLAR J., CARBAJAL J.A., LANUZA M.D., NAVARRO M.R., BORRÁS R. (1999). Identification of surface proteins of trophic and cyst forms of *Blastocystis hominis* by biotin labeling. *Folia Parasitologica*, 46: 103-106.

54) VOLF P., HORÁK P. et al. (2007): Paraziti a jejich biologie. 1. vyd. Praha, Triton, 318 s.

55) YIMING, Y., SHUILIAN, S., RIYONG, L., HUA, L., JINHUA, Y., XIAOBO, L., XIAOTING, L., GUIFENG, C. (2006). Genetic variability of *Blastocystis hominis*

isolates in China. *Parasitology Research*, 99: 597-601.

56) YOSHIKAWA H., NAGANO I., YAP E.H., SINGH M. and TAKAHASHI Y. (1996). 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.

57) YOSHIKAWA H., MORIMOTO K., NAGASHIMA M., MIYAMOTO N. (2004). A survey of *Blastocystis* infection in anuran and urodele amphibians. *Veterinary Parasitology*, 122: 91-102.

58) YOSHIKAWA H., WU Z., HOWE J., HASHIMOTO T., NG G.C. and TAN K.S.W. (2007). Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54: 33-37.

59) 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 monkey in Kathmandu, Nepal. *Veterinary Parasitology*, 160: 295-300.

60) ZAMAN V., HOWE J., NG M. (1997). Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 83: 306-308.

61) ZAMAN V., HOWE J., NG M. (1997). Observations on the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 83: 731-733.

62) WINDSOR J.J., MACFERLANE L., HUGHES-THAPA G., JONES S.K.A., WHITESIDE T.M. (2002). Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *Britain Journal Biomedicine*, 59: 154-157.