

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Axenizace buněk střevního prvoka rodu
Blastocystis

Bakalářská práce

Zuzana Lhotská

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, PhD.

České Budějovice 2016

Lhotská Z., (2016): Axenizace buněk střevního prvoka rodu *Blastocystis* [Axenization of intestinal protist of the genus *Blastocystis*. Bc. Thesis, in Czech] – 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Axenization of gut protist, *Blastocystis* ST1, was performed using two different approaches: (i) traditional cultivation methods, and (ii) sorting of the cells from xenic cultivation by cell sorter. In later case, we tested if *Blastocystis* cell population is possible to separate from bacterial one using flow cytometry analyses as first. Further, a suitability of two media for xenic cultivation of *Blastocystis* for purposes of above mentioned experiments were tested. Based on our results, we revealed that the best option for obtaining of clean suspension of ST1 cell is using cell sorter.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis.....

Poděkování

Tímto bych chtěla velmi poděkovat především své školitelce Kateřině Jirků za cenné rady a zkušenosti, neskonalou trpělivost a pomoc při zpracování této bakalářské práce. Mé díky patří také celému kolektivu Laboratoře parazitární terapie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v.v.i. za vstřícné a přátelské prostředí, rovněž také Laboratoři veterinární a medicínské protistologie za umožnění přístupu do jejich laboratoří.

V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat Janu Svobodovi za pomoc při optimalizaci a vyhodnocování některých použitých metod.

Mimořádné díky patří také mé rodině a Martinovi za cenné rady a velkou podporu.

Obsah

I Úvod	1
1.1 Životní cyklus prvoka <i>Blastocystis</i>	1
1.2 Morfologie <i>Blastocystis</i>	2
1.2.1 Vakuolární forma	2
1.2.2 Granulární forma	2
1.2.3 Améboidní forma.....	3
1.2.4 Stádium cysty.....	3
1.2.5 Ostatní morfologické formy	4
1.3 Buněčná struktura	4
1.4 Genetická diverzita a hostitelská specifita prvoka <i>Blastocystis</i>	4
1.4.1 Subtypy blastocyst.....	5
1.4.2 Subtypy vyskytující se u teplokrevných obratlovců.....	5
1.4.3 Subtypy vyskytující se u studenokrevných obratlovců a bezobratlých.....	5
1.5. Role <i>Blastocystis</i> ve střevním ekosystému člověka	6
1.6 Diagnostika blastocyst	7
1.7 Kultivace blastocyst	8
1.7.1 Xenické kultivace	8
1.7.2 Axenická kultivace	9
II Cíle práce	11
III Materiál a metodika	12
3.1 Kultivace <i>Blastocystis</i>	12
3.2 Příprava kultivačních médií a jejich složení	12
3.4 Způsoby xenické kultivace	15
3.5 Testování xenické kultivace pro přípravu viabilních ST1 buněk.....	16
3.6 Metody axenické kultivace	17

IV Výsledky	21
4.1 <i>Kultivace xenických a axenických kultur ST1</i>	21
4.1.1 Xenická kultivace	21
4.1.1.1 <i>Vyhodnocení vhodnosti médií pro přípravu buněk pro axenizaci</i>	21
4.1.2 Axenická kultivace	23
4.1.2.1 Axenizace 1: Jonesovo médium – pevné TYM médium.....	23
4.1.2.3 Axenizace 3: Dobell-Leidlaw médium/růstové médium – pevné TYM médium	24
4.1.2.4 Získávání axenické suspenze buněk ST1 s využitím „cell sorter“	24
4.2 <i>Snižování populace bakterií</i>	25
V Diskuze	31
VI Závěr	39
VII Seznam použité literatury:	40

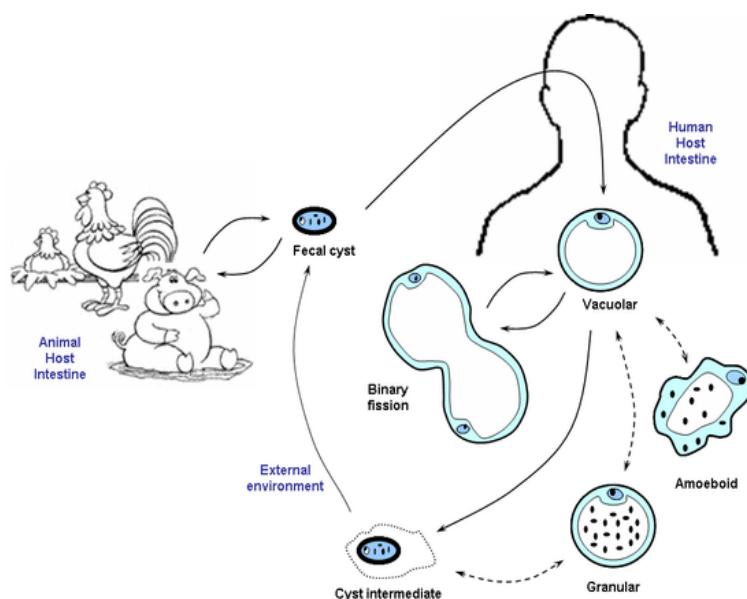
I Úvod

Blastocystis je anaerobní prvek fylogeneticky se řadící do skupiny *Stramenopiles*. První zástupci tohoto prvoka byli objeveni na počátku 20. století (Brumpt 1912), ale objektem velkého množství nejrůznějších studií se stali až v posledních letech. Stále jsou však obklopeni celou řadou nejasností. *Blastocystis* se běžně nachází v zažívacím traktu u lidí, ale i dalších obratlovců (Scanlan, 2012), byl objeven také u některých bezobratlých (Zaman et al., 1993). Dodnes je známo 17 subtypů (ST1-ST17), z nichž prvních devět se nachází i u lidí (Alfellani et al., 2013).

1.1 Životní cyklus prvoka *Blastocystis*

Všechny aspekty životního cyklu blastocyst stále ještě nejsou uspokojivě zodpovězeny, hlavně díky malému počtu vhodných zvířecích modelů (Tan et al., 2002). Za přenos blastocyst je zodpovědné stádium cysty, které se po vniknutí do vhodného hostitele (fekálně-orální cestou) přemění na vegetativní formu. V zažívacím traktu tedy dochází k uvolnění vakuolárních forem, které se dále mohou přeměnit na další morfologické formy (Moe et al., 1997). Mnozí autoři pozorovali různé typy rozmnožování, jako je binární dělení, pučení, mnohonásobné dělení a dále například schizogonii, nejčastěji je však u vakuolárních forem pozorováno binární dělení (např. Zhang et al., 2007). Na obrázku 1 je znázorněn životní cyklus *Blastocystis* u člověka.

Obr 1. Životní cyklus *Blastocystis* u člověka (Tan, 2004).



1.2 Morfologie *Blastocystis*

Blastocystis je polymorfní prvok, u něhož byly popsány čtyři základní morfologické typy buněk: vakuolární, granulární, améboidní a stádium cysty (Clark et al., 2013). Více buněčných forem se dokonce objevuje v rámci jedné kultury a může být tedy obtížné určit, o jaký morfologický typ se jedná (Tan, 2008).

1.2.1 Vakuolární forma

Vakuolární forma blastocyst je stádium vyskytující se v lumen střeva a také v *in vitro* kulturách (např. Zhang et al., 2012). Tyto formy jsou kulaté a mohou se velmi lišit svou velikostí, která se většinou pohybuje v rozmezí od 2 – 200 μm (Stenzel & Boreham, 1996). Typickým znakem je velká centrální vakuola, která vyplňuje téměř celý prostor buňky a vytlačuje cytoplazmu a organely na periferii buňky. Buňky jsou mnohobuněčné a jádra jsou mikroskopicky viditelná právě na periferii (MacPherson & MacQueen, 1994). Většina autorů se shoduje, že vakuoly mají zásobní funkci a v některých studiích bylo také prokázáno, že hrají důležitou roli v programované buněčné smrti organismu (Nasirudeen et al., 2001).

1.2.2 Granulární forma

Granulární forma buněk má řadu morfologických podobností s vakuolární formou, ale navíc obsahuje drobné heterogenní granule, které se nachází v centrální vakuole nebo v tenkém pásu periferní cytoplazmy (Tan et al., 2002). Podle studií, které zkoumaly tyto heterogenní granule elektronovým mikroskopem, existují tři typy granulí: metabolické, reprodukční a lipidové (Parija & Jeremiah, 2013). Velikost tohoto morfologického typu je podobná jako u zástupců vakuolární formy, a to mezi 6 až 20 μm (Dunn et al. 1989), výjimečně však byli naměřeni i zástupci o velikosti až 80 μm (Parija & Jeremiah, 2013). Granulární typ buněk pravděpodobně vzniká za nepříznivých životních podmínek z vakuolární formy, což potvrdila nedávná studie (Zhang et al., 2012). Častěji se vyskytuje ve starších nebo axenizovaných kulturách, kde je růst nežádoucích bakterií potlačen antibiotiky (Tan, 2008).

1.2.3 Améboidní forma

S améboidním morfologickým typem se lze setkat spíše zřídka a morfologický popis není jednoznačný, protože se jeho popis se v jednotlivých studiích liší. Tento typ blastocystových buněk byl pozorován ve starších kulturách, v kulturách ošetřených antibiotiky nebo přímo ve vzorcích stolice (Zierdt, 1973). Velikost těchto buněk se nejčastěji pohybuje v rozmezí 5 - 50 μm (Tan & Suresh, 2006). Améboidní typ buněk se vyznačuje nepravidelným tvarem a často se zde vyskytuje jedna nebo dvě velké pseudopodie, které slouží s největší pravděpodobností k fagocytóze (Tan et al., 2002). Na povrchu i uvnitř těchto buněk jsou často nalézány bakterie. Pohlcené bakterie se objevovaly v útvarech podobných lysozomům (Tan et al., 2002).

Byly pozorovány dva typy buněk améboidních forem. První typ obsahuje v cytoplazmě mnoho menších vakuol, zatímco druhý typ je charakteristický přítomností velké centrální vakuoly, ve které jsou obsaženy elektrondenzní granule. Vzhledem k morfologii těchto dvou typů se předpokládá, že by améboidní formy mohly vznikat z vakuolárních buněk (Tan & Suresh, 2006). Tento morfologický typ buněk je někdy spojován s patogenitou rodu *Blastocystis*. Ve zvýšené míře se totiž vyskytuje v *in vitro* kulturách pocházejících od pacientů, kteří vykazují klinické symptomy spojené s přítomností blastocyst ve střevě (Rajamanikam & Govind, 2013).

1.2.4 Stádium cysty

Jedná se o nejmenší morfologický typ blastocyst, jehož velikost se pohybuje v rozmezí 3 – 5 μm . Díky své malé velikosti mohou být lehce zaměněny s jinými organismy (např. kvasinkami) nebo různými artefakty (Tan et al., 2002). Cysty jsou extrémně odolná silnostěnná stádia, která umožňují přežití blastocyst ve vnějším prostředí a umožňují jejich přenos mezi hostiteli (Clark et al., 2013). Silná stěna cyst je složena z více vrstev a bývá silná 50 až 100 nm. Někdy může být tato stěna cyst pokryta povrchovým fibrilárním pláštěm, který je dobře patrný při použití mikroskopie s fázovým kontrastem a jeví se jako nahnědlá vrstva (Moe et al., 1996).

Cysty mají variabilní tvar, ale nejčastěji jsou oválné nebo kulaté. Cytoplazma může obsahovat jedno až čtyři jádra, další organely (např. mitochondrie) a malé vakuoly (Tan, 2008). Jsou rozlišovány dva základní typy cyst. Tenkostěnné cysty, které se vyskytují ve střevě hostitele a dále tlustostěnné cysty zodpovědné za přenos a nákazu z prostředí (Singh

et al., 1995). K nákaze dochází fekálně-orální cestou a také přímým kontaktem mezi hostiteli nebo kontaminovaným zdrojem vody (Nagel et al., 2014). Cysty údajně přežijí při normální teplotě ve vodě téměř tři týdny, ale jsou citlivé k extrémním teplotám a k běžným dezinfekčním prostředkům (Tan & Nasirudeen, 2005). Také jsou poměrně náchylné na vysušení (Moe et al., 1996).

1.2.5 Ostatní morfologické formy

Kromě již zmíněných základních morfologických forem blastocyst existují ještě další dvě, s kterými setkáváme zřídka, nebo mnohdy unikají naší pozornosti. Je to avakuolární a multivakuolární typ (Parija & Jeremiah, 2013). Multivakuolární buňky obsahují několik navzájem propojených vakuol různé velikosti, zatímco avakuolární postrádají centrální vakuolu. Obvykle obsahují jedno, výjimečně dvě jádra. U avakuolárních buněk jsou tato jádra větší, než u všech ostatních morfologických typů. Průměrná velikost multivakuolárních buněk se pohybuje mezi 5 – 8 μm , zatímco avakuolární buňky bývají menší, kolem 5 μm (Tan et al., 2002).

1.3 Buněčná struktura

Buňky blastocyst obsahují tyto organely: Golgiho komplex, několik jader, endoplazmatické retikulum a mitochondrie s tubulárními kristami (např. Tan et al., 2002). Golgiho komplex je obvykle lokalizován v blízkosti jádra. Blastocysty mohou mít různý počet jader, která jsou uložena na periferii, endoplazmatické retikulum a mitochondrie s tubulárními kristami (např. Tan et al., 2002). Přítomnost těchto mitochondrií je u anaerobního prvoka neobvyklá, podle autorů jedné ze studií se jedná o anaerobní derivát mitochondrie, který vznikl jako adaptace na život bez přítomnosti kyslíku (Stechmann et al., 2008).

1.4 Genetická diverzita a hostitelská specifita prvoka *Blastocystis*

Díky fylogenetickým analýzám založených na porovnávání malé ribozomální podjednotky (18S rRNA) bylo zjištěno, že *Blastocystis* patří do skupiny Stramenopiles (např. Rivera, 2008). Dříve se předpokládalo, že blastocysty mají úzkou hostitelskou specifitu vázanou na daného hostitele (např. Rivera, 2008). Později s odhalením spektra subtypů (např. Rivera, 2008) bylo zjištěno, že hostitelská specifita je široká, tzn., že jednotlivé subtypy byly nalezeny u více hostitelů (Clark et al., 2013). Jednotlivé druhy blastocyst byly v minulosti

nazývány podle druhu hostitele, u kterého se nacházely – například *Blastocystis hominis*, který byl nalézán u lidí, ale dnes už se od tohoto způsobu nomenklatury upustilo (Stensvold et al., 2007).

1.4.1 Subtypy blastocyst

Dodnes bylo popsáno 17 subtypů - ST1-ST17. Prvních devět subtypů bylo popsáno u člověka. Pravděpodobné je, že budou v budoucnu objevovány nové subtypy (Alfellani et al., 2013). Jednotlivé subtypy není možné na základě morfologie odlišit, proto je pro rozlišení subtypů je nezbytné použít molekulární metody (Clark et al., 2013).

1.4.2 Subtypy vyskytující se u teplokrevných obratlovců

U lidí se vyskytují nejčastěji první čtyři subtypy blastocyst, a to ST1- ST4, další ST5-ST9 jsou nacházeny spíše zřídka a jsou nejspíš výsledkem zoonotického přenosu (Alfellani et al., 2014). Subtyp ST3 je nejčastěji detekován u člověka a podle některých studií je považován za původně lidský subtyp (Wong et al., 2007). Druhým nejčastěji nacházeným subtypem u člověka je ST1 (Stensvold et al., 2009).

Blastocysty jsou nalézány u celé řady dalších teplokrevných obratlovců. U hospodářských zvířat, jako jsou prasata, ovce a skot se často vyskytuje subtyp ST5, byl také popisován u velbloudů (Stensvold et al., 2009). U ptáků bývá rozšířen subtyp ST6 a ST7; subtypy ST8 a ST9 se ve vyšší míře vyskytují u primátů a (Stensvold et al., 2009; Clark et al., 2013). Blastocysty byly nalezeny i u řady zvířat chovaných v zoologických zahradách (např. Stensvold et al., 2009). V nedávné době byl detekován subtyp ST11 u slonů, ST12 u žiraf, ST13 u klokanů a subtyp ST15 se ve větší míře vyskytoval u gibbonů a některých druhů velbloudů (Parkar et al., 2010; Alfellani et al., 2013).

1.4.3 Subtypy vyskytující se u studenokrevných obratlovců a bezobratlých

Variabilita jednotlivých subtypů pocházejících se studenokrevných obratlovců není zatím tak dobře prozkoumaná, většina studií se totiž soustředí hlavně na teplokrevné obratlovce a tato skupina je často opomíjena. Blastocysty byly objeveny u některých druhů hadů, želv a leguánů (např. Noel & Dufernez, 2005). Před nedávnou dobou Lorencová (2014) definovala dokonce 21 nových subtypů pocházejících ze studenokrevných obratlovců a členovců, mezi

něž patřili například hadi, ještěři, želvy a mnohonožky. U bezobratlých živočichů byly blastocysty popsány také u švábů (Zaman et al., 1993).

1.5. Role *Blastocystis* ve střevním ekosystému člověka

Otázka role *Blastocystis* ve střevním ekosystému člověka dosud nebyla uspokojivě zodpovězena a je tématem mnoha studií (např. Leder et al., 2005; Olivo-Diaz et al., 2012). Některé klinické a epidemiologické studie považují *Blastocystis* za potenciální patogen (např. Poirier et al., 2012) jinde je zastáván názor, že jsou blastocysty výhradně komenzálové (např. Petersen et al., 2013; Scanlan & Stensvold, 2013).

Klinické příznaky, které byly u pacientů pozitivních na *Blastocystis* popsány, jsou nespecifické a zahrnují nevolnost, anorexii, bolesti v břišní oblasti, nadýmání, plynatost a akutní nebo chronický průjem (Tan, 2008). Přítomnost blastocyst je často spojován s etiologií střevních onemocnění, jako je syndrom dráždivého tračníku [IBS] (Poirier et al., 2012). Jedná se o funkční gastrointestinální poruchu charakterizovanou bolestmi břicha nebo bolestí související se změnou činnosti střev, která postihuje 5-24% lidí ve vyspělých zemích (Poirier et al., 2012). K dalším možným příznakům, které mohou pociťovat pacienti pozitivní na blastocysty, patří například různé kožní projevy, jako je kopřivka s akutním či chronickým průběhem (Hameed et al., 2011). Blastocysty se také častěji vyskytují u lidí pozitivních na HIV (Prasad et al., 2000).

Některé studie uvádí, že jednotlivé subtypy se pravděpodobně liší svojí patogenitou (Hussein et al., 2008). Důkazem je subtyp ST3, který byl v této studii nejčastěji izolovaný u pacientů s různými gastrointestinálními poruchami. Navíc u některých subtypů nebyla jejich patogenita ujasněna, jako je např. ST1, který je v některých studiích popisován jako patogen (např. Poirier et al., 2012) a v některých pouze jako komenzál (např. Scanlan & Stensvold, 2013). Jako hlavní faktor zodpovědný za patogenitu blastocyst jsou považovány proteázy blastocyst (Mirza & Tan, 2009). Ukázalo se, že tyto proteázy jsou schopné degradovat imunoglobulin A (IgA), což vede ke schopnosti parazita mít vyšší virulenci, změně imunologické reakce a narušení bariérové funkce (Rajamanikam & Govind, 2013). Autoři této studie se pokoušeli objasnit, zda existuje vztah mezi zastoupením amébových forem, které se ve zvýšené míře vyskytovaly v *in vitro* kulturách symptomatických izolátů v porovnání s asymptomatickými izoláty a aktivitou proteázy. Symptomatické izoláty s

amébovými formami ukázaly významně vyšší aktivitu proteázy než asymptomatické izoláty (Rajamanikam & Govind, 2013).

Vysoká prevalence různých subtypů *Blastocystis* u asymptomatických hostitelů může naznačovat, že ne všichni lidé jsou náchylní na onemocnění, dokonce i když jsou infikováni potenciálně virulentním agens, nebo že ne všechny subtypy jsou patogenní. (Scanlan & Stensvold 2013). Leder et al., (2005) ve své studii nezaznamenali žádný významný rozdíl v podílu vzorků pozitivních na *Blastocystis* mezi symptomatickými a asymptomatickými pacienty. Zajímavé ale je, že pozitivní vzorky v této studii se častěji vyskytovaly u mužů a také byly častější u mladých lidí do 16 let. Výskyt a distribuce specifických genotypů *Blastocystis* u zdravých jedinců jsou až na výjimky prakticky neznámé. V nedávné studii se zaměřovali na diverzitu eukaryot u zdravých jedinců a mimo jiné ukázaly různé subtypy *Blastocystis* časovou stálost (do 3 let), což naznačuje, že jsou u některých jedinců stabilní součástí zdravého střevního traktu (Scanlan, 2012).

Vzhledem ke kontroverzním faktům o blastocystách se zdá být nepravděpodobné, že hraje významnou roli v IBS. Přítomnost blastocyst ve stolicích pacientů s IBS nemusí nutně znamenat, že jsou příznaky způsobené tímto organismem, měly by být prověřeny i jiné infekční a neinfekční příčiny (Stark et al., 2007). V poslední době se spíše objevují studie, ve kterých jsou blastocysty pokládány za stabilní součást zdravé lidské střevní mikroflóry, a autoři těchto studií naznačují, že by tento prvok naopak mohl být člověku prospěšný (Scanlan & Stensvold, 2014). Důvodů je hned několik. Různé subtypy blastocyst se s vysokou prevalencí vyskytují u zdravých jedinců bez klinických příznaků, v porovnání s pacienty postiženými střevním zánětlivým onemocněním (Petersen et al., 2013; Parfrey et al., 2014; Scanlan & Stensvold, 2013). V těchto uvedených studiích se objevil i názor, že přítomnost blastocyst u zdravých jedinců nějakým způsobem souvisí s optimálním složením střevního mikrobiomu (Scanlan & Stensvold, 2013).

1.6 Diagnostika blastocyst

Pro detekci tohoto prvoka se využívá mnoho diagnostických metod, které jsou více či méně účinné. Diagnostika blastocyst není vždy snadná, může docházet k záměnám s kvasinkami, nebo s cystami dalšími střevními prvoky (např. *Enteromonas* nebo *Chilomastix*) či s tukovými kapénkami (např. Tan, 2008). Vždy je navíc třeba zkoumat více vzorků, protože cysty blastocyst mohou být vylučovány intermitentně (např. Tan, 2008). Doporučuje se

odebírat vzorky alespoň tři po sobě následující dny, aby byla zajištěna co nejvyšší záchytnost prvoka. Vzorky by navíc měly být co nejčerstvější.

K diagnostice blastocyst je nejčastěji používána přímá mikroskopie vzorků, která je obvykle kombinována se sedimentačními metodami či barvenými roztěry trusu (např. Roberts et al., 2011). Pro tyto účely je doporučováno barvení Gomoriho trichromem, pomocí safranin-methylové modři nebo také železitým hematoxylinem (Hazen, 1993; MacPherson & MacQueen, 1994; Khalifa, 1999). Vysoce senzitivní metodou pro diagnostiku blastocyst se ukázala být xenická kultivace s využitím Jonesova či Dobell-Ledlaw médií (např. Suresh & Smith, 2004). Nicméně nejspolehlivější detekce blastocyst je s využitím molekulárních metod, konkrétně PCR nebo real-time (Roberts et al., 2011). V literatuře se také udává, že infekce blastocystami vede k produkci IgA (imunoglobulin A) a IgG protilátek. Tato skutečnost může být využita pro různé serologické metody (např. Tan, 2008).

1.7 Kultivace blastocyst

Pro výzkum *Blastocystis* jsou důležité *in vitro* kultury, které slouží jako pro diagnostiku nebo pro rozrůstání buněk, zejména vakuolárních forem, potřebných k dalším analýzám. Existují tři základní typy kultur: (i) xenická, kde prvoci rostou v přítomnosti nedefinované mikroflóry, (ii) monoxenická kultura, ve které je parazit pěstován v přítomnosti jednoho dalšího definovaného mikroorganismu, a (iii) posledním typem je axenická kultivace, kde daný organismus roste bez přítomnosti jakýchkoliv kontaminujících mikroorganismů (Clark & Diamond, 2002). V literatuře se někdy můžeme setkat ještě s termínem polyxenická kultura, často je mylně považován za synonymum kultury xenické. Jedná se však o kulturu, ve které prvok roste v přítomnosti několika dalších přesně definovaných mikroorganismů (Clark & Diamond, 2002).

1.7.1 Xenické kultivace

První zmínka o xenické kultivaci blastocyst pochází už z roku 1921, kdy je poprvé kultivoval Barrett (Barrett, 1921). V současnosti je používáno celé spektrum médií, které jsou pro kultivaci tohoto prvoka vhodné. Nejběžněji používaným je Jonesovo médium, které vyvinul Jones v roce 1946. Později bylo toto médium různě modifikováno (Suresh & Smith, 2004; Leelayoova et al., 2002). Používá se hlavně jako diagnostické médium a blastocysty v něm obvykle nejsou dlouhodobě udržovány.

K dalším vhodným médiím se řadí také dvoufázové Dobell-Laidlaw médium (Dobell a Laidlaw, 1926) a Loeffler médium (Stenzel a Boreham 1996). V literatuře je často popisované také Iscove's modified Dulbecco's medium [IMDM] obohacené o 10 % koňského séra (Ho, 1993) a dvousložkové „Drbohlav Locke egg serum medium“ [LE] (Boeck & Drbohlav, 1925). V neposlední řadě jsou pro kultivaci blastocyst vhodná ještě tato média: Robinson médium, které je velmi komplexní a našlo využití i pro kultivaci dalších střevních mikroorganismů (například améb), a také Diamond TYSGM-9 médium (Clark & Diamond, 2002). Někteří autoři pro růst tohoto prvoka používají také komerčně vyráběné „Roswell Park Memorial Institute medium“ [RPMI], které obsahuje velké množství fosfátu (Zhang et al., 2012).

1.7.2 Axenická kultivace

Pro studium tohoto prvoka jsou mnohem přínosnější axenické kultury, kde jsou kontaminující bakterie nebo kvasinky eliminovány různými druhy antibiotik a je tedy možné získat čisté buňky blastocyst. První zmínky o axenické kultivaci pocházejí z roku 1974, kdy autoři Zierdt & Williams poprvé úspěšně axenizovali buňky *Blastocystis* v LE médiu (Zierdt & Williams, 1974). Pro axenickou kultivaci *Blastocystis* jsou v literatuře uváděna nejčastěji dvě kultivační média. Prvním je LE médium, které poprvé použili Zierdt a Williams (1974). Dalším nejpoužívanějším médiem je IMDM médium. Poprvé jej popsali autoři Ho et al. (1993) a v současné době je velmi hojně využívaným kultivačním médiem (Clark & Diamond, 2002). Někteří vědci také zaznamenali úspěšnou axenizaci blastocyst izolovaných z plazů pomocí diferenciální centrifugace v kombinaci s antibiotiky (Teow et al., 1992). Účinným přístupem se zdá být také použití mikromanipulace s buňkami blastocyst, kterou použili Hess et al. (2006). Tento přístup aplikovali na izoláty pocházející z krocana a získali klonální populace blastocyst. Lanuza et al. (1996) popsal modifikovanou metodu pro axenizaci blastocyst a to využitím kombinace „ficoll-metrozoic“ kyselinového gradientu a přidání antibiotik. Blastocysty jsou schopné i růstu na pevných agarových půdách, kde vytvářejí kolonie podobné bakteriálním koloniím (Ng & Tan, 1999; Tan et al., 2000). Proto jeden z přístupů axenizace blastocyst využívá jejich kultivace na pevném TYM médiu v anaerobní atmosféře (Lorencová, 2014) modifikovaném dle Diamond (1957). Chen et al. (1997) ve své práci popisuje úspěšnou axenickou kultivaci, kdy blastocysty pocházející z potkanů rostly v koloniích na agaru obohaceném o antibiotika. Pro podpoření anaerobní atmosféry zde také používali thioglykolát.

Pro axenizaci blastocyst je nezbytné splnění několika podmínek, jako jsou (i) vhodné složení média, které musí být dostatečně výživné. V kultivačních médiích je pro tyto účely často využíváno koňské sérum, tryptikáza, kvasničný autolyzát a další látky (např. Clark & Diamond, 2002), (ii) teplotu, u savčích subtypů blastocyst je doporučována teplota 37°C na rozdíl u subtypů od poikilothermních obratlovců, jejichž izoláty jsou kultivovány při teplotách nižších (Lorencová, 2014), a (iii) anaerobní podmínky, které jsou většinou simulovány použitím CO₂ termostatů nebo chemikáliemi, které vytváří CO₂ (například využitím přípravku Anaerocult® A Mini od firmy Merck Millipore, který jsme používali v naší studii). K podpoře anaerobní atmosféry může být použit i thioglykolát (Chen et al., 1997).

Přestože je axenizace pro studium velice důležitá, často je celý proces časově náročný a ne vždy zcela úspěšný. Bylo zjištěno, že blastocysty začaly po odstranění bakterií postupně odumírat (Zierdt, 1991). Je tedy zřejmé, že pro přežití a růst blastocyst je bakteriální mikroflóra naprosto nezbytná. Navíc existuje možnost, že blastocysty přímo vyžadují specifické skupiny bakterií, které jsou jejich symbionty, tak jak to je popsáno u jiných prvoků.

II Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo získat čistou suspenzi buněk *Blastocystis* subtypu ST1 (dále buňky ST1) bez kontaminujících bakterií a dalších nežádoucích mikroorganismů. Tato čistá suspenze ST1 buněk bude posléze využita pro detailnější studium střevního prvoka rodu *Blastocystis*, zejména jeho vlivu na imunitní systém hostitele. Pro splnění hlavního záměru byly vytyčeny tyto dílčí cíle:

- nalézt vhodné kultivační médium pro přípravu životaschopných ST1 buněk využitelných pro axenizaci
- optimalizovat postup axenizace ST1 buněk tradičními axenizačními metodami s použitím antibiotik
- ověřit možnost získávání čisté suspenze ST1 buněk pomocí „cell sorteru“

III Materiál a metodika

3.1 Kultivace *Blastocystis*

Pro účely této práce byly využity buňky *Blastocystis* subtypu ST1 (dále bunky ST1), který jsme měli k dispozici u infikovaných experimentálních Wistar potkanů. Pro jejich kultivaci a axenizaci bylo použito více níže popsanych typů médií.

3.2 Příprava kultivačních médií a jejich složení

Pro účely této studie jsme využívali více médií popsanych níže.

3.2.1 Modifikované Jonesovo médium

Pro rozrůstání buněk ST1 z biologických vzorků byla použita kultivace v tekutém Jonesově médiu, které vyvinul Jones WR v roce 1946 (Jones, 1946). Toto médium bylo modifikováno (Leelayoova et al., 2002; Suresh & Smith, 2004). Jonesovo médium se používá zejména pro diagnostiku blastocyst ve vzorcích trusu nebo stolice získaných od hostitelů a buňky blastocyst se v něm běžně dlouhodobě neudrží.

Seznam chemikálií a jejich navážek pro přípravu Jonesova média:

- 0,946g Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich)
- 0,908g KH₂PO₄ (Lach-ner)
- 1,8g NaCl (Sigma)
- 0,23g kvasničného autolyzátu (Duchefa Biochemie)
- Inaktivované koňské sérum (Sigma)

Příprava média: Nejdříve byly připraveny základní roztoky, kdy se 0,946 g Na₂HPO₄ a 0,908 g KH₂PO₄ zvlášť rozpustilo ve 100 ml destilované vody a 1,8 g NaCl se rozpustilo ve 200 ml destilované vody. Z těchto základních roztoků bylo vždy připraveno finální médium: dané objemy z připravených roztoků (31,2 ml Na₂HPO

10,4 ml KH_2PO_4 a 187,5 ml NaCl) byly smíchány a přidalo se 0,23 g kvasničného autolyzátu. Následovala sterilizace v autoklávu při teplotě 121°C a tlaku 101,5 kPa. Po vychladnutí roztoku bylo sterilně přidáno inaktivované koňské sérum, a to 10% celkového objemu připravovaného roztoku. Nakonec bylo médium alikvótováno po 4 ml do sterilních kultivačních zkumavek o objemu 10 ml se šroubovacím závitem. Takto bylo Jonesovo médium krátkodobě uchovááno ve 4°C do jeho použití.

3.2.2 Tekuté TYM médium dle Diamond, modifikováno

Dalším typem média, které jsme v našich experimentech pro kultivaci *Blastocystis* využili, bylo tekuté TYM médium dle Diamond (1957). Toto médium bylo používáno pro axenické kultivace *Blastocystis*.

Seznam chemikálií a jejich navážek pro příprava tekutého TYM média:

- 0,4 g KH_2PO_4 (Lach-ner)
- 0,4 g K_2HPO_4 (Sigma)
- 0,1 g L-cystein (Sigma)
- 2,5 g maltosa (Amresco)
- 5 g kvasničný autolyzát (Duchefa Biochemie)
- 10 g trypton (Roth)

Příprava média: Všechny pevné složky (tj. KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , L-cystein, maltosa, kvasničný autolyzát a trypton) byly smíchány v menším objemu destilované vody, následně bylo upraveno pH pomocí koncentrovaného roztoku KOH na 7,2 a objem byl doplněn do 450 ml. Dále byl roztok autoklávován a v případě potřeby uchováán v lednici.

3.2.3 Pevné TYM médium dle Diamond, modifikováno

Složení je totožné s předchozím médiem, obsahuje ale navíc 5 g bakteriologického agaru (na celkový objem 450 ml).

Příprava média: Všechny pevné složky byly smíchány v menším objemu destilované vody (kromě agaru), následně bylo upraveno pH pomocí koncentrovaného KOH na 7,2 a objem

doplněn destilovanou vodou do 450 ml. K médiu byl přidán bakteriologický agar a roztok se sterilizoval v autoklávu. Mírně zchladlé médium bylo poté sterilně rozlito do předem sterilizovaných Petriho misek, nechalo se ztuhnout a bylo uchováváno dnem vzhůru ve 4°C do jeho použití.

3.2.4 Encystační médium dle Suresh et al. (1994), modifikováno:

Modifikované encystační médium, které jsme pro naše účely nazvali „růstové médium“ bylo připraveno na základě metody média pro účely encystace blastocyst dle studie Suresh et al. (1994). Pro naše účely, tj. pro růst buněk, byla ve složení nahrazena tryptikáza tryptonem. Buňky blastocyst se úspěšně rozrůstaly a množily. Dále bude použit název růstové médium.

Seznam chemikálií a jejich navážek pro přípravu růstového média:

- 0,16 g KH_2PO_4 (Lach-ner)
- 0,4 g NaCl (Sigma)
- 0,2 g kvasničný autolyzát (Duchefa Biochemie)
- 0,5 g trypton (Roth)
- Inaktivované koňské sérum (Sigma)

Příprava média: Všechny výše uvedené chemikálie byly smíchány a rozpuštěny v cca. 80 ml destilované vody. Následně se upravilo pH pomocí koncentrovaného roztoku KOH na 7. Nakonec byla doplněna destilovaná voda do objemu 100 ml. Po sterilizaci v autoklávu se do zchladlého média přidalo půl objemu inaktivovaného koňského séra (tzn. 50 ml).

3.2.5 Dvoufázové médium dle Dobell - Leidlaw

Posledním použitým médiem je dvoufázové Dobell-Leidlaw médium, které bylo vyvinuto autory Dobell a Laidlaw (1926). Toto médium je tvořeno tekutou a pevnou složkou.

Složení:

- **Pevná složka:** koagulované koňské sérum - 1,5 ml na 1 zkumavku
- **Tekutá složka:** Ringerův roztok - 500 ml, který je připravován z roztoků A a B, sterilně odebraný bílek - 50ml:
 - Roztok A: NaCl - 3,25 g, NaHCO₃ - 0,1 g, KCl - 0,07 g, NaH₂PO₄·H₂O - 0,005 g, destilovaná voda - 450ml
 - Roztok B: CaCl₂ ·2H₂O - 0,08 g, destilovaná voda - 50 ml

Příprava média: Koagulované koňské sérum, roztok A a B byly připravovány všechny odděleně a kombinovány před samotným použitím. Koagulované koňské sérum bylo přidáno do skleněných zkumavek a po dobu jedné hodiny koagulováno v šikmé poloze v horkovzdušném sterilizátoru při 80°C. Následně byly zkumavky ponechány 24 hodin při pokojové teplotě a poté se celý proces sterilizace opakoval, aby se minimalizovala možná kontaminace. Takto připravené zkumavky byly uchovávány ve 4°C. Ringerův roztok se skládá ze dvou roztoků, které musí být připravovány a autoklávovány odděleně, aby nedošlo k vysrážení fosfátů v přítomnosti chloridu vápenatého. Po vychladnutí byly oba roztoky smíchány a přidalo se do nich 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku. Takto připravená tekutá složka byla také uchovávána ve 4°C. Před samotným použitím byla pevná složka ve zkumavkách převrstvena 3 ml složky tekuté.

3.3 Biologický materiál pro kultivace

Pro všechny kultivace byl odebírán čerstvý trus outbredních potkanů, kteří byli infikováni *Blastocystis* ST1 pocházejícího z lidského biologického materiálu (potvrzeno kultivační a molekulární diagnostikou), z něhož byla připravována infekční dávka.

3.4 Způsoby xenické kultivace

Způsoby kultivace, tj. přenášení buněk do jednotlivých médií, jejich udržování a rozrůstání v/na na daných médiích, probíhaly rozdílně, jak je popsáno níže.

3.4.1 Kultivace blastocyst v Jonesově a růstovém médiu

Postup byl stejný pro obě média. Vzorky trusu pro kultivaci blastocyst byly odebírány od outbredních potkanů infikovaných *Blastocystis* ST1. Kultivace buněk ST1 v Jonesově médiu probíhalo při teplotě 37°C v uzavřených skleněných kultivačních zkumavkách se šroubovacím závitem, každý třetí den byla kultura přeočkována skleněnou Pasteurovou pipetou do čerstvého média (Clark & Diamond, 2002). Tato další pasáž byla opět umístěna do termostatu s teplotou 37°C. Po dalších třech dnech byla mikroskopicky zjišťována přítomnost blastocyst a hodnocena jejich kondice, životaschopnost, velikost a množství. Na základě uvedeného vyšetření byly buňky dále využity pro účely axenizace.

3.4.2 Kultivace blastocyst v Dobell-Leidlaw médiu

Počáteční kultivace a také první pasáž probíhala v tekutém Jonesově médiu, druhá pasáž byla poté přeočkována do Dobell-Leidlaw média. V tomto médiu už následné pasáže probíhaly pouze jednou týdně v anoxickém prostředí při teplotě 37°C. Jednotlivé kultury byly opět mikroskopicky hodnoceny z hlediska kondice, životaschopnosti, velikosti a množství buněk.

3.5 Testování xenické kultivace pro přípravu viabilních ST1 buněk

Xenické kultury byly hodnocené z pohledu dvou kritérií, jak je popsáno níže.

3.5.1 Měření velikosti buněk ST1 v růstovém a Jonesově médiu

Do naší práce byl zařazen experiment, jehož cílem bylo zjistit průměrné velikosti buněk ST1 v růstovém a Jonesově médiu. Z naší zkušenosti velikost vypovídala o životaschopnosti buněk. Menší ST1 buňky jsme vždy pozorovali v kulturách, kde již nebyly příznivé podmínky pro jejich růst a přežívání. Růstové médium jsme dříve ke kultivacím nepoužívali. Pro měření velikosti buněk tedy byla provedena paralelně kultivace z trusu potkanů pozitivních na ST1 v Jonesově a v růstovém médiu. V okamžiku, kdy bylo dosaženo druhé pasáže buněk, proběhlo měření jejich velikosti třetí den po přeočkování do nového média pomocí mikroskopu Olympus BX51 (software QuickPhoto). Z každého média bylo naměřeno 100 buněk.

3.5.2 Měření koncentrace buněk ST1 v růstovém a Jonesově médiu

Dalším experimentem bylo měření koncentrace buněk v Jonesově a růstovém médiu. Cíl byl obdobný, jako u předchozího experimentu zaměřeného na měření velikosti buněk.

Pro zjištění koncentrace buněk v 1 ml růstového média bylo stejným způsobem připraveno šest zkumavek Jonesova média s trusem potkanů pozitivních na ST1. Po třech dnech byly buňky přeočkovány do šesti zkumavek růstového média. Pro zjištění koncentrace buněk v 1 ml Jonesova média byl postup podobný. Jediný rozdíl byl v tom, že přeočkování proběhlo opět do Jonesova média. Od druhého dne po přeočkování buněk do čerstvého média byla měřena koncentrace buněk v růstovém a Jonesově médiu pomocí Bürkerovy komůrky. Tímto způsobem se pokračovalo každý následující den po dobu šesti dnů. Buňky byly měřeny v pěti velkých čtvercích Bürkerovy komůrky, následně byly hodnoty zpřůměrovány a výsledek vynásoben číslem 4×10^6 .

3.6 Metody axenické kultivace

Pro axenickou kultivaci byla využito několik médií popsaných výše.

3.6.1 Axenická kultivace blastocyst na pevném TYM médiu

Pro rozrůstání buněk ST1 ze vzorku trusu byla nejdříve použita kultivace v tekutém Jonesově médiu. Po třech dnech byla kultura přeočkována pomocí skleněné Pasteurovy pipety do čerstvého média. Tímto způsobem se pokračovalo do druhé pasáže, kdy už kultura obsahovala minimální množství hrubých nečistot. Narostlé kultury buněk byly poté použity pro axenickou kultivaci blastocyst na pevném TYM médiu obohaceném směsí několika antibiotik a inaktivovaného koňského séra. Na pevné TYM médium bylo nejdříve nanášeno 180 μ l směsi antibiotik (Tab 1) dle Lorencová (2014) a 150 μ l inaktivovaného koňského séra. Poté bylo vše rovnoměrně rozetřeno pomocí bakteriologické hokejky po celé ploše Petriho misky s TYM médiem a nechalo se chvíli vstřebat. Na takto připravené médium bylo následně inokulováno 100 μ l kultury vypěstované v Jonesově médiu a opět rovnoměrně rozetřena pomocí bakteriologické hokejky po celé ploše. Misky byly udržovány v anoxické atmosféře pomocí Anaerocult® A Mini (Merck Millipore) při teplotě 37°C. Tyto kultury byly přeočkovány po 7-14 dnech, v závislosti na vizuálním posouzení kondice buněk. Experiment byl velmi časově náročný, v případě tří pasáží trval jeden experiment i déle než měsíc.

Tab 1. Přehled použitých antibiotik a jejich koncentrace dle Lorencová (2014).

Antibiotikum (firma)	Koncentrace
Ampicilin (Applichem)	200 µg/ml
Amikacin (Applichem)	250 µg/ml
Streptomycin (Amresco)	1000 µg/ml
Kanamycin (Applichem)	50 µg/ml
Penicilin (Amresco)	625 µg/ml

3.6.2 Axenická kultivace blastocyst v tekutém TYM médiu

Další metodou byla axenická kultivace blastocyst v tekutém TYM médiu dle Diamond (1957). Pro rozrůstání buněk byla opět využita kultivace v tekutém Jonesově médiu, jak je popsáno dříve. Pro samotnou axenizaci bylo použito 10 ml TYM média v kultivačních zkumavkách a bylo přidáno 180 µl směsi antibiotik (Tab 1). Do takto připravených zkumavek bylo inokulováno 100 µl kultury připravené v Jonesově médiu. Přeočkování takto vytvořených kultur probíhalo jednou za dva týdny, kdy se inokulovalo 100 µl kultury s čerstvým příslušným médiem. Kultivace byly udržovány v anoxické atmosféře pomocí Anaerocult[®] A Mini (Merck Millipore) při teplotě 37°C.

3.6.3 Získávání čistých buněk blastocyst s využitím „cell sorteru“

Pro další způsob získávání čistých blastocyst byly využívány opět buňky *Blastocystis* subtyp ST1 (dále ST1 buňky) rozrostlé v Jonesově médiu a navíc ještě buňky rozrostlé v růstovém médiu. Byla používána vždy druhá pasáž.

V první fázi tohoto experimentu jsme zjišťovali, zda je vůbec možné bakterie a blastocysty z xenické kultury rozdělit a to pomocí průtokového cytometru BD FACSCanto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Xenická kultura buněk, obsahující bakterie a ST1 buňky, byla vždy propláchnuta sterilním roztokem PBS pomocí centrifugace (150 g/10 minut, Multifuge 4 KR, Heraeus). Buňky ST1 byly následně přeneseny do „Flow“ roztoku (1 % FBS v PBS) a měřeny na průtokovém cytometru BD FACSCanto II na 10 tisíc událostí.

Měřeny byly vždy tři typy vzorků: (i) vzorky od pozitivních potkanů obsahujících ST1 buňky, (ii) vzorky od negativních potkanů bez ST1, (iii) vzorek čistého média.

Po prokázání, že xenickou suspenzi buněk lze potenciálně rozdělit do populací dle granularity (SSC - side scatter: boční rozptyl odpovídající vnitřní komplexitě buněk) a velikosti (FSC - forward scatter: čelní rozptyl odpovídající velikosti buněk) proběhla další fáze, a to finální sortování buněk ve spolupráci se Střediskem cytometrie a mikroskopie (Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i, Praha) s využitím cell sorteru (Bio-Rad S3eTM cell sorter, Biorad). Pro samotné sortování byly nakonec využívány ST1 buňky druhé pasáže rozrostlé v Jonesově médiu. Tyto buňky na rozdíl od ST1 buněk rozrostlých v růstovém médiu obsahovaly menší množství fagocytovaných bakterií. Tyto kultivace byly nejprve dvakrát propláchnuty sterilním roztokem PBS pomocí centrifugace (150 g/10 minut, Multifuge 4 KR, Heraeus) a následně ponechány do druhého dne v lednici, aby se zastavila fagocytóza buněk. Takto připravená suspenze buněk byla ještě přefiltrována přes přes filtr CellTrics® 30 µm (Partec) a bylo přidáno 0,5 ml „Flow roztoku“. Následovalo samotné sortování buněk.

Buňky ST1 byly na S3 sorteru nejprve rozděleny podle morfologie, na základě jejich optických vlastností v kanálech FSC a SSC. Buňky s nízkou vnitřní komplexitou (nízký obsah endozomů, lyzozomů a fagocytovaných bakterií odpovídající nízkému SSC parametru) byly vybrány k další analýze autofluorescence v FL-1 (maximum fluorescence v cca 525nm) a FL-4 (maximum fluorescence v cca 700nm) kanálu a porovnány s buňkami s vysokým SSC (vysoký obsah intracelulárních partikulí). Tyto dva barevné kanály byly vybrány empiricky jako nejvíce rozdílné mezi těmito morfologickými subpopulacemi a byly použity jako další kritérium k dosažení maximální čistoty nefagocytující subpopulace. Buňky splňující jak morfologické (nízké SSC), tak autofluorescentní (střední hodnoty FL-1 i FL-4) parametry byly sortovány do 5ml zkumavek pro další analýzu.

3.7 Experimenty zaměřené na snižování populací bakterií v xenických kultivacích

Pro experimenty zabývající se získáváním čistých ST1 buněk s využitím „cell sorteru“ bylo potřebné co nejvíce snížit počet bakterií, aby mohl přístroj pracovat efektivněji. Pro tyto účely byly využívány hlavně tyto tři níže popsané metody. Vzorky, které jsme takto získali, byly měřeny pomocí průtokové cytometrie.

3.7.1 Snižování počtu bakterií s využitím filtrů

Pro snížení počtu bakterií zde byly využívány filtry CellTrics® (Partec) 5 µm. Xenická suspenze ST1 buněk se nejprve přefiltrovala a nakonec se filtr ještě promyl malým množstvím roztoku PBS (cca 2 ml), aby došlo k vymytí zbytků bakterií a média. Následně byl filtr otočen a z opačné strany opět promyt, aby se uvolnily blastocysty, které mají průměr větší než 5 µm, pomocí roztoku PBS do čisté zkumavky. Tato zkumavka se nakonec umístila do centrifugy (150 g/10 minut, Multifuge 4 KR, Heraeus) a sediment byl poté používán pro experiment na cell sorteru.

3.7.2 Snižování počtu bakterií pomocí sacharózového gradientu

Sacharózový gradient se obvykle používá pro účely oddělení částic lišících se navzájem svou molekulární hmotností. Pro tyto účely se používají roztoky sacharózy, jejichž hustota u dna centrifugační zkumavky je vyšší než u hladiny (Arrowood & Sterling, 1987). Sacharózový gradient je například používán pro koncentrování cyst prvoků, my jsme ho však zkusili použít na pročištění blastocyst přímo z xenické kultury.

3.7.3 Snižování počtu bakterií pomocí „Percoll“ gradientu

Princip „Percoll“ gradientu je stejný jako sacharózového. Tento gradient je vytvářen pomocí roztoků připravených z roztoku „Percoll“ (Sigma-Aldrich), které mají různé měrné hmotnosti. Obvykle je tento gradient využíván k izolaci imunitních buněk pro účely analýz na průtokovém cytometru.

IV Výsledky

4.1 Kultivace xenických a axenických kultur ST1

Výsledky kultivací xenických a axenických kultur jsou popsány v následujícím textu.

4.1.1 Xenická kultivace

Xenické kultivace, které pocházely z trusu outbredních potkanů infikovaných buňkami ST1 z lidského biologického materiálu, se dařilo úspěšně kultivovat v Jonesově i růstovém médiu (Obr 2-7), tyto kultivace byly zpravidla používány pro další účely, v tomto případě hlavně pro axenické kultivace ST1 buněk a získávání čistých ST1 buněk s využitím „cell sorteru“.

4.1.1.1 Vyhodnocení vhodnosti médií pro přípravu buněk pro axenizaci

Měření velikosti buněk: Byly srovnávány velikosti ST1 buněk v JM a RM. Bylo zjištěno, že buňky v růstovém médiu jsou výrazně větší. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2.

Tab. 2: Shrnutí výsledků měření ST1 buněk v Jonesově a růstovém médiu (JM – Jonesovo médium, RM – růstové médium).

Velikost buněk	JM	RM
Maximum [μm]	82	104
Minimum [μm]	10	16
Medián [μm]	24	35

Měření koncentrace buněk v růstovém a Jonesově médiu: Měření koncentrace buněk v růstovém médiu jsou shrnuty v tabulce 3. Nejvyšší koncentrace buněk byla zaznamenána třetí den po přeočkování do růstového média, a to $3,77 \times 10^6$ buněk v 1 ml média, jak je vidět na grafu 1. Pro srovnání koncentrace buněk v Jonesově médiu po stejné době růstu se pohybovala okolo $2,58 \times 10^6$ buněk na 1 ml média.

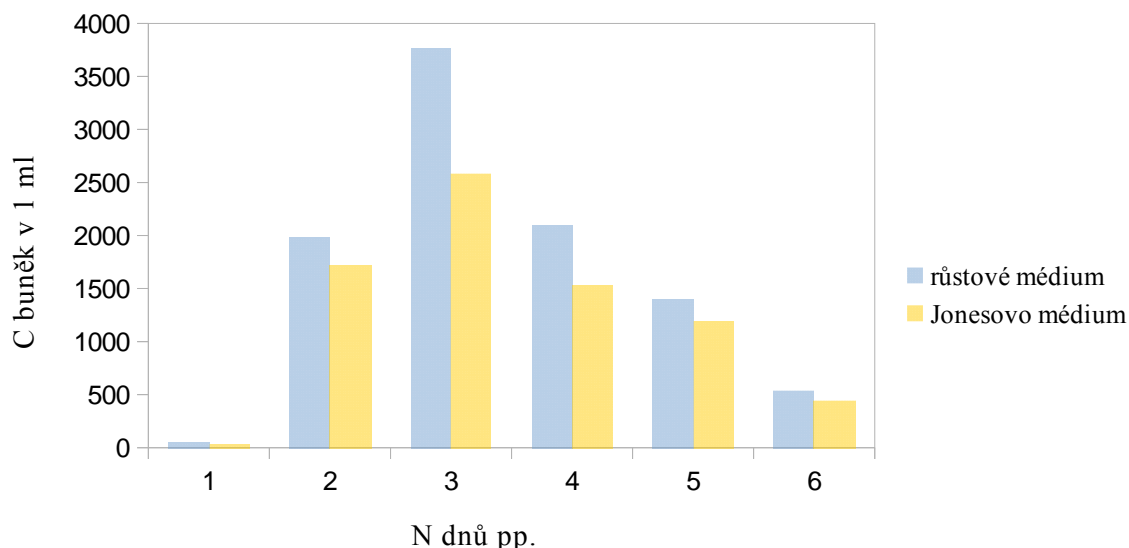
Tab 3: Shrnutí výsledků měření koncentrace buněk v 1 ml růstového média; (N- počet, pp - po přeočkování C – koncentrace).

N dnů pp.	C buněk v 1 ml
1	$4,1 \times 10^4$
2	$1,98 \times 10^6$
3	$3,77 \times 10^6$
4	$2,1 \times 10^6$
5	$1,4 \times 10^6$
6	$5,4 \times 10^5$

Měření koncentrace buněk v Jonesově médiu jsou shrnuty v tabulce 4. Nejvyšší koncentrace buněk byla zaznamenána také třetí den po přeočkování do čistého Jonesova média a to $2,58 \times 10^6$ buněk v 1 ml média. Srovnání koncentrace buněk v Jonesově i růstovém médiu je patrné na grafu 1.

Tab 4: Shrnutí výsledků měření koncentrace buněk v 1 ml Jonesova média; (N- počet, pp - po přeočkování, C – koncentrace).

N dnů pp.	C buněk v 1 ml
1	$2,5 \times 10^4$
2	$1,72 \times 10^6$
3	$2,58 \times 10^6$
4	$1,53 \times 10^6$
5	$1,2 \times 10^6$
6	$4,5 \times 10^5$



Graf 1: Srovnání koncentrací růstového a Jonesova média, uvedená koncentrace je v řádech 10^3 ; (N- počet, pp - po přeočkování, C – koncentrace).

4.1.2 Axenická kultivace

Výsledky axenické kultivace jsou shrnuty do čtyř hlavních experimentů, které jsou vypsány níže a během nichž jsme se pokoušeli optimalizovat přípravu co nejživotaschopnějších ST1 buněk bez přítomnosti bakterií.

4.1.2.1 Axenizace 1: Jonesovo médium – pevné TYM médium

V průběhu prvního experimentu jsme přikročili k přípravě ST1 buněk standardním kultivačním způsobem s využitím Jonesova média. Výsledkem tohoto experimentu byla 75% úspěšnost kultivace ST1 buněk na pevném médiu. Bohužel další pasáž na pevné TYM médium se nezdařila.

Narostlé buňky na tomto pevném médiu začaly zhruba po pěti dnech tvořit kulaté vypouklé kolonie o velikosti 1-4 mm, popřípadě povlak, který vznikl přerůstáním bakterií. Kolonie byly transparentní až mléčně zbarvené s intenzivním štiplavým zápachem. Pod mikroskopem bylo vidět velké množství bakterií, převážně tyčkovitého tvaru, ale také značné množství ST1 buněk, které byly menší, než v klasických kultivacích. V dalších pasážích se velikost a počet buněk ST1 snižovala, množství bakterií ale zůstávalo zachované. Buňky v Jonesově médiu byly v porovnání s buňkami v růstovém médiu v horší

kondici, což se projevilo kratší životností buněk v axenizaci. Proto jsme dále pro experimenty na pevném TYM médiu využívali růstové médium.

4.1.2.2 Axenizace 2: Jonesovo médium – pevné TYM médium - tekuté TYM médium

V druhém experimentu se buňky připravovaly stejným způsobem, tentokrát byly ale přeočkovány paralelně na pevné i tekuté TYM médium. Přeočkování buněk do tekutého TYM média bylo zařazeno na základě informací z literatury (Chen et al., 1997; Lorencová, 2014; Tan et al., 2008), kdy byl tento způsob axenizace úspěšný. V rámci našeho experimentu se nám podařila první pasáž na pevném TYM médiu, druhá pasáž ani do jednoho z médií však úspěšná nebyla. V tekutém TYM médiu se vytvořily dvě viditelně oddělené vrstvy, při bližším prozkoumání pod mikroskopem jsme ale zjistili, že se jedná pouze o velké množství bakterií, kvasinek a také plísni.

4.1.2.3 Axenizace 3: Dobell-Leidlaw médium/růstové médium – pevné TYM médium

V následujícím experimentu bylo pro rozrůstání ST1 buněk použito Dobell-Leidlaw médium (Lorencová, 2014) a také růstové médium. V obou médiích byly ST1 buňky vizuálně v mnohem lepší kondici než v Jonesově médiu, které slouží obvykle jen jako diagnostické médium. V rámci tohoto experimentu byly buňky v mnohem lepší kondici už po první pasáži na pevné TYM médium a úspěšně se podařily i následující dvě pasáže. Nicméně i v průběhu těchto dvou pasáží se buňky ST1 zmenšovaly, blastocysty často i encystovaly a množství bakterií neubývalo. Navíc jsme ve třetí pasáži zachytili i větší množství plísni a kvasinek. Přestože jsme používali kombinaci pěti širokospektrálních antibiotik doporučených studií Lorencová (2014), axenizace jsme nedosáhli.

4.1.2.4 Získávání axenické suspenze buněk ST1 s využitím „cell sorter“

Na základě neúspěchu při získávání axenické suspenze ST1 buněk pomocí tradičních kultivačních metod, jsme zařadili nový přístup pro jejich získávání, a to pomocí přístroje „cell sorter“.

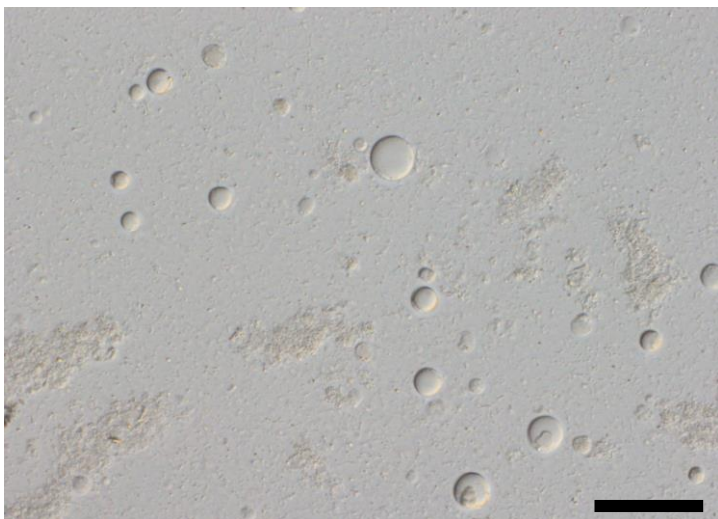
V první fázi jsme zjišťovali, zda je možné bakterie a blastocysty z xenické kultury rozdělit. Xenickou suspenzi buněk z pozitivního vzorku na ST1, z negativního vzorku a pouze čisté médium jsme analyzovali na průtokovém cytometru. U pozitivního vzorku z Jonesova média jsme na dotplotu získali tři populace buněk (Obr 8). Zatímco u negativních

vzorků jsme získali vždy pouze jednu populaci buněk bakterií (Obr 9), v pozitivních vzorcích jsme našli populace tři (Obr 8). Při srovnání dotplotů z obou měření se domníváme, že buňky *Blastocystis* se dělí do dvou populací. Jedna populace vykazuje vyšší granularitu a je umístěna nad populací bakterií (Obr 8). Usoudili jsme, že tato populace ST1 obsahuje buňky s fagocytovanými částicemi (tj. bakteriemi). Druhá populace je na dotplotu umístěna pod populací bakterií a vykazuje mnohem nižší granularitu (Obr 8). Předpokládáme, že tato populace ST1 obsahuje buňky bez nebo s minimálním množstvím fagocytovaných částic. Co se týče růstového média, na dotplotech jsme zachytily vždy pouze jednu populaci buněk (Obr 10 a 11). Na základě těchto výsledků jsme zjistili, že buňky xenických kultur z Jonesova média je možné rozdělit a zároveň je možné oddělit ST1 buňky s a bez fagocytovaných částic a dosáhnout tak dokonale čisté axenické suspenze ST1, kterou by bylo možné využít v dalších experimentech.

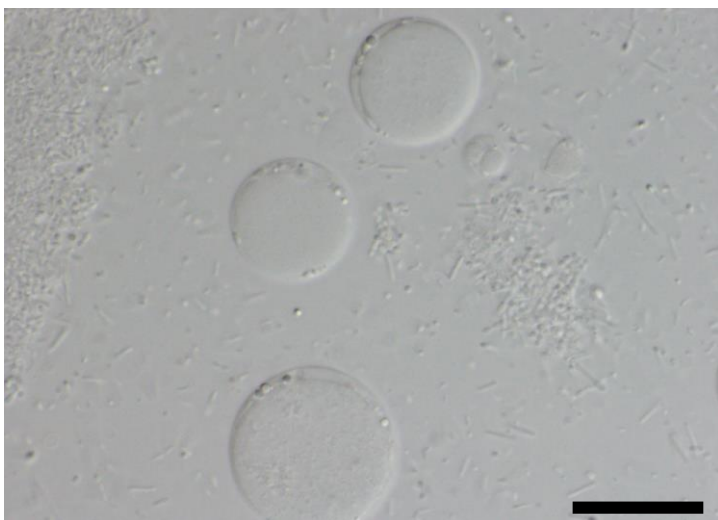
Ve spolupráci se Střediskem cytometrie a mikroskopie (Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i, Praha) jsme provedli sortování buněk z xenické suspenze na S3 cytometru od firmy Biorad. V prvních třech experimentech jsme vytřídili čistou suspenzi ST1 buněk, v centrálních vakuolách se také žádné bakterie neobjevovaly, jak je dobře patrné na obrázku 12. V průběhu těchto pokusů jsme se stále potýkali se dvěma problémy: (i) snížení populace bakterií, aby se urychlil proces sortování, a (ii) v průběhu měření buňky agregovaly a ucpávaly nasávací trysku přístroje. Zabývali jsme se hlavně prvním bodem (tzn. snížení populace bakterií), jak je popsáno v následující kapitole.

4.2 Snížování populace bakterií

Snížování bakterií probíhalo za pomoci filtrů, sacharózového gradientu a „percoll“ gradientu. Vzorky připravené těmito metodami byly analyzovány průtokovým cytometrem. Ukázalo se, že množství bakterií se zmenšilo, ale úbytek nastal i v populaci ST1 buněk. Tyto metody tedy prozatím nelze efektivně použít a je třeba je ještě zoptimalizovat.



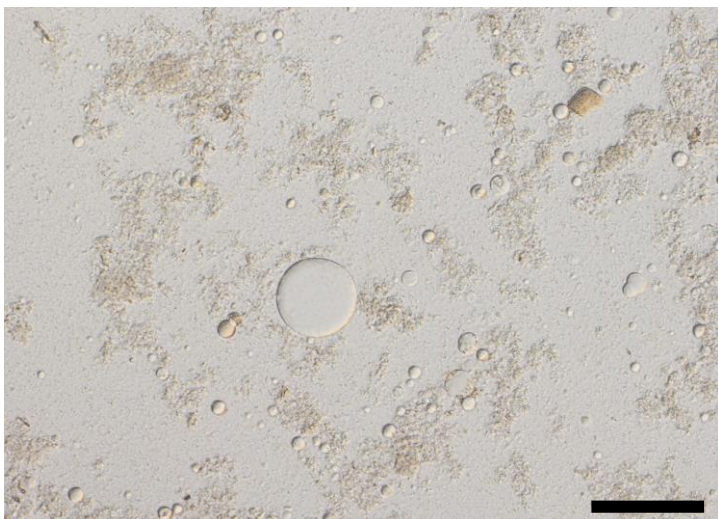
Obr 2. Vakuolární buňky *Blastocystis* ST1 v Jonesově médiu 3. den po přeočkování do nového média (měřítko 50 μm).



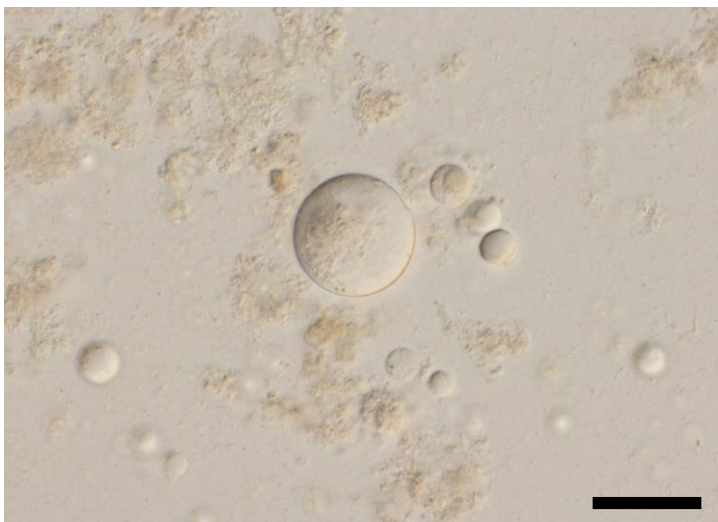
Obr 3. Vakuolární buňky *Blastocystis* ST1 v Jonesově médiu 3. den po přeočkování do nového média (měřítko 20 μm).



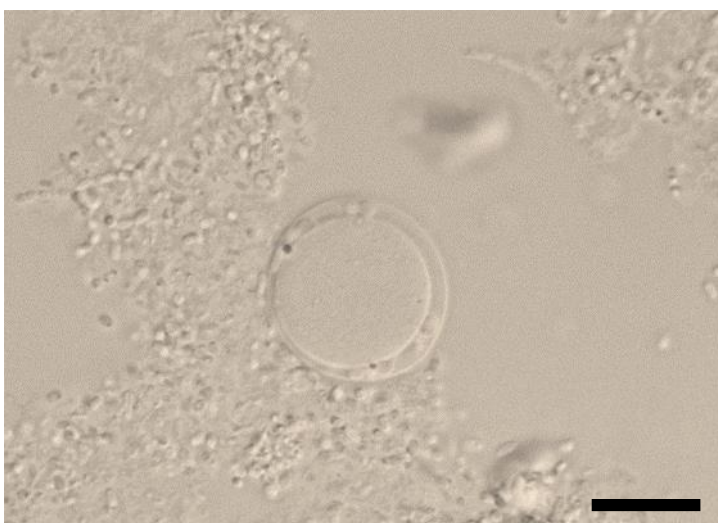
Obr 4. Vakuolární buňka *Blastocystis* ST1 v Jonesově médiu 3. den po přeočkování do nového média (měřítko 10 μm); modrá šipka- velká centrální vakuola s menším množstvím fagocytovaného materiálu; oranžová šipka – jádra na



Obr 5. Vakuolární buňky *Blastocystis* ST1 v Růstovém médiu 3. den po přeočkování do nového média (měřítko 100 μm).

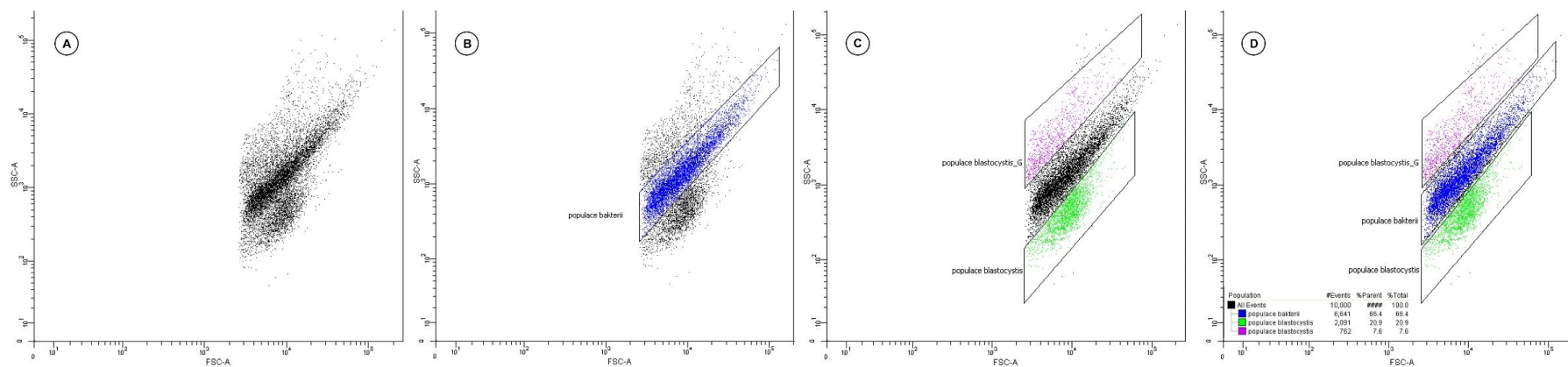


Obr 6. Vakuolární buňky *Blastocystis* ST1 v Růstovém médiu 3. den po přeočkování do nového média (měřítko 50 μm).

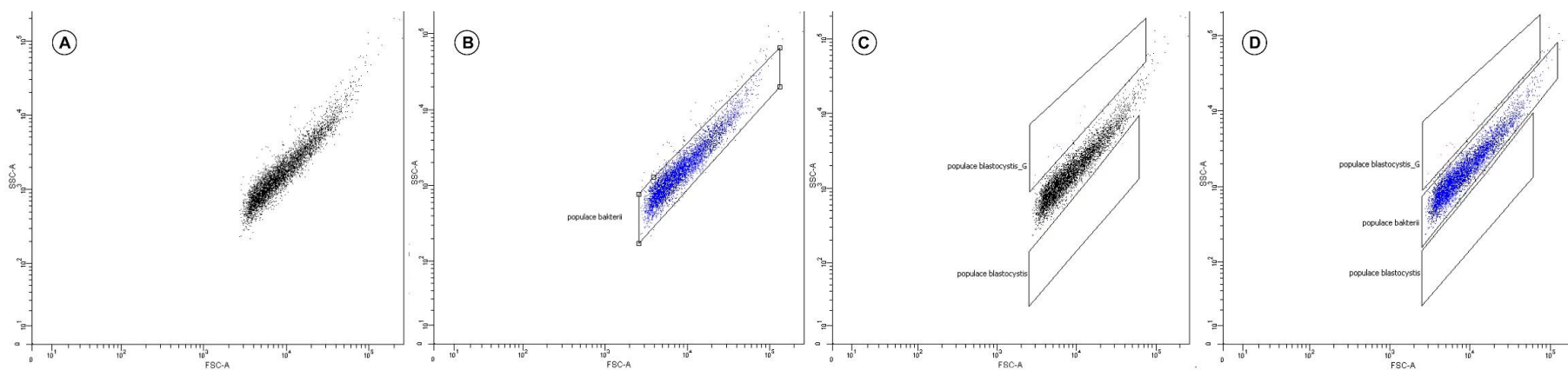


Obr 7. Vakuolární buňky *Blastocystis* ST1 v Růstovém médiu 3. den po přeočkování do nového média (měřítko 10 μm).

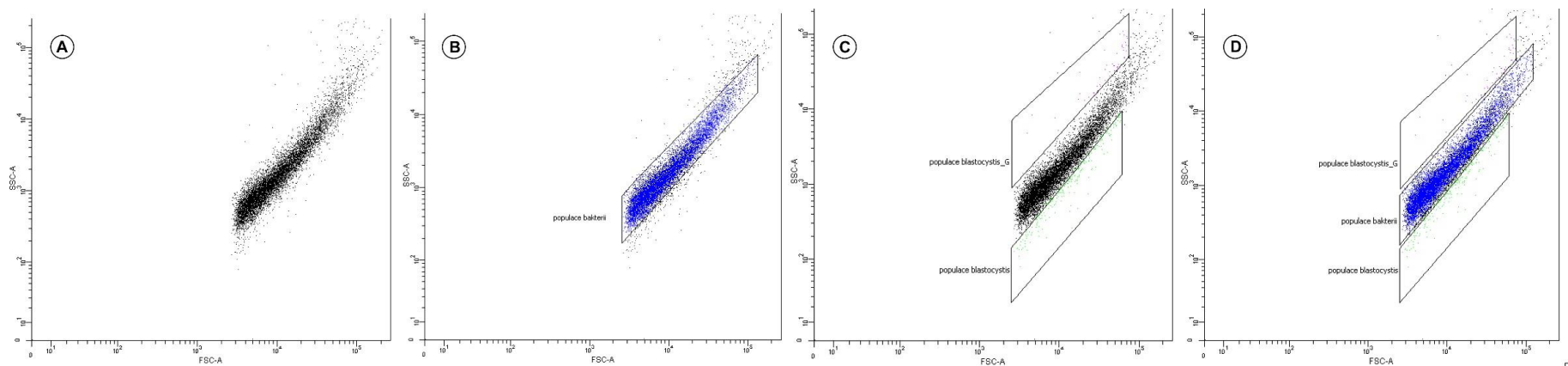
Obr 8. Doplot xenické kultury s buňkami *Blastocystis* ST1 z trusu infikovaného potkana v Jonesově médiu. [A] populace všech buněk z kultury, [B] populace bakterií (modrá barva), [C] dvě různé populace buněk ST1 (fialová – ST1 s fagocytovanými bakteriemi, zelená – bez fagocytovaných bakterií), [D] všechny populace buněk.



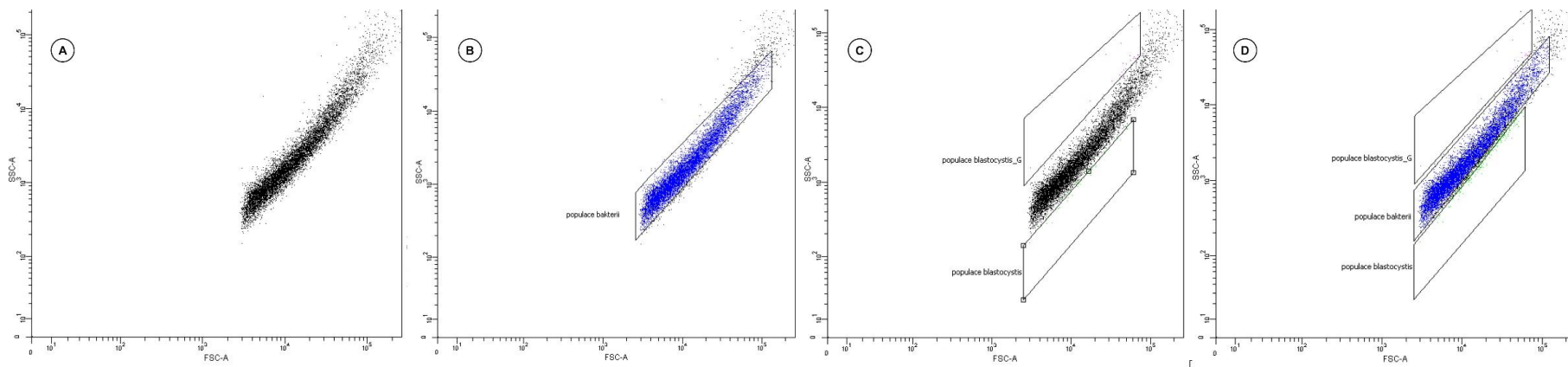
Obr 9. Doplot xenické kultury z trusu negativního potkana v Jonesově médiu. [A] populace všech buněk z kultury, [B] populace bakterií (modrá barva), [C-D] absence populací *Blastocystis* ST1.



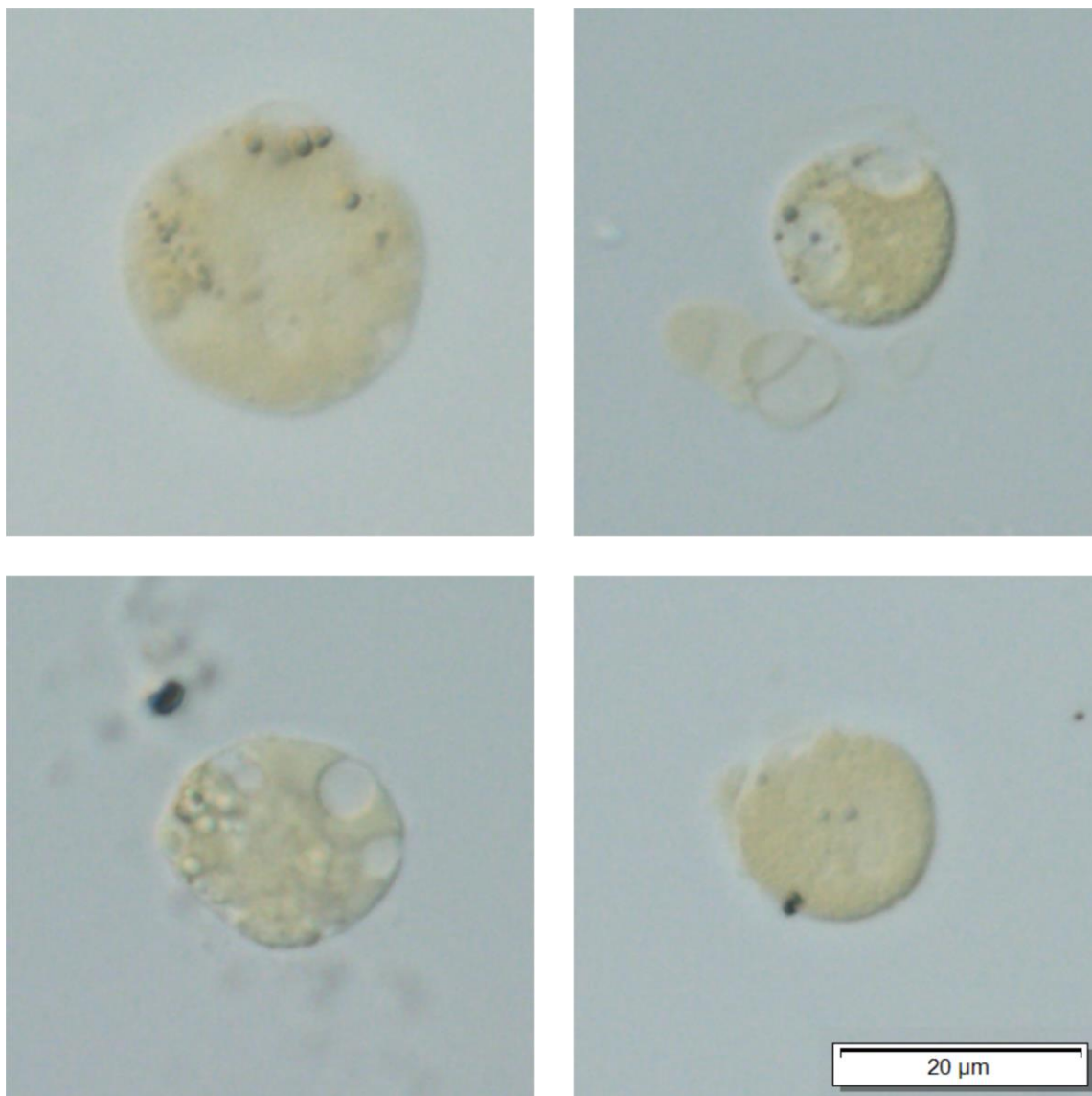
Obr 10. Doplot xenické kultury s buňkami *Blastocystis* ST1 z trusu infikovaného potkana v Růstovém médiu. [A] populace všech buněk z kultury, [B] populace bakterií (modrá barva), [C] dvě různé populace buněk ST1 (fialová – ST1 s fagocytovanými bakteriemi, zelená – bez fagocytovaných bakterií), [D] všechny populace buněk.



Obr 11. Doplot xenické kultury z trusu negativního potkana v Růstovém médiu. [A] populace všech buněk z kultury, [B] populace bakterií (modrá barva), [C-D] absence populací *Blastocystis* ST1.



Obr 12. Buňky *Blastocystis* ST1 po vysortování přístrojem S3 „cell sorter“.



V Diskuze

Role prvoka rodu *Blastocystis* v lidském střevním ekosystému zůstává dosud nejasná. Tento prvok je často popisovaný jako potenciální lidský patogen (např. Stark et al., 2007). Tento názor vyslovili již ve své studii Udkow & Markell (1993), kde na základě průjmových onemocnění u pacientů s diagnostikovanými blastocystami usoudili, že blastocysty mohou sehrávat svoji roli při vzniku střevních zánětů v důsledku jejich přemnožení při abnormálních podmínkách ve střevním traktu. Tento jednobuněčný anaerobní prvok je často spojován s etiologií střevních onemocnění, jako je syndrom dráždivého tračníku (Irritable Bowel Syndrome - IBS) (např. Poirier, 2012) nebo střevní záněty autoimunitního původu (např. Stark et al., 2007). Nicméně několik nedávných studií zpochybňuje názor, že by blastocysty byly patogeny a považují je spíše za neškodné komenzály obývající tlusté střevo člověka, kteří by navíc mohli být i člověku prospěšní (Scanlan & Stensvold, 2013; Scanlan et al., 2014). Pro hypotézu o komenzální roli blastocyst existují dva důvody a to: (i) častá detekce asymptomatických infekcí u lidí a to různými subtypy, a (ii) vysoká prevalence blastocyst u zdravých jedinců v porovnání s pacienty postiženými střevním zánětlivým onemocněním (Petersen et al., 2013; Parfrey et al., 2014; Scanlan & Stensvold, 2013). V těchto studiích zazněl i názor, že přítomnost blastocyst u zdravých jedinců nějakým, dosud neznámým způsobem, souvisí s optimálním složením lidského střevního mikrobiomu (Scanlan & Stensvold, 2013).

Podle mého názoru to, že většina vědců přisuzuje blastocystám patogenitu, je způsobeno tím, že se setkávali především s pacienty se zánětlivým střevním onemocněním a ne se zdravými jedinci. Avšak hypotéza, že by se mohlo jednat o komenzála, který má nějakou spojitost se zdravým střevním mikrobiomem, je dosud postavena na korelačních výsledcích epidemiologických studií a musí být dále ověřována především experimentálně. Z počátku mé laboratorní práce na blastocystách jsem se více přiklápěla k názoru, že tento prvok má patogenní potenciál, a to nejspíš díky tomu, že většina odborných článků se k tomuto názoru přiklání. Nicméně s postupem času, s mým postupujícím výzkumem a stále častějším výskytem odborných článků, které přichází s opačnými výsledky, jsem nyní přesvědčená, že je nezbytné změnit pohled na roli prvoka *Blastocystis* ve střevním traktu a přestat o nich uvažovat pouze jako o potenciálních patogenech.

Testování xenické kultivace pro přípravu viabilních ST1 buněk

Pro xenickou kultivaci blastocyst, kde tito prvoci rostou v přítomnosti dalších mikroorganismů (zejména bakterií), je v literatuře popsáno mnoho různých kultivačních médií (např. Clark & Diamond, 2002). Bakteriální složka kultivací blastocyst je zodpovědná za vytvoření anaerobní atmosféry, jež blastocysty vyžadují, a zároveň jsou částečně zdrojem jejich výživy. Nicméně výživa blastocyst je v xenické kultivaci nahrazována koňským sérem.

Pro účely této studie byly xenické kultivace využity především pro namnožení buněk *Blastocystis* ST1 (dále jen ST1) pro následné experimenty zaměřené na získávání čisté (axenické) suspenze ST1 buněk. Proto bylo velmi důležité, aby xenická kultura splňovala následující kritéria: (i) obsahovala co nejvyšší počet ST1 buněk v dobré kondici, (ii) obsahovala co nejnižší množství bakterií, a (iii) obsahovala co nejmenší podíl „granulárních“ ST1 buněk, tzn. buněk s fagocytovanými částicemi (především pro pozdější práci na „cell sorteru“).

Nejdříve jsme se rozhodli otestovat modifikované Jonesovo médium (Leelayoova et al., 2002), jehož příprava je poměrně jednoduchá, ne příliš finančně náročná a nejlépe splňuje výše uvedené podmínky. V průběhu našich experimentů zaměřených na axenizaci tradičními kultivačními metodami jsme zjistili, že Jonesovo médium pro tento typ práce není vhodný. Důvodem je zřejmě nižší životaschopnost ST1 buněk, které nepřežily ani první pasáž. Jonesovo médium obsahuje méně koňského séra, které je nutné pro výživu blastocyst než dále použité růstové médium. Nicméně Jonesovo médium se ukázalo být vhodné pro přípravu ST1 buněk pro experimenty zaměřené na získávání čisté suspenze blastocyst s využitím přístroje „cell sorter“. Toto médium nám umožnilo připravit xenickou kulturu buněk s menším podílem granulárních buněk, tj. buněk bez fagocytovaných částic (dále granulární ST1 buňky), a také nižší podíl populace bakterií. Navíc pomocí průtokové cytometrie jsme zjistili, že populace bakterií se více oddělovala od ST1 buněk než v Růstovém médium, popsaném níže.

Jako další médium pro přípravu buněk ST1 buněk jsme vyzkoušeli tzv. růstové médium (modifikováno dle původního média Suresh et al., 1994). Blastocysty se v tomto médiu rychle množily a rostly ve velkém množství, docházelo ale k intenzivnímu přerůstání bakterií, pravděpodobně díky vysokému podílu koňského séra, a byl zde velký podíl ST1 buněk s fagocytovanými částicemi. Navzdory těmto aspektům, ST1 buňky byly ve výborné

kondici. Tudíž buňky rozrostlé v růstovém médiu se zdály být vhodnější pro tradiční způsob axenizace. Tyto ST1 buňky rostly v axenizačním experimentu na pevném médiu mnohem déle než buňky připravené pomocí kultivace v Jonesově médiu. Při experimentech, kdy jsme využívali analýz průtokové cytometrie, se ukázalo růstové médium jako naprosto nevhodné pro získávání čisté suspenze blastocyst pomocí „cell sorteru“. Důvodem bylo naprosté překrývání bakteriálních populací s populacemi blastocyst. Na dotplohách z průtokové cytometrie jsme vždy zaznamenali pouze jednu velkou nerozdělenou populaci. Rozhodli jsme se tedy toto médium nepoužívat pro experimenty s využitím přístroje „cell sorter“.

Posledním použitým médiem bylo dvoufázové Dobell-Leidlaw médium (Dobell & Laidlaw, 1926). Blastocysty se v tomto médiu sice dobře množily, ale opět docházelo k silnému přerůstání bakterií. Navíc ST1 buňky vypadaly podobně jako v růstovém médiu. Toto médium je také složitější na přípravu a finančně náročnější, než dvě výše popsána živná média, proto jsme se rozhodli jej dále nevyužívat.

Na základě našich pozorování jsme se rozhodli pracovat s Jonesovým a růstovým médiem. Důvodem pro využití obou médií bylo testování dvou různých způsobů získávání čisté suspenze ST1 buněk a to: (i) kultivační axenizací s využitím směsi širokospektrálních antibiotik a (ii) a vytřídění ST1 buněk z xenické kultivace pomocí „cell sorteru“. Jak bude uvedeno dále, pro každý způsob „axenizace“ bylo nezbytné využít jiné médium.

Hodnocení kondice buněk pro tradiční způsob axenizace

V případě experimentů zaměřených na axenizaci blastocyst pomocí tradičních kultivačních metod bylo velmi podstatné, aby xenické médium (pro přípravu ST1 buněk) splnilo podmínku produkce buněk v co nejlepší kondici. Pro účely tohoto experimentu bylo nezbytné srovnat kondici buněk ve vytipovaných médiích (Jonesovo a růstové médium) a zjistit, které by bylo pro daný účel nejvhodnější. Tato média jsme srovnávali z hlediska velikosti buněk a dále také koncentrace buněk v 1 ml média. Dále bylo důležité zjistit, který den od přeočkování buněk do čistého média je koncentrace ST1 buněk nejvyšší.

Výsledky měření velikosti vakuolárních forem ST1 buněk ukázaly, že ST1 buňky v Růstovém médiu jsou větší než ty v Jonesově médiu, což pravděpodobně svědčí o jejich dobré kondici. V literatuře se uvádí, že velikost vakuolárních forem blastocyst v xenických kultivacích z lidských izolátů se pohybuje v rozmezí 4 – 64 μm , průměrně však jen 5 – 15 (Dunn et al., 1989; MacPherson & MacQueen, 1949) My jsme však došli k rozdílným

výsledkům. Průměrná velikost buněk ST1 v Jonesově médiu se pohybovala kolem 27 μm a v růstovém médiu dokonce 38 μm . Tyto rozdílné výsledky mohou být způsobeny odlišným složením použitých médií a také jinými kultivačními podmínkami. V růstovém médiu byly buňky větší a bylo jich i více, pravděpodobně díky vyššímu obsahu koňského séra (50 % objemu média) oproti Jonesovu médium (10% objemu média), a dalších živných látek, jako je například trypton. Zároveň se v kultuře ale nacházelo i větší množství bakterií a buňky tedy vykazovaly větší granularitu. Výsledky popisovaného experimentu korelují s výsledky popsány v předešlé kapitole. Můžeme konstatovat, že velikost a kondice buněk *Blastocystis* ST1 může vypovídat o jejich životaschopnosti.

Růstové médium, které popisujeme v této práci, bylo vytvořeno na základě modifikace tzv. encystačního média popsaného ve studii Suresh et al (1994). Zjistili jsme, že použitím tryptonu místo tryptikázy původně použité v encystačním médiu, ST1 buňky úspěšně rostou a jsou ve vynikající kondici v porovnání s buňkami v Jonesově médiu. Nicméně Suresh et al. (1994) popsal pouze růst buněk po dobu šesti dní a pro naše účely bylo nezbytné najít neoptimálnější den pro přeočkování ST1 buněk do čistého média. Proto jsme se rozhodli měřit koncentraci buněk po dobu uvedených šesti dní, abychom objevili nejvyšší koncentraci buněk a zjistili tak, kdy je nejvhodnější doba buňky použít pro přeočkování kultury, případně pro další experimenty (v našem případě pro tradiční způsob axenizace).

Měření koncentrace buněk v růstovém médiu po dobu šesti dnů od přeočkování ukázalo, že nejvyšší koncentrace ST1 buněk nastává třetí den po přeočkování. Z toho vyplývá, že tento den je neoptimálnější pro přeočkování buněk do čistého média, podobně jak je doporučováno u Jonesova média. V následujících dnech (tzn. den 4 – den 6) buňky ST1 postupně ubývaly a množství bakterií se zvyšovalo. Poslední den měření už bylo bakterií tolik, že blastocysty jimi byly v zorném poli téměř překryté.

Axenizace *Blastocystis* ST1 pomocí kultivace

Jak jsem již dříve zmínila, hlavním cílem této bakalářské práce bylo získat čistou (axenickou) suspenzi ST1 buněk bez kontaminujících organismů (bakterií či kvasinek), která by mohla být využita pro další studium prvoka *Blastocystis*. V literatuře je uváděna celá řada médií, která jsou pro tyto účely vhodná (např. Clark & Diamond, 2002; Tan, 2008). My jsme se rozhodli navázat na magisterskou práci Lorencové (2014), kde bylo pro axenickou

kultivaci použito pevné a tekuté TYM médium obohacené směsí několika širokospektrálních antibiotik. Kultura byla následně vždy udržována ve striktně anaerobních podmínkách a při teplotě 37°C.

Pro axenizační experimenty s využitím pevného i tekutého TYM média jsme používali ST1 buňky od experimentálně infikovaných potkanů, kteří byli infikováni lidským izolátem *Blastocystis* ST1. Tyto buňky byly namnoženy v tzv. růstovém médiu, kde byly v jednoznačně nejlepší kondici. Přesto se axenizace ani do jednoho z médií nepodařila. V průběhu experimentu na pevném TYM médiu se ST1 buňky zmenšovaly, dokonce i encystovaly, ale množství bakterií neubývalo. Pokus o axenizaci v tekutém TYM médiu také nebyl úspěšný. Na první pohled byly ve zkumavce patrné dvě různé vrstvy. Při bližším pohledu pod mikroskopem jsme však zjistili, že se jedná jen o velké množství bakterií, kvasinek a dokonce i plísní, žádné blastocysty však nebyly vidět. Ani v jednom z médií jsme nedokázaly ani při opakovaných experimentech dosáhnout axenizace ST1 buněk.

Ve výše popsaných experimentech jsme vyhodnotili, že buňky ST1 nejsou dostatečně životaschopné, aby dále rostly na pevném nebo v tekutém TYM médiu a přežily další přeočkování. Důvodem snižování životaschopnosti blastocyst mohla být nedostatečná výživa z TYM média a změna životních podmínek, které měly buňky v xenické kultivaci zajištěné. Další skutečností, která mohla přispět k neúspěšné axenické kultivaci, by mohla být odlišná anaerobní atmosféra. V xenických kultivacích je toto anaerobní prostředí vytvářeno přítomnými bakterií, které se vyskytují ve vzorcích stolice. Například u Jonesova média je doporučováno použít pouze 4 ml média, do kterého se přidá vzorek, a kultivační zkumavka se důkladně uzavře se šroubovacím závitem (*Lab Stuff* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: <http://www.blastocystis.net/p/lab-stuff.html>). Z vlastní zkušenosti mohu konstatovat, že se taková anaerobní atmosféra v xenických kultivacích vytváří opakovaně, tzn. po otevření kultivace a jejím následném uzavření, a to jak v Jonesově tak v Růstovém médiu. Na Petriho miskách jsme však anaerobní atmosféru vytvářeli pomocí Anaerocult® A Mini (Merck Millipore). Principem je použití sáčků obsahujících komponenty, které po navlhčení vodou chemicky vážou kyslík a vytváří tak anaerobní atmosféru s oxidem uhličitým. Takto vytvořená atmosféra mohla být pro blastocysty nevyhovující.

Hlavním problémem našich axenizačních experimentů byly neubývající bakteriální populace v kulturách. Možnou příčinou bakteriálního přerůstání mohla být nevhodná kombinace antibiotik (ampicilin, amikacin, streptomycin, kanamycin, penicilin) a zejména použití jejich nesprávné koncentrace. Kombinace antibiotik zvolená na základě magisterské

práce Lorencové (2014), kde autorka popisuje úspěšnou axenizaci plazích blastocyst, mohla účinkovat pro bakterie obsažené v plazích vzorcích trusu. Naopak tato kombinace antibiotik mohl být nevhodná nebo neúčinná pro bakterie přítomné ve vzorku stolice od našeho lidského dárce *Blastocystis* ST1. Také koncentrace všech pěti použitých antibiotik (ampicilin, amikacin, streptomycin, penicilin, kanamycin) byla použita dle výše uvedené práce. Autorka sice uvádí koncentraci antibiotik v mg/ml, ale neuvádí výchozí koncentraci použitých antibiotik, jež jsou udávány v mezinárodních jednotkách (UI). Je tedy možné, že jsme nedocílili jejich požadované koncentrace. V několika studiích popisujících axenizaci blastocyst používali jiná antibiotika. Například autoři studie Chen et al. (1997) provedli úspěšnou axenizaci na pevném agaru s použitím přípravku Claforan obsahujícího jako účinnou látku cefotaxim (cefalosporin třetí generace), jehož antibakteriální aktivita působí proti širokému spektru gram-pozitivních i gram-negativních bakterií. Naopak stejní autoři zaznamenali neúspěch při kultivaci blastocyst v tekutém IMDM médiu obohaceném o 10 % koňského séra (Ho et al., 1993), kdy pro eliminaci bakterií použili ampicilin, streptomycin, claforan, colistin, vancomycin a amphotericin B, který se řadí mezi antimykotika. I kdybychom úspěšně optimalizovali výběr a koncentraci antibiotik, s největší pravděpodobností by však účinkovala na konkrétní vzorek stolice s ST1 buňkami využitého pro daný experiment. U použití vzorků od jiných dárců se obáváme, že by účinek antibiotik mohl být jiný možná menší nebo žádný. Důvodem je různorodost lidského střevního mikrobiomu a velkým problémem by pro nás mohla být přítomnost různých rezistentních bakteriálních kmenů.

Na základě výsledků našich axenizačních experimentů pomocí tradičních kultivačních metod a také nesourodých informací o axenizaci blastocyst z literatury jsme se rozhodli změnit způsob získávání čisté suspenze buněk ST1 a to pomocí třídění populace blastocyst z xenických kultur s využitím přístroje „cell sorter“. Tento způsob získávání čisté suspenze blastocyst by nám umožnil vyhnout se výše uvedeným a těžko řešitelným obtížím. Navíc by se získávání čisté suspenze buněk zefektivnilo a snížily by se náklady na její přípravu.

Testování oddělení populace blastocyst z xenické kultivace pomocí průtokové cytometrie

Pro účely experimentů získání blastocyst pomocí „cell sorteru“ jsme nejdříve testovali, zda je vůbec možné blastocysty od bakterií z kultury oddělit pomocí průtokové cytometrie. Na průtokovém cytometru BD FACSCanto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) byly měřeny vždy tři typy vzorků. Kultivace buněk z trusu potkanů infikovaných ST1 blastocystami jsme porovnávali s negativní kontrolou, kde byl pro kultivaci použit trus potkanů negativních na *Blastocystis* ST1 (a tedy obsahující pouze bakterie vyskytující se ve střevním traktu). Pro dodatečnou kontrolu jsme měřili také čistá média, která neobsahovala ST1 buňky ani bakterie.

U negativních vzorků se na dotpotech objevovala vždy pouze jedna populace, kterou jsme identifikovali jako populaci bakterií (např. obr. 11). Během měření pozitivních vzorků se ale ukázaly populace tři (obr. 11). Při srovnání těchto výsledků jsme zjistili, že se blastocysty dělí do dvou populací. Dle parametru SSC (side scatter), který vypovídá o průsvisnoti buněk, jsme zjistili, že jedna populace vykazuje vyšší granularitu a je umístěna nad populací bakterií. Usoudili jsme, že se jedná o buňky s fagocytovanými částicemi (baktériemi). Druhá populace se na dotplotu objevila pod populací bakterií a vykazovala mnohem nižší granularitu. Předpokládáme, že tato populace ST1 obsahuje buňky s menším množstvím fagocytovaných částic nebo jsou tyto buňky úplně bez fagocytovaných částic. Na základě těchto předběžných výsledků usuzujeme, že bychom dokázali vytrdit čistou populaci samotných blastocyst z xenické kultury a navíc vytrdit pouze populaci blastocyst bez fagocytovaných částic. Takto vysoce čistá suspenze blastocystových buněk by byla dokonale využitelná pro získávání čistého celkového antigenu, který by mohl být použit pro serologické a imunologické analýzy nezbytné k výzkumu role blastocyst v lidském organismu.

Získávání čisté suspenze ST1 buněk pomocí „cell sorteru“

Po ověření, že populace ST1 buněk z xenické kultury lze od bakterií oddělit, jsme přistoupili k samotnému sortování buněk. Na našem pracovišti však potřebný přístroj zatím nebyl v provozu, proto jsme se rozhodli pro spolupráci se Střediskem cytometrie a mikroskopie (Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i, Praha) s využitím sorteru (Bio-Rad S3eTM cell sorter, Biorad). ST1 buňky byly na S3 sorteru nejprve rozděleny podle morfologie na základě jejich

optických vlastností v kanálech SSC a FSC. Buňky s nízkou komplexitou (bez fagocytovaných částic) byly následně vybrány pro další analýzu autofluorescencí ve dvou barevných kanálech (FL-1, který má maximum fluorescence v cca 525 nm a FL-4, s maximem fluorescence v cca 700nm), které byly zvoleny empiricky jako nejvíce rozdílné mezi těmito morfologickými subpopulacemi a byly následně použity jako další kritérium, sloužící k dosažení maximální čistoty subpopulace bez fagocytovaných částic. Správnou volbu této vlnové délky (525 nm) jsme si posléze potvrdili srovnáním se studií Nagel et al. (2015), kde autoři pro svůj výzkum také využívali autofluorescenci blastocyst při stejné vlnové délce.

Přestože se nám podařilo získat čistou suspenzi buněk ST1, je stále zapotřebí hledat efektivnější způsob, jak snížit celkové množství bakterií, aby mohl přístroj pracovat rychleji a efektivněji. Zkoušeli jsme bakterie zredukovat za použití filtrů o průměru pórů 5 μm (Partec), bohužel docházelo k velkým ztrátám buněk blastocyst. Tato nízká koncentrace blastocyst zásadně zpomalovala proces sortování. Dále jsme pro účely experimentů zaměřených na snižování počtu bakterií využili sacharózového gradientu (používaného pro čištění cyst prvoků ze vzorků trusu) a v poslední řadě i „percoll“ gradient (využívaný pro čištění suspenze leukocytů pro průtokovou cytometrii). Bohužel použití ani jednoho gradientu nebylo natolik účinné, aby snížilo počet bakterií a zároveň bylo opět doprovázené značným úbytkem blastocyst. Jednou z možností by mohl být „percoll gradient“, pokud by se podařilo upravit měrné hmotnosti jednotlivých percollových roztoků. Výhodou percollového roztoku je zanedbatelná osmotická aktivita, která nezpůsobuje praskání buněk, jako je tomu u sacharózového gradientu.

Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že metoda sortování je pro získávání čistých ST1 buněk mnohem účinnější a rychlejší než tradiční axenická kultivace. Nicméně je potřeba dále optimalizovat přípravu vzorků s ST1 buňkami tak, abychom byli schopni získat větší množství axenických buněk.

VI Závěr

-V rámci našich dílčích cílů jsme se zabývali hodnocením médií z hlediska velikosti a koncentrace ST1 buněk, které by byly použitelné pro axenizační experimenty. Zjistili jsme, že pro experimenty zabývající se tradiční axenickou kultivací je vhodné tzv. růstové médium, ve kterém byly buňky větší a také jejich koncentrace byla mnohem vyšší, než v Jonesově médiu. Naopak Jonesovo médium je vhodnější pro experimenty, kdy jsou ST1 bunky získávány pomocí přístroje „cell sorter“, tyto buňky totiž vykazují nižší granularitu, což bylo prokázáno měřením v průtokovém cytometru. Také jsme zjistili, že optimální doba pro přeočkování ST1 buněk do čistého média a pro jejich využití k dalším experimentům je třetí den po přeočkování do čistého média.

-Na základě výsledků měření průtokovou cytometrií bylo dokázáno, že ST1 buňky lze od bakterií rozdělit. Blastocysty se totiž dělí do dvou populací. První populace je více granulární (obsahuje fagocytované bakterie) a nachází se nad populací bakterií, druhá vykazuje nižší granularitu a vyskytuje se pod populací bakterií.

-K řešení hlavního cíle této práce, jsme přistupovali dvěma způsoby. Prvním byla cesta tradiční axenickou kultivací. Tento cíl byl však splněn jen z části. Blastocysty na pevném agaru obohaceném směsí několika širokospektrálních antibiotik sice rostly, s postupem času se však zmenšovaly, dokonce i encystovaly a množství bakterií se nám snížit nepodařilo. Zvolili jsme proto jiný způsob získávání axenických ST1 buněk.

-Hlavní cíl této práce se nám podařil splnit druhým způsobem, a to získáním ST1 buněk pomocí přístroje „cell sorter“. Získali jsme dokonale čistou suspenzi ST1 buněk. Nadále je ale potřeba pokračovat v optimalizaci přípravy vzorků tak, abychom ještě snížili množství bakterií a zabránili agregování buněk, aby mohl přístroj pracovat rychleji, efektivněji a nedocházelo k jeho ucpávání. Po vyřešení těchto technických problémů budeme schopni vysortovat mnohem větší počet ST1 buněk pro imunologické a serologické experimenty.

VII Seznam použité literatury:

- Abdel Hameed DM, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM (2011) Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitology Research* 108:553–560.
- Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG (2013) Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 164: 497–509.
- Arrowood MJ, Sterling CR (1987) Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *Journal of Parasitology* 73:314–319.
- Barret HP (1921) A method for the cultivation of *Blastocystis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 15:113–116.
- Boeck WC, Drbohlav J (1925) The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 5:371-407.
- Brumpt E (1912) *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. *Bulletin of the Exotic Pathology Society* 5:725-30.
- Clark CG, Diamond LS (2002) Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 329–341.
- Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR (2013) Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in parasitology* 82:1-32.
- Diamond LS (1957) The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *Journal of Parasitology* 43:488-490.
- Dobell C, Laidlaw PP (1926) On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology* 18:283-318.
- Dunn LA, Boreham PFL, Stenzel DJ (1989) Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *International Journal for Parasitology* 19: 43–56.
- El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, Hamze M, Riveau G, Viscogliosi E (2014) Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infectious Diseases* 14:164.

- Hameed A DM, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM (2011) Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitology Research* 108: 553–560.
- Hazen KC (1993) Controversial fungal and protozoan gastrointestinal infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 6: 77-82.
- Hess M, Kolbe T, Grabensteiner E, Prosl H (2006) Clonal cultures of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and a *Blastocystis* sp. established through micromanipulation. *Parasitology* 133: 547–554.
- Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM (2008) Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitology Research* 102:853–860.
- Ho LC, Singh M, Suresh G, Ng GC, Yap E H (1993) Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitology Research* 79: 614–616.
- Chen TL, Chan CC, Chen HP, Fung CP, Lin CP, Chan WL, Liu CY (2003) Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69: 213–216.
- Jones WR (1946) The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 40:130-140.
- Khalifa AM (1999) Diagnosis of *Blastocystis hominis* by different staining techniques. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 29: 157-165.
- Lanuza MD, Carbajal JA, Borrás R (1996) Identification of surface coat carbohydrates in *Blastocystis hominis* by lectin probes. *International Journal for Parasitology* 26: 527–532.
- Leder K, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Wolfe R (2005) No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 20:1390–1394.
- Lee L, Chye T, Karmacharya B, Govind S (2012) *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites & Vectors* 5:130.

- Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M (2002). *In-vitro* cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 96:803–807.
- Lorencová M (2014) Diverzita rodu *Blastocystis* (*Stramenopiles*) v plazech a členovcích
Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha.
- MacPherson DW, MacQueen WM (1994) Morphological diversity of *Blastocystis hominis* in sodium acetate-acetic acid-formalin-preserved stool samples stained with iron hematoxylin. *Journal of Clinical Microbiology* 32:267–268.
- Mirza H, Tan KSW (2009) *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitology Research* 104:355–361.
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Ng GC, Yap EH (1997) Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research* 83:319-325.
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Ng GC, Yap EH (1996) Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Research* 82:439–444.
- Nagel R, Bielefeldt-Ohmann H, Traub R (2014) Clinical pilot study: efficacy of triple antibiotic therapy in *Blastocystis* positive irritable bowel syndrome patients. *Gut Pathogens* 6:34.
- Nasirudeen AM, Tan KS, Singh M, Yap EH (2001) Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology* 123:235-46.
- Ng GC, Tan KSW (1999) Colony growth as a step towards axenization of *Blastocystis* isolates. *Parasitology Research* 85:678–679.
- Noël C, Dufernez F (2005) Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology* 43:348.
- Olivo-Diaz A, Romero-Valdovinos M, Gudi-Ramirez A, Reyes-Gordillo J, Jimenez-Gonzalez DE, Ramirez-Miranda ME, Maravilla P (2012) Findings related to IL-8 and IL-10 gene polymorphisms in a Mexican patient population with irritable bowel syndrome infected with *Blastocystis*. *Parasitology Research* 111:487–491.

- Parfrey LW, Walters WA, Lauber CL, Clemente JC, Berg-Lyons D, Teiling C, Knight R (2014) Communities of microbial eukaryotes in the mammalian gut within the context of environmental eukaryotic diversity. *Frontiers in Microbiology* 5:1–13.
- Parija SC, Jeremiah S (2013) *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology* 3:17–25.
- Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RCA (2010) Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology* 169:8–17.
- Petersen AM, Stensvold CR, Mirsepasi H, Engberg J, Friis-Møller A, Porsbo LJ, Hammerum AM, Nordgaard-Lassen I, Nielsen HV, Krogfelt KA (2013) Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 48:638–9.
- Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H (2012) New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathogens* 8:1–4.
- Prasad KN, Nag VL, Dhole TN, Ayyagari A (2000) Identification of enteric pathogens in HIV-positive patients with diarrhoea in Northern India. *Journal of Health Population and Nutrition* 18:23–26.
- Rajamanikam A, Govind SK (2013) Amoebic forms of *Blastocystis* spp. - evidence for a pathogenic role. *Parasites & Vectors* 6:295.
- Rivera WL (2008) Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Veterinary Parasitology* 156:178–182.
- Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D (2011) Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84:308–312.
- Salim HR, Kumar GS, Vellayan S, Mak JW, Khairul Anuar A., Init I, Vennila GD, Saminathan R, Ramakrishnan K (1999) *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitology Research* 85:1032–1033.
- Scanlan PD, Stensvold CR, Hans GHJ, Heilig WM, Cotter PD (2014) The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology* 90:326-330.

- Scanlan PD (2012) *Blastocystis*: Past pitfalls and future perspectives. *Trends in Parasitology* 28:327–334.
- Scanlan PD, Stensvold CR (2013) *Blastocystis*: Getting to grips with our guileful guest. *Trends in Parasitology* 29:523–529.
- Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH (1995) Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 81:446–450.
- Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J (2007) Irritable bowel syndrome: A review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *International Journal for Parasitology* 37:11–20.
- Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocal V, Gaston D, Richmond GS, van der Giezen M, Roger AJ (2008) Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current Biology* 18:580–585.
- Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, 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.
- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RC A., Traub RJ, Viscogliosi E, Clark CG (2007) Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends in Parasitology* 23:93–96.
- Stenzel DJ, Boreham PF (1996) *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 9:129–136.
- Suresh K, Smith H (2004) Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23:509–511.
- Suresh K, Howe J, Chong SY, Ng GC, Ho LC, Loh AK, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M (1994) Ultrastructural changes during in vitro encystment of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 80:327–335.
- Tan TC, Suresh KG (2006) Amoeboid form of *Blastocystis hominis* - a detailed ultrastructural insight. *Parasitology Research* 99: 737-742.
- Tan KSW (2008) New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 21:639–665.

- Tan KSW, Nasirudeen AMA (2005) Protozoan programmed cell death – insights from *Blastocystis* deathstyles. *Trends in Parasitology* 21:547–550.
- Tan KSW, Ng GC, Quek E, Howe J, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M (2000) *Blastocystis hominis*: A simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. *Experimental Parasitology* 96:9–15.
- Tan KSW, Singh M, Yap EH (2002) Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal for Parasitology* 32:789-804.
- Teow WL, Ng GC, Chan PP, Chan YC, Yap EH, Zaman V, Singh M (1992) A survey of *Blastocystis* in reptiles. *Parasitology Research* 78:453–455.
- Udkow MP, Markell EK (1993) *Blastocystis hominis*: prevalence in asymptomatic host. *The Journal of Infectious Diseases* 168:242-244.
- Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, Alaoui H (2013) *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 1:167–78.
- Wong KHS, Ng GC, Lin RTP., Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KSW (2007) Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology Research* 102:663–670.
- Zaman V, Ng GC, Suresh K, Yap EH, Singh M, Kent L, Road R (1993) Isolation of *Blastocystis* from the cockroach (*Dictyoptera: Blattidae*). *Parasitology Research* 79:73–74.
- Zaman V, Zaki M, Manzoor M, Howe J, Ng M (1999) Postcystic development of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 85:437–440.
- Zhang X, Qiao JY, Zhou X, Yao FR, Wei ZC (2007) Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and *in vitro*. *Parasitology Research* 101:43–51.
- Zhang X, Qiao J, Wu X, Da R, Zhao L, Wei Z (2012) *In vitro* culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *International Journal of Infectious Diseases* 16:23–28.
- Zierdt CH (1991) *Blastocystis hominis*-past and future. *Clinical Microbiology Reviews* 4:61–79.

- Zierdt CH, Williams RL (1974) *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. *Experimental Parasitology* 36:233–243.
- Zierdt CH (1973) Studies of *Blastocystis hominis*. *The Journal of Protozoology* 20:114– 21.
- Zuckerman MJ, Watts MT, Ho H, Meriano FV (1994) *Blastocystis hominis* infection and intestinal injury. *The American Journal of the Medical Sciences* 308:96–101