

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Zavedení experimentálního *in vivo* modelu pro studium střevního
prvoka rodu *Blastocystis***

Bakalářská práce

Jiřina Růžková

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, Ph.D.

České Budějovice 2016

Růžková, J., (2016): Zavedení vhodného experimentálního *in vivo* modelu pro studium střevního prvoka rodu *Blastocystis*. [Introduction of a suitable experimental *in vivo* model for the study of intestinal protist of the genus *Blastocystis*. Bc. Thesis, in Czech] – 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

For purposes of this study, several animal models were tested such as rat, mice and gerbil. Experiments were conducted with peroral infections of laboratory animals with *Blastocystis* ST1. Infectious doses were prepared using sucrose gradient from human biological material containing *Blastocystis* cysts. Samples from infected animals were evaluated using cultivation methods. Based on our results, the rat model seems to be the most optimal for the subsequent study of *Blastocystis* ST1.

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 21.4.2016

.....

Podpis

PODĚKOVÁNÍ:

Touto cestou bych ráda poděkovala především své školitelce MVDr. Kateřině Jirků, Ph.D., nejen za odbornou pomoc a rady při psaní této bakalářské práce, ale především za její skvělé vedení. Bez ní by tato práce nikdy nevznikla. Dále patří můj velký dík paní Janě Vášové, která mi byla vždy nápomocna při realizaci našich experimentů. Chtěla bych také poděkovat Laboratoři veterinární a medicínské protistologie, za možnost využít jejich pracoviště. Zároveň bych chtěla poděkovat celému našemu kolektivu za jejich pozitivní přístup a ochotu pomoci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala také rodině a příteli za jejich trpělivost a oporu v průběhu celého mého studia.

OBSAH

I. ÚVOD	1
1.1 Životní cyklus prvoka <i>Blastocystis</i>	1
1.1.1 Životní formy prvoka <i>Blastocystis</i>	2
1.2 Hostitelská specifita a genetická diverzita prvoka <i>Blastocystis</i>	3
1.3 Experimentální studie na zvířecích modelech	4
1.3.1 Experimentální způsoby infekce	4
1.3.2 Myší model	5
1.3.3 Potkaní model	6
1.3.4 Prasečí model	7
1.3.5 Kuřata	7
1.3.6 Pískomilové	8
1.4 Role prvoka <i>Blastocystis</i> v hostitelském organismu	8
II. Cíle práce	10
III. MATERIÁL A METODY	11
3.1 Laboratorní zvířata	11
3.2 Příprava infekčních dávek s cystami blastocyst	11
3.2.1 Sacharózový gradient	11
3.2.2 Perorální infekce experimentálních zvířat	13
3.2.3 Optimalizace infekčních dávek	13
3.4 Kultivace prvoka rodu <i>Blastocystis</i>	14
3.4.1 Kultivace vzorků	15
3.5 Vyhodnocování kultivovaných vzorků	16
3.5.1 Sběr vzorků	16
IV. VÝSLEDKY	17
4.1 Citlivost outbredních potkanů na infekci <i>Blastocystis</i> ST1	17
4.1.1 Infekce dospělých potkanů lidským biologickým materiálem pozitivním na ST1	17
4.1.2 Vliv věku potkanů na infekci ST1 buněk	17
4.1.3 Infekce potkanů biologickým materiálem z potkanů infikovaných ST1	18
4.2 Délka infekce ST1 u outbredních potkanů	18
4.3 Optimalizace infekčních dávek	18
4.4 Další vhodný experimentální <i>in vivo</i> model produkující cesty	19

4.4.1 Infekce vakuolárními formami.....	19
4.4.2 Infekce potkanů z trusu pozitivních pískomilů	19
V. DISKUSE	21
VI. ZÁVĚR.....	30
VII. POUŽITÁ LITERATURA	31

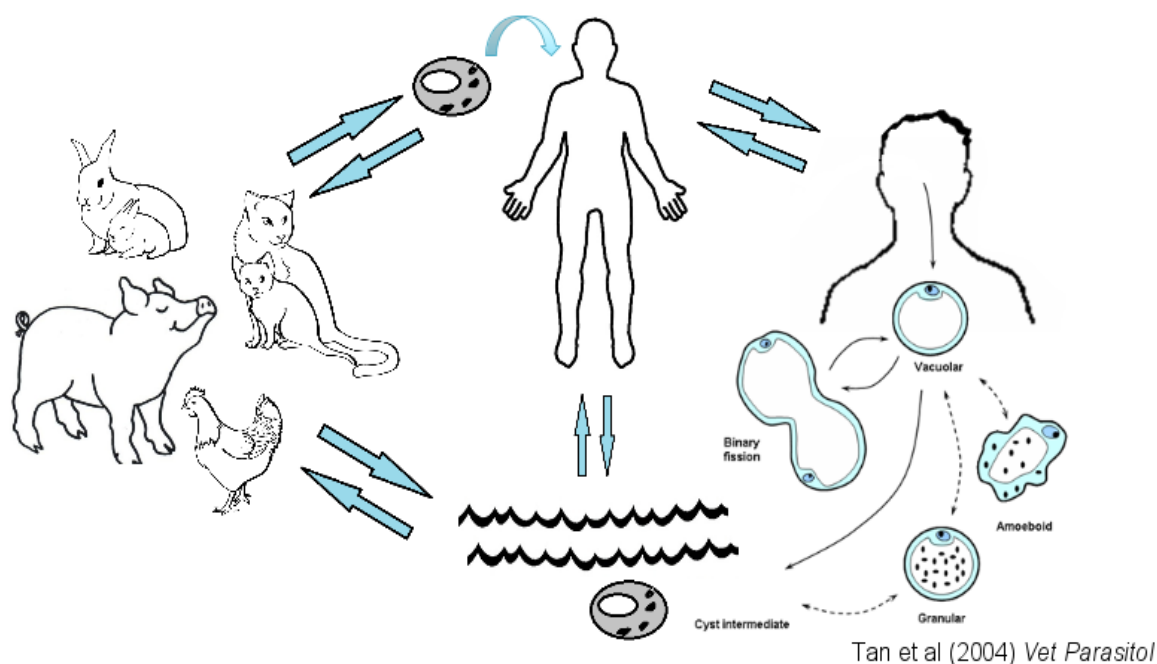
I. ÚVOD

Blastocystis je prvok žijící v anaerobním prostředí céka a kolonu mnoha živočišných druhů. Dlouhou dobu bylo obtížné zařadit *Blastocystis* do taxonomického systému. Ačkoli jeho taxonomické zařazení není stále zcela ustálené, je nyní řazen do taxonomické skupiny Stramenopiles (Arisue et al., 2002; Silberman et al., 1996). Nachází se nejen u člověka, ale též u mnoha jiných teplokrevných či studenkrevných obratlovců (Abe et al., 2002; Lorencová, 2014; Stensvold et al., 2009). Objeven byl také u některých bezobratlých, například u švábů (Zaman et al., 1993). Jedná se o kosmopolitně rozšířeného prvoka, jehož prevalence se u lidí pohybuje od 0,5% až do 100% v některých oblastech (Poirier et al., 2012; Scanlan a Stensvold, 2013). Rod *Blastocystis* je charakterizován vysokou genetickou variabilitou, u něhož byla zjištěna určitá míra hostitelské specifity (Affelani a kol., 2013; Stensvold a kol., 2007). Tento prvok má v životním cyklu čtyři základní formy: vakuolární, granulární, améboidní a stádium cysty. Právě formou cysty se tento prvok přenáší fekálně-orální cestou mezi hostiteli.

1.1 Životní cyklus prvoka *Blastocystis*

Do dnešního dne není životní cyklus *Blastocystis* zcela objasněn. Přenos mezi hostiteli je považován za přímý a zahrnuje několik životních forem (Parija a Jeremiah, 2013). Mnoho studií v minulosti polemizovalo o jeho rozmnožování v hostiteli (Boreham a Stenzel, 1993; Burghlea a Radulescu, 1991; 6; Zierdt, 1973). Stenzel a Boreham, (1996) popisují v životním cyklu blastocyst jako jediný prokazatelný způsob rozmnožování binární dělení. Ze vzorků získaných pomocí kolonoskopie ve studii Stenzel et al. (1991) byly popsány formy nacházející se *in vivo*, které jsou morfologicky odlišné od formy vakuolární nacházející se v kulturách. Tyto formy byly popsány jako avakuolární, multivakuolární a améboidní. Podle Stenzel a Boreham (1996) se právě multivakuolární forma diferencuje na cystu, která posléze infikuje hostitele fekálně-orální cestou. Na obrázku 1 je schématicky znázorněn životní cyklus *Blastocystis* spp. Tento přenos z hostitele na hostitele může být přímým kontaktem (Anuar et al., 2013). Dalším možný přenos cyst může být způsoben kontaminovanou pitnou vodou či nedostatečně omytými potravinami, které jsou taktéž kontaminovány cystami blastocyst (Lee et al., 2012; Li et al., 2007).

Obr 1. Životní cyklus *Blastocystis* (Podle podkladů Tan et al. (2004) vytvořila Jiřina Růžková).



1.1.1 Životní formy prvoka *Blastocystis*

Přestože se velikosti jednotlivých životních forem blastocyst a hlavně cyst pohybují v řádech několika mikrometrů, je možné je pozorovat světelnou mikroskopií. Jak už bylo zmíněno, životní cyklus blastocyst zahrnuje několik hlavních morfologických forem: vakuolární, améboidní, granulární, a stádium cysty (Chen et al., 1997; Parija a Jeremiah, 2013; Zhang et al., 2003).

Základním a také nejvíce prozkoumaným typem blastocyst je vakuolární forma (Stenzel a Boreham, 1996; Tan, 2008). Tato forma má tenkou buněčnou stěnu, obsahuje velkou centrální vakuolu a multičetná jádra na periferii. Vakuola zaujímá největší část buňky a omezuje tak velikost cytoplazmy a ostatních organel. Velikost vakuolární formy se pohybuje od 2 do 200 μm . Průměrná velikost je však v rozmezí 4 až 15 μm . Vyskytuje se v kultivačních mediích a byla pozorována i ve střevech hostitele. Ve studii Moe et al. (1997) při experimentálních infekcích u laboratorních myší pozorovali vakuolární formy *in vivo*, pouze s menší velikostí než vakuolární formy v *in vitro* kultuře. Granulární forma se vyvíjí z formy vakuolární a má také podobnou velikost (Zhang et al., 2012). Svůj název tato forma získala na základě přítomnosti jemných granulí různé hustoty v cytoplazmě, přičemž ve

středu buňky je velmi malá centrální část, která zůstává prázdná (Dunn et al., 1989). Améboidní forma má nepravidelný tvar a její velikost se pohybuje mezi 3-8 μ m (Singh et al., 1996; Tan a Suresh, 2006). Navíc u této formy byla popsána variabilita tloušťky její stěny a může tvořit pseudopodie. Další formou jsou cysty (Zhang et al., 2012). Cysty se za určitých podmínek tvoří v tlustém střevě a vylučují se do vnějšího prostředí, kde přežívají po určitý čas a případně infikují dalšího hostitele. Stádium cysty je rezistentní vůči nepříznivým podmínkám životního prostředí.

Dále se vyskytují ještě dvě málo známé formy blastocyst a to avakuolární a multivakuolární buňky (Stenzel et al., 1991; Boreham a Stenzel, 1993). Multivakuolární formy se vyznačují nepravidelností tvaru buňky, velkým počtem vakuol uvnitř buňky a velikost je 5 až 10 μ m (Boreham a Stenzel, 1993; Stenzel et al., 1991; Zhang et al., 2012). Avakuolární forma blastocyst je popisován jako malá buňka bez stálého tvaru a centrální vakuoly s velikostí 5 μ m (Stenzel et al., 1991; Zhang et al., 2012; Zierdt a Tan 1976). Dodnes však není známa jejich přesná funkce či role v životním cyklu.

U *Blastocystis* byla potvrzena schopnost apoptózy buněk v nepříznivých podmínkách (Nasirudeen et al., 2001). Pokud jsou blastocysty vystaveny aerobním podmínkám či jsou hostitelé léčeni antiparazitiky, jako např. metronidazolem, dojde k apoptóze (Tan et al., 2001; Nasirudeen et al., 2004).

1.2 Hostitelská specifita a genetická diverzita prvoka *Blastocystis*

Prvok rodu *Blastocystis* má širokou genetickou variabilitu, která je neustále předmětem mnoha probíhajících výzkumů (Clarck et al., 2013, Lorencová, 2014). Tato genetická variabilita je zjišťována pomocí molekulárně fylogenetických analýz na základě části malé ribosomální podjednotky RNA (18S rRNA), díky níž byl navíc rod *Blastocystis* taxonomicky zařazen mezi Stramenopiles (Silberman et al., 1996; Stensvold et al., 2007).

Díky studiím genetické diverzity se dodnes podařilo rozpoznat 17 různých subtypů označovaných ST1-17 (Stensvold et al., 2007; Stensvold, 2013). U těchto subtypů byla dále zjištěna určitá hostitelská specifita. Prvních devět (ST1 – ST9) bylo detekováno u člověka, přičemž častou infekci u lidí v Evropě způsobuje ST1 – ST4 (Özyurt et al., 2008). Subtyp ST9 byl zatím nalezen pouze u lidí (Yoshikawa et al., 2004a). Další subtypy (ST5-8, ST10-

17) se vyskytují u jiných teplokrevných obratlovců. Subtyp ST5 byla nejčastěji detekována u prasat, ST6 a ST7 u ptáků, a ST8 byl nalezen u primátů (Stensvold et al., 2009; Clark et al., 2013). Subtyp ST10 byl zjištěn jen u kopytníků a primátů (Stensvold et al., 2009). Subtypy ST11-ST13 byly objeveny u slonů, žiraf a klokanů quokka (Parker et al., 2010). V roce 2013 byl ST13 objeven u jelenovitých sudokopytníků (Alfellani et al., 2013). Subtyp ST14 byl objeven ve studii Fayer et al. (2012), kde byl detekován u mladých telat. Další subtypy byly nalezeny též ve studii Alfellani et al. (2013). Subtyp ST15 byl detekován u mléčného skotu, velbloudů a nehumánních primátů a nakonec subtypy ST16 a ST17 jsou spjaty s hlodavci (Alfellani a kol., 2013).

U většiny zatím popsaných subtypů byla zjištěna poměrně nízká hostitelská specifita a subtypy mohou infikovat i jiné hostitele, než u kterých byly původně popsány (Clark, 1997; Yoshikawa et al., 1996). Podle nové studie zabývající se genetickou diverzitou rodu *Blastocystis*, existuje dalších 21 subtypů, které byly nalezeny převážně ve studenokrevných obratlovcích (Lorencová, 2014).

1.3 Experimentální studie na zvířecích modelech

Pro detailnější studium hostitelské specifity a objasnění role blastocyst se používají experimentální zvířecí modely. Nejpoužívanější je myší model, dále bylo popsáno využití potkanů různých linií, pískomilů a prasat.

1.3.1 Experimentální způsoby infekce

Pro experimenty na zvířecích modelech je nezbytné zvolit vhodný způsob jejich infekce. Dodnes byly v literatuře popsány dva a to *per os* a *per rectum*. Perorální infekce neboli *per os* je založena na přirozené infekci hostitelů, která se děje fekálně-orálním přenosem stádií cyst z prostředí (Fayer et al., 2014; Tan, 2008; Parija a Jeremiah, 2013). Nicméně tento způsob je využíván také při experimentálních infekcích (např. Moe et al., 1997). V tomto případě se používá jícnová sonda k zavedení infekční dávky do hostitele.

Dalším způsobem využívaným při infekcích experimentálních zvířat je *per rectum*. Důvodem k využití tohoto způsobu infekce je použití jiných stádií než cyst, která nepřežijí kyselé prostředí žaludku. Tento způsob infekce byl využit například ve studii, ve které byla

zkoumána schopnost infekce různých subtypů *Blastocystis* (Iguchi a kol., 2007). Pro přípravu infekčních dávek použili 3 - 4 dny staré kultury blastocyst ST2-ST4 a ST7. Jednalo se tedy zřejmě o vakuolární formy. V této studii infikovali tři týdenní Wistar potkany a kuřata pomocí zavedení injekční stříkačky do rekta či kloaky.

1.3.2 Myší model

Nejčastěji využívaným *in vivo* modelem jsou myši (Elwakil et al., 2010; Pakandl, 1992; Yao et al., 2005). Nicméně tento model je pro infekce blastocyst limitován věkem a délkou infekce. Autoři studie Moe et al. (1997) zjistili, že myši lze infikovat pouze mezi 3. až 8. týdnem věku. Myši starší osmi týdnů již nelze infikovat. Níže jsou popsány některé experimenty.

Ve studii Moe et al. (1997) infikovali Balb/c myši různého věku, a to dvou, čtyř, šesti a osmi týdnů staré. Cysty byly izolovány koncentrační metodou z čerstvého trusu člověka pozitivního na blastocysty. Koncentrace cyst v infekčních dávkách byla $10^6 - 10^4$. Tato infekce u Balb/c myši se ukázala jako „self-limitující“ a krátkodobě přetrvávala. Studie byla provedena za účelem objasnit patogenní potenciál *Blastocystis*. V experimentu byly použity cysty *Blastocystis hominis*, bez udání přesného subtypu.

Další studie, která byla provedena na myším modelu, měla za cíl objasnit souvislost mezi intenzitou infekce a patogenitou *Blastocystis* (Elwakil a kol., 2010). Bílé laboratorní myši (*Mus musculus*) byly perorálně infikovány cystami získaných z lidských vzorků. Pátnáct myši bylo rozděleno do tří skupin, přičemž každá skupina byla infikována jinou koncentrací cyst. Skupina I dostala v infekční dávce 10^2 cyst, skupina II byla nainfikována 10^5 a skupina III dostala 4×10^7 . Z výsledků vychází, že myši ve skupině I byli negativní, zatímco zvířata ve skupině II a III byla pozitivní. Myši ve skupině III vykazovali klinické symptomy a to letargii, pomalé pohyby a pokles tělesné hmotnosti. Bohužel zde opět neuvádí subtyp, popisují pouze *Blastocystis hominis*.

1.3.3 Potkaní model

Dalším experimentálním *in vivo* modelem jsou potkani. Tento model není tak často využíván jako model myši, nicméně na něm lze lépe provádět detailnější a dlouhodobější výzkumy blastocyst různých subtypů (např. Hussein et al., 2008; Li et al., 2013).

Ve studii s cílem prokázat přenosnost *Blastocystis* mezi hostiteli (Yoshikawa a kol., 2004b), byli použiti tři týdny staří „Specific Pathogen Free“ (SPF) Wistar potkani. Potkani byli infikováni dvěma různými kmeny *Blastocystis hominis* a to RN94-9 izolovaný z potkana hnědého (*Rattus norvegicus*) a NIH:1295:1 z morčete domácího (*Cavia porcellus*). Koncentrace cyst v infekčních dávkách byla 10^2 – 10^6 cyst. Zvířata byla pozorována fekální kultivací po dobu dvou týdnů. U potkana, infikovaného kmenem RN94-9, byla pozitivita potvrzena už pátý den od začátku experimentu, zatímco u kmene NIH:1295:1 byl potkan pozitivní až 15. den od začátku experimentu.

Další studie, která měla za cíl zjistit vliv genotypu *Blastocystis* na histopatologické změny v organismu, využila izolátů od 85 symptomatických a asymptomatických pacientů (Hussein et al., 2008). U pacientů se vyskytovali subtypy ST1-4. Autoři této studie vyloučili vzorky stolice pozitivní i na jiné střevní organismy jako například *Cryptosporidium*. Ze získaných vzorků byla provedena izolace DNA a genotypizace *Blastocystis* pomocí PCR. Dále proběhla experimentální perorální infekce pomocí jícnové sondy čtyř týdnů starých potkanů Wistar, s infekční dávkou 4×10^7 buněk. Potkani byly rozděleny do čtyř skupin podle počtu použitých izolátů a byli pozorováni po dobu dvou týdnů. Posléze byla provedena pitva s cílem zjistit, zdali došlo k proniknutí blastocyst do *lamina propria* či došlo k jiným histopatologickým změnám. Výsledky experimentu ukázaly korelace mezi různými subtypy a projevem či absencí klinických symptomů. Pouze subtyp ST1 vyvolal u některých zvířat pato-morfologické změny a klinické projevy infekce jako například ztráta srsti, úbytek hmotnosti a mortalitu. Navíc autoři této studie konstatovali i negativní dopad subtypu ST3 zdravotní stav potkaního organismu. Naopak se zdá, že subtypy ST2 a ST4 nijak zdraví hostitele neovlivňují.

Naproti tomu existuje studie, jejíž výsledky přinesly zcela jiný závěr (Li et al. (2013) Autoři studie tvrdí, že ST1 nemá patogenní vliv na hostitelský organismus a jeho případná patogenita je dána spíše individuálními fyziologickými faktory hostitele než působením samotného subtypu. Pro perorální infekci použili šest týdnů starých SPF Sprague Dawley

(SD) potkanů. K infekcím využili vzorky ST1 izolované z pacienta trpícího průjmovým onemocněním a s detekovanou infekcí *Blastocystis* ST1. Koncentrace infekčních dávek byla 10^2 - 10^4 cyst.

Dále například ve studii Suresh et al. (1995) využívali potkany pro morfologické studium blastocyst.

1.3.4 Prasečí model

Dalším modelem je prase domácí. Bohužel pro vysoké finanční náklady je tento model málo využíván. Fayer et al. (2014) provedl na prasatech experiment pro objasnění lokalizace *Blastocystis* v jejich gastrointestinálním systému. Do tohoto experimentu bylo použito 32 zdravých 20 týdnů starých prasat. Ta byla umístěna do samostatných kotců s betonovou podlahou, přesto v úzkém kontaktu. Prasata byla krmena zeleninou podle své váhy a voda byla *ad libitum* a byla každý týden zvážena. Nakonec se bylo vybráno 11 prasat s přirozenou infekcí *Blastocystis* spp. Prasata byla usmrcena a následně jim byl vyjmut travicí trakt. Ten byl rozdělen na několik částí, duodenum, jejunum, ileum a cékum. Výkaly z prasat byly zkoumány imunofluorescenční mikroskopií za použití protilátky ParaFlor B. Tkáně byly histologicky zpracovány a obarveny hematoxylinem a eosinem. U všech prasat byla prokázána pozitivita pouze v céku a v lumenu některých částí tlustého střeva a byl zjištěn subtyp ST5. Žádné narušení epitelu či *lamina propria* nebyla pozorována. V barvených histologických vzorcích nešli rozeznat jednotlivé životní formy *Blastocystis*. U prasat nebyla prokázána změna zdravotního stavu.

1.3.5 Kuřata

Dalším laboratorním zvířetem využitým pro studium *Blastocystis* byla kuřata (Iguchi et al., 2007). Tato studie zaměřená na objasnění zoonotického potenciálu u blastocyst využila ke svému výzkumu čerstvě vylíhlá kuřata Hy-Line a tři týdny staré SPF Wistar potkany. K infekci použili subtypy ST2, ST3, ST4 a ST7 izolované z lidského biologického materiálu. Po napočítání buněk (10^5), za použití hematocytometru, byly buňky okamžitě rektálně vstříknuty do slepého střeva zvířete. Tato infekce se provádí chirurgicky za použití injekční stříkačky s jehlou. Po dvou týdnech od infekce byla zvířata usmrcena a proběhla pitva, která

prokázala přítomnost cyst ve slepém střevě. Podle výsledků studie subtyp ST4 a ST7 byl přenosný jak na potkany, tak i na kuřata. Zatímco subtypem ST2 byly nainfikována pouze kuřata. Subtyp ST3 se však neukázal ani v jednom infikovaném hostiteli.

1.3.6 Pískomilové

Pískomilové nejsou běžným zvířecím modelem pro studium blastocyst jako ostatní laboratorní hlodavci, přesto se s nimi v některých studiích můžeme setkat. Příkladem může být studie Pakandl (1992), kde využil infekci několika zvířat za účelem zjistit míru hostitelské specifity blastocyst. Autor této studie použil inbrední Balb/c myši, pískomily a outbrední laboratorní myši. Infekční dávky byly 2×10^5 - 10^6 buněk pro myši a 5×10^5 - 2.5×10^6 buněk pro pískomily. Cysty blastocyst byly izolované ze vzorků prasat. Zvířata byla perorálně nainfikována. Podle výsledků byly Balb/c myši méně citlivé než outbrední myši. Bohužel zde neuvádí subtyp *Blastocystis*.

1.4 Role prvoka *Blastocystis* v hostitelském organismu

Donedávna byly blastocysty považovány za patogenního prvoka a jeho výskyt byl často spojován se střevním onemocněním zvaným syndrom dráždivého tračníku [Irritable Bowel Syndrome - IBS] (Poirier et al., 2012) nebo se zhoršeným zdravotním stavem pacientů s imunitně zprostředkovanými střevními záněty [např. Inflammatory Bowel Diseases - IBD] (Petersen et al., 2013). Například autoři studie Boorom et al. (2008) zjistili 30-40% prevalenci blastocyst u pacientů s IBS a pojali podezření, že přítomnost blastocyst má souvislost s projevem onemocnění. Tato studie a mnoho dalších podobných studií podpořily myšlenku patogenního potenciálu blastocyst (Clark et al., 2013). Nicméně patogenita *Blastocystis* spp. zůstává sporná a je v současné době předmětem diskuze (např. Scanlan a Stensvold, 2013). Nedávno začaly vyplouvat názory, že blastocysty jsou komenzální organismy, které jsou běžnou součástí zdravého střevního mikrobiomu lidí (Andersen et al., 2013; Parfrey et al., 2014; Scanlan a Stensvold 2013). Navíc výsledky několika studií prokázaly vyšší prevalence blastocyst u zdravých lidí než u lidí postižených IBS či IBD (El-Safadi et al., 2014; Petersen et al., 2013), i jiných savců (Parfrey et al., 2014). Na základě těchto informací se někteří odborníci přiklánějí i k hypotéze, že blastocysty jsou člověku

prospěšné a případně by mohly napomoci v prevenci či terapii pacientů trpících IBS nebo IBD (Lukeš et al., 2015; Scanlan a Stensvold, 2013; Scanlan et al., 2014).

II. Cíle práce

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo vybrat vhodný experimentální *in vivo* model, který bude následně využit pro výzkum prvoka rodu *Blastocystis* subtyp ST1.

Na vhodném experimentálním modelu bude možné sledovat vliv infekce *Blastocystis* ST1 na imunitní systém a diverzitu střevního mikrobiomu hostitelského organismu. Pro účely této práce byly vytyčeny tři cíle:

- experimentálně potvrdit citlivost outbredních SPF potkanů k infekci lidského subtypu *Blastocystis* ST1;
- experimentálně zjistit, jak dlouho přetrvává infekce *Blastocystis* ST1 v outbredních SPF potkanech;
- nalézt další vhodný experimentální zvířecí model, který bude produkovat cysty *Blastocystis* ST1;

III. MATERIÁL A METODY

3.1 Laboratorní zvířata

V rámci experimentů byly použity SPF (Specific Pathogen Free) outbrední potkani Wistar, dále bílé myši (CD1), mastomyši (*Mastomys coucha*) a pískomilové (*Meriones unguiculatus*), kteří jsou chováni v akreditovaném zvěřinci Parazitologického ústavu (Biologické centrum AV ČR v.v.i., České Budějovice). Všechna zvířata byla chována ve standardních podmínkách v chovných boxech a dostávala vodu a granule *ad libitum*. Granule obsahovaly kompletní krmnou směs. Optimální teplota se pohybovala v rozsahu 20-24°C a světelný režim byl v prostorech bez přirozeného denního světla upraven na 12h tmy a 12h světla. V pokusu jsme vždy použili dvě skupiny zvířat a to experimentální a kontrolní.

3.2 Příprava infekčních dávek s cystami blastocyst

Pro účely přípravy infekčních dávek jsme použili sacharózový gradient. Infekční dávky byly připravovány ze stolice člověka pozitivního pro *Blastocystis* subtyp ST1 (dále „ST1“), dále potkanů a pískomilů infikovaných buňkami ST1.

3.2.1 Sacharózový gradient

Principem sacharózového gradientu je zakoncertovat cysty prvoků s použitím roztoků s různou měrnou hmotností (Arrowood & Sterling, 1987). V našem případě se jednalo o získání co nejčistší suspenze cyst prvoka *Blastocystis* ST1 pro následnou přípravu infekčních dávek.

Přehled chemikálií pro přípravu sacharózových roztoků:

- 20% Tween (Sigma-Aldrich)
- Koncentrované PBS
- Sheatherův cukerný roztok

Příprava sacharózových roztoků:

Pro přípravu jednotlivých sacharózových roztoků s rozdílnými měrnými hmotnostmi bylo potřeba nejprve připravit zásobní roztok obsahující PBS a 20% Tween (dále „roztok PBS+Tween“). Do zásobní láhve bylo nalito 900 ml destilované vody, do které se přidalo 100 ml koncentrovaného PBS a 0,5 ml 20% Tweenu. Roztok bylo nutné důkladně rozmíchat. Z takto připraveného zásobního roztoku byly připraveny následující dva roztoky s různým ředěním:

- 1) ředěný sacharózový roztok (1+2): 100 ml Sheatherova roztoku + 200 ml PBS + Tween
- 2) ředění sacharózový roztok (1+4): 50 ml Sheatherova roztoku + 200 ml PBS + Tween

Postup přípravy infekčních dávek:

Odebraný vzorek stolice s buňkami ST1 byl nejprve rozmělněn s vodou pomocí třecí misky. Dále byl homogenizovaný vzorek dvakrát filtrován přes jemné sítko, aby se zachytily nečistoty z biologického materiálu. Filtrovaný vzorek byl zkoncentrován odstředěním v 50 ml plastových centrifugačních zkumavkách kónického typu při otáčkách 2000 rpm po dobu 5 min v centrifuze (Heraeus Multifuge 4KR, Thermo Scientific). Ze zkumavek byl opatrně odstraněn přebytečný supernatant, tak aby výsledný objem vzorku byl 60 ml. Výsledný homogenát se důkladně a rovnoměrně rozmíchal na vortexu (V-1 plus, Biosan). Mezitím byly připraveny čtyři skleněné kyvety s kulatým dnem, každá o objemu 100 ml, pro provedení samotného sacharózového gradientu. Do každé 100 ml kyvety bylo odměřeno 30 ml vychlazeného sacharózového roztoku s ředěním (1+2). Plastovou pasterovou pipetou se na tento roztok opatrně navrstvilo 30 ml druhého sacharózového roztoku s ředěním (1+4), který má nižší měrnou hmotnost. Vrstvení jednotlivých složek gradientu bylo nezbytné provádět velmi pomalu a po stěně zkumavky, tak aby se vytvořila gradientová vrstva mezi oběma roztoky. Nakonec byla stejným způsobem navrstvena poslední vrstva s 15 ml homogenátu vzorku.

Všechny zkumavky byly vloženy do krytek a vyváženy pro účely odstředování. Zavíčkované krytky s naplněnými kyvetami byly zváženy a vloženy do centrifugy s výkyvným rotorem (Hettich Universal 16R, Maneko) a odstředovány při 3500 rpm, po dobu 20 min a při teplotě 5°C. Po odstředění se odstranila pomocí odsávačky cca 5 mm horní vrstva gradientu a veškerý zbylý supernatant se přenesl do čistých kyvet, které byly znovu zváženy a

odstředěny při stejných podmínkách. Posléze byla odsáním odstraněna další vrstva zasahující přibližně do poloviny sloupce v kyvetě a ta byla doplněna destilovanou vodou. Zkumavky byly opět zváženy a odstředěny při stejných podmínkách. Celý tento proces byl opakován třikrát. Po posledním odstranění vrstvy homogenátu, zbyly ve všech zkumavkách cca 3 cm vrstvy s cystami *Blastocystis* ST1. Tato byla přelita do kónické plastové centrifugační zkumavky o objemu 50 ml a odstředěna při 3500 rpm, po dobu 20 min. Ze vzorku byla následně opatrně odsáta přebytečná vrstva supernatantu, tak aby nedošlo ke zbytečným ztrátám buněk, a tím byl vzorek zakonzentrován do minimálního možného objemu, ze kterého byly vytvořeny infekční dávky.

Objem infekčních dávek byl zvolen na základě velikosti a druhu infikovaného zvířete (tj 250 μ l pro potkana a 150 μ l pro myši a pískomily). Intenzita infekce (tj. počet cyst na 1 ml) byla vyhodnocována pomocí Bürkerovy komůrky a používaná intenzita infekce se pohybovala mezi 10^3 - 10^4 cyst.

3.2.2 Perorální infekce experimentálních zvířat

Infekce zvířat probíhala pomocí jícnové sondy. Jícnová sonda se skládala z injekční stříkačky o objemu 2 ml a odnímatelného nástavce, který byl zahnutý tak, aby zvířata nebyla při infekcích zraněna. Nástavec byl sterilizován v horkovzdušné sušičce při teplotě 60°C po dobu 2 hodin a poté byl sterilně nasazen na injekční stříkačku. Před samotnou infekcí byla zvířata pevně fixována jednou osobou a druhá osoba aplikovala infekční dávku zavedením sondy do jícnu zvířete. Samotná infekce blastocyst experimentálních hlodavců byla detekována v pravidelně odebíraných vzorcích trusu v tří denních intervalech a byly kultivovány v Jonesově médiu při 37°C.

3.2.3 Optimalizace infekčních dávek

Pročištění buněk ST1 v chlornanu sodném

Pro využití v dalších experimentech zabývajících se složením střevní mikroflóry a jejímu vlivu na organismus, jsme se rozhodli pro ošetření infekčních dávek chlornanem sodným. Zvolili jsme tuto metodu, abychom se tak zbavili střevních bakterií a zjistili, zdali je možné potkany infikovat takto připravenou infekční dávkou.

Postup:

Předem připravená infekční dávka s cystami ST1 byla odstředěna při 800 rpm po dobu 8 min v centrifuze (Heraeus Multifuge 4KR, Thermo Scientific). Po odstředění byl opatrně odsát supernatant a byl přidán 1 ml 10% chlornanu sodného. Poté byla zkumavka s infekčním materiálem ponořena do 500 ml kádinky z poloviny naplněnou ledem a přidáním magnetickým míchadlem. Vzorek byl pak ponechán pomalému míchání na magnetické míchače po dobu 10 min. Po promísání byla suspenze odstředěna při 800 rpm po dobu 8 min. Vzniklý supernatant byl odsát a objem zkumavky byl doplněn destilovanou vodou. Suspenze byla odstředěna při stejných podmínkách. Supernatant. Tento proces promývání byl zopakován celkově třikrát, aby byla suspenze cyst dostatečně promyta od chlornanu sodného. Potkani byli infikováni perorálně.

Získání vyšší výtěžnosti cyst v infekční dávce u laboratorních zvířat

Za účelem navýšení šance úspěšné infekce experimentálního zvířete a zároveň zjištění, zdali je možno cysty ST1 uchovávat v životaschopném stavu i mimo hostitelský organismus, jsme provedli experimenty s uchováváním pozitivních vzorků. Po dobu tří dnů byly sbírány vzorky trusu od infikovaných zvířat a následně uchovávány ve dvou roztocích a to: PBS a dvojchromanu draselném v chladničce. Po třech dnech byly vytvořeny infekční dávky pomocí sacharózového gradientu a následně jimi byli perorálně infikováni potkani. Jako pozitivní kontrola byly vytvořeny infekční dávky od lidského donora s ST1.

3.4 Kultivace prvoka rodu *Blastocystis*

Pro účely detekce přítomnosti buněk ve vzorcích trusu experimentálních zvířat zkoumaného prvoka *Blastocystis* jsme využili xenickou kultivaci s použitím Jonesova média.

Modifikované Jonesovo médium

Jonesovo médium se v běžné praxi používá jako diagnostické médium pro detekci buněk *Blastocystis* ve vzorcích stolice lidí. Původně Jonesovo médium zavedl W. R. Jones (Jones, 1946), později bylo modifikováno (Zaman et al., 1994; Leelayoova et al., 2002). Médium se

dlouhodobě neskladuje, připravuje se vždy čerstvé. Může se však krátkodobě uchovávat v lednici.

Přehled chemikálií pro přípravu média:

- 0,946g Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich)
- 0,908g KH₂PO₄ (Lach-ner)
- 1,800g NaCl (Sigma-Aldrich)
- 0,230g Kvasničný extrakt (Duchefa Biochemie)
- 10% Inaktivované koňské sérum (Sigma-Aldrich)

Postup přípravy média:

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky. Příprava probíhala rozpuštěním jednotlivých navážek ve 100ml destilované vody (100 ml H₂O + 0,946 g Na₂HPO₄; 100 ml H₂O + 0,908 g KH₂PO₄; 100 ml H₂O + 1,8 g NaCl). Ze zásobních roztoků bylo smícháno 31,2 ml Na₂HPO₄, 10,4 ml KH₂PO₄ a 187,5 ml NaCl. Přidalo se 0,23 g kvasničného extraktu a roztok se sterilizoval v autoklávu jednu hodinu při 80°C. Po vychladnutí bylo přidáno do sterilizovaného roztoku 25,4 ml koňského séra. Takto připravené médium bylo následně sterilně prepipetováno do kultivačních zkumavek po 4 ml.

3.4.1 Kultivace vzorků

Xenická kultivace v Jonesově médiu se využívá k diagnostice buněk *Blastocystis*, v kterém se blastocysty mírně množí a po určitý čas přežívají. Před samotnou kultivací vzorku bylo médium v kultivační zkumavce předeřháto při 37°C v termostatu a poté byl přidán vzorek trusu o velikosti hrášku. Celá kultivace se opět uchovávala při stálé teplotě 37°C po dobu 3-4 dnů. Poté bylo 50-100 µl kultivovaného vzorku přeočkovovalo pomocí sterilní pasterovy pipety do předem předeřhátého čerstvého média. Při přeočkování bylo nezbytné pracovat rychle, jelikož kyslík je pro buňky *Blastocystis* toxický. Manipulace s biologickým materiálem probíhala vždy důsledně v digestoři. Kultivace byly posléze vyhodnocovány s použitím světelného mikroskopu (Olympus CX22LED) při zvětšení 400×.

3.5 Vyhodnocování kultivovaných vzorků

3.5.1 Sběr vzorků

Sběr trusu probíhal vždy v rukavicích se sterilní pinzetou do předem připravené bakteriologické zkumavky s uzávěrem. V periodě od začátku experimentu až do detekování prvních buněk ST1, jsme sbírali směsné vzorky trusu od všech infikovaných jedinců ze stejného chovného boxu. Po zjištění první přítomnosti ST1 buněk v kultivaci jsme vzorky sbírali jednotlivě, aby se zjistilo, který jedinec je pozitivní na infekci buňkami ST1.

U prvních experimentů, než jsme zjistili délku inkubační doby infekce *Blastocystis* ST1, jsme vzorky experimentálních zvířat sbírali a kultivovali od prvního dne po infekci každý den. Na základě délky zjištěné inkubační doby (tj. 12 dní po infekci), jsme vzorky trusu odebírali až od 7. dne po infekci (dále „dpi“).

IV. VÝSLEDKY

Pro účely optimalizace zvířecího experimentálního modelu jsme potřebovali zdroj infekce ST1 cyst. Donor ST1 byl vytipován v rámci studie, prováděnou Laboratoří parazitární terapie, v které se zjišťovali prevalence prvoka *Blastocystis* a jeho subtypů u zdravých jedinců pomocí kultivace v Jonesově médiu a pomocí molekulární typizace subtypů. Pro optimalizaci zvířecího experimentálního modelu jsme vybrali donora s infekcí ST1, protože to byl nejčastěji se vyskytující se subtyp (nepublikovaná data).

4.1 Citlivost outbredních potkanů na infekci *Blastocystis* ST1

V rámci zjišťování citlivosti outbredních Wistar potkanů, jsme provedli následující experimenty. U všech níže popsaných infekčních experimentů na potkanech, jsme jako negativní kontrolu využili kultivaci jejich trusu před samotným experimentem. Tímto způsobem jsme se ujistili, že jsou potkani vždy negativní pro jakýkoliv subtyp blastocyst a naše výsledky tak nebudou zkresleny. Detailně jsou experimenty s výsledky popsány níže.

4.1.1 Infekce dospělých potkanů lidským biologickým materiálem pozitivním na ST1

Cílem experimentu bylo zjistit citlivost Wistar potkanů pro infekci *Blastocystis* ST1. V experimentu byly infikováni potkani cystami prvoka *Blastocystis* ST1 a následně byli sledováni pomocí kultivace, zda a kdy se infekce projeví. Infekce byla u potkanů kultivačně potvrzena 7 dpi.

4.1.2 Vliv věku potkanů na infekci ST1 buněk

Cílem experimentu bylo zjistit vliv věku potkanů na infekci ST1. Proto jsme provedli experiment s infekcemi potkanů různých věkových kategorií a to tří měsíců, čtyř měsíců a pěti měsíců, vždy po třech zvířatech. U všech věkových kategorií byly infekce úspěšné.

4.1.3 Infekce potkanů biologickým materiálem z potkanů infikovaných ST1

Cílem experimentu bylo zjistit, zda je možné infikovat outbrední potkany biologickým materiálem z potkanů infikovaných ST1. V rámci tohoto experimentu jsme vždy infikovali čtyři potkany. V experimentu jsme připravili infekční dávky z trusu potkanů pozitivních na ST1. Kromě výše popsané negativní kontroly, byla použita i pozitivní kontrola a to infekční dávky připravené z lidského materiálu pozitivního pro ST1. Tato pozitivní kontrola byla zvolena na základě 100% úspěšnosti při infekcích potkanů. Bohužel výsledek tohoto experimentu vyšel negativní, kromě pozitivní kontroly. Tento experiment jsme se rozhodli provést ještě jednou, abychom si potvrdili první negativní výsledek a mohli vyloučit všechny faktory (např. metodické chyby), které by mohly výsledek ovlivnit. I v druhém experimentu byly infekce neúspěšné.

4.2 Délka infekce ST1 u outbredních potkanů

Pro ověření cíle, jak dlouho přetrvává infekce ST1 v outbredních potkanech jsme dlouhodobě sledovali dva pozitivní potkany. Vzorky trusu byly odebírány a kultivovány v Jonesově médiu každý týden po dobu několika měsíců dokud nebylo zjištěno, že jsou potkani negativní. Dle našich výsledků, infekce přetrvávala po dobu jednoho roku u obou potkanů. Potkani byly sledováni ještě další měsíc po ústupu infekce a zůstali kultivačně negativní.

4.3 Optimalizace infekčních dávek

Cílem experimentu bylo dosažení infekčních dávek bez bakterií. Infekční dávky s cystami byly ošetřeny 10% roztokem chlornanu sodného (na základě zkušeností laboratoře manipulující s cystami *Giardia intestinalis* a kryptosporidií, nepublikovaná data). Všechny infekce potkanů jak z biologického materiálu z potkanů, tak z lidského byly neúspěšné.

Dále pro větší výtěžnost cyst v infekčních dávkách jsme infikovali potkany s použitím infekčních dávek, které byly připraveny z trusu potkanů uchovávaného po dobu tří dnů v PBS a dvojchromanu draselného v chladničce. Všechny infekce potkanů byly neúspěšné kromě pozitivní kontroly, tj. potkana infikovaného z pozitivního lidského materiálu.

4.4 Další vhodný experimentální *in vivo* model produkující cisty

Pro nalezení dalšího vhodného *in vivo* laboratorního modelu pro udržení ST1 v kultuře jsme provedli infekce dalších laboratorních hlodavců z lidského biologického materiálu a to bílé myši (CD1), mastomyši (*Mastomys coucha*) a pískomily (*Meriones unguiculatus*). Infekce jsme provedli u dvou věkových kategorií: (i) mladších 8 týdnů a (ii) starších 8 týdnů. Věkové kategorie byly zvoleny na základě literatury, kde bylo zjištěno, že infekce u myši (CD1) je „self-limitující“ a infekce je úspěšná pouze mezi 3. a 8. týdnem věku (Moe et al., 1997). Úspěšné se ukázaly infekce pouze u pískomilů a to obou věkových kategorií. Infekce byla kultivačně potvrzena 5 dní p. i. U CD1 myši a mastomyši infekce nebyly úspěšné.

4.4.1 Infekce vakuolárními formami

Většina izolátů *Blastocystis* je uchovávána v kultivační podobě obsahující pouze vakuolární formy a tudíž je nemožné je využít pro experimenty s infekcemi laboratorních zvířat. Na obrázku 2 je znázorněna vakuolární forma *Blastocystis* ST1 v Jonesově médiu. Pro studium různých subtypů blastocyst je nezbytné najít vhodný *in vivo* model, který by bylo možné infikovat vakuolárními formami blastocyst. Na základě zkušeností laboratoře manipulující se střevním prvokem *Giardia intestinalis*, kdy infikují jejichmi trofozoity z kultur pískomily (*Meriones unguiculatus*), kteří následně vylučují cisty, jsme se rozhodli vyzkoušet infekce pískomilů vakuolárními formami ST1 z kultur v Jonesově médiu. V tomto experimentu byly použity dva jedinci pískomilů, kteří byly infikováni vakuolárními formami buněk ST1. Tento pokus se nezdařil a pro ověření byl experiment zopakován. V opakovaném experimentu se poté ukázala pozitivní infekce u obou pískomilů.

4.4.2 Infekce potkanů z trusu pozitivních pískomilů

Pro zjištění, zdali je pískomil opravdu vhodným laboratorním modelem, který produkuje cisty, bylo nutné provést další experiment. V tomto experimentu byly infikováni čtyři potkani z trusu pozitivních pískomilů infekčními dávkami připravenými opět pomocí sacharózového gradientu. Nicméně všichni potkani byli po uplynutí inkubační doby kultivačně negativní kromě pozitivní kontroly. Pro ověření výsledku jsme se rozhodli experiment zopakovat, avšak i tentokrát byl výsledek negativní.



Obr 2. Vakuolární forma *Blastocystis* ST1 v Jonesově médiu (měřítko 20 μm).



Obr 3. Stádium cysty *Blastocystis* ST1 v infekční dávce z lidského biologického materiálu (měřítko 5 μm).

V. DISKUSE

Donedávna byly blastocysty považovány za patogenního prvoka a jeho výskyt byl často spojován se střevním onemocněním zvaným syndrom dráždivého tračníku [IBS] (Poirier et al., 2012) nebo se zhoršeným zdravotním stavem pacientů s imunitně zprostředkovanými střevními záněty [např. IBD] (Petersen et al., 2013). Nicméně patogenita blastocyst ve střevním traktu člověka zůstává sporná a je v současné době předmětem diskuze (např. Scanlan a Stensvold, 2013). Nedávno se začali objevovat názory, že se jedná o komenzála, který je běžnou součástí zdravého střevního mikrobiomu a pomáhá udržovat jeho potřebnou diverzitu (Andersen et al., 2013; Parfrey et al., 2014). Aby tyto souvislosti mohly být prokázány je potřeba provést experimentální studie v laboratorních podmínkách. Na vhodném zvířecím (*in vivo*) modelu bude možné demonstrovat jak samotné infekce blastocyst a jejich subtypů ovlivňují imunitní systém hostitele a složení střevního mikrobiomu. Pro účely naší laboratoře jsme se rozhodli zavést vhodný laboratorní model, na kterém bude možné detailněji studovat *Blastocystis* ST1.

Zavedení SPF potkaního modelu pro studium prvoka *Blastocystis* ST1

Potkani jako experimentální model byly úspěšně použiti již dříve v několika studiích (např. Hussein et al., 2008; Chen et al., 1997; Iguchi et al., 2007; Li et al., 2013; Suresh et al., 1995; Yoshikawa et al., 2004b). Na základě těchto studií jsme se i my rozhodli zavést potkaní model v našich laboratorních podmínkách. Díky probíhající epidemiologické studii v naší laboratoři, zaměřené na zjištění prevalence blastocyst a jejich subtypů u zdravých lidí v ČR jsme získali donora cyst *Blastocystis* ST1. Pro začátek naší práce jsme zvolili subtyp ST1, protože byl naším nejčastěji detekovaným subtypem. Na obrázku 3 je znázorněna cysta *Blastocystis* ST1 z lidského biologického materiálu.

V průběhu studie, provedené za účelem zavedení potkaního modelu, jsme se zaměřili na infekci potkanů infekčními dávkami ST1 připravenými ze vzorků stolice našeho donora. V těchto experimentech jsme infikovali celkem 18 potkanů. Kromě dvou potkanů, u všech ostatních byla kultivačně prokázána infekce blastocyst. Negativitu u zbylých dvou potkanů, které jsme znovu infikovali, si vysvětlujeme metodickou chybou při přípravě sacharózového gradientu. Během pokusu, kde jsme měli dva již zmíněné negativní potkany, jsme se také

pokoušeli o optimalizaci infekčních dávek. Je tedy možné, že za neúspěšnou infekci může právě změna faktorů nutných pro zdárnou infekci. Výsledkem všech provedených experimentů byla tedy téměř 100% úspěšnost infekcí potkanů. Tento typ infekce potkanů s použitím infekčních dávek připravených ze stolice lidského donora jsme dále využívali jako pozitivní kontrolu.

V naší studii jsme použili outbrední SPF Wistar potkany a ti se zdají být citlivým hostitelem pro infekci *Blastocystis* ST1. Hussein et al. (2008) také úspěšně použil Wistar potkany pro účely experimentální studie. Nicméně laboratorní potkani se zdají být citlivým hostitelem pro infekce blastocyst v širším měřítku, protože autoři studie Li et al. (2013) také dosáhli úspěšných infekcí *Blastocystis* ST1 u jiné outbrední linie potkanů, konkrétně Sprague Dawley. Dalším krokem k ověření vhodnosti potkana jako odpovídajícího experimentálního modelu pro studium blastocyst bude nezbytné experimentálně potvrdit citlivost i inbredních linií laboratorních potkanů.

Náš výběr experimentálního modelu pro studium vlivu blastocyst na hostitelský organismus také vycházel z popsaných faktů o myších modelech. Myši jsou sice mnohem užívanější jako experimentální laboratorní zvířata, ale v případě blastocyst je tento model velmi limitován. Zásadní překážkou jeho využití pro studium blastocyst jsou její „self-limitující“ infekce, které mají navíc velice krátkou dobu trvání (Moe et al., 1997). Přestože je myší model v dnešní době více užívaný než model potkanů, zdá se být pro naše experimenty méně vhodným.

Délka trvání infekce *Blastocystis* ST1 u potkana

Dalším námi sledovaným důležitým hlediskem u potkaního modelu bylo zjištění doby trvání infekce *Blastocystis* ST1. Délku trvání infekce jsme sledovali u prvních infikovaných potkanů a to s využitím kultivace jejich vzorků trusu každý týden do doby, kdy infekce blastocyst překvapivě sama vymizela. Na základě tohoto důkladného sledování jsme zjistili, že infekce *Blastocystis* ST1 u Wistar potkanů přetrvávala po dobu jednoho roku. Bohužel v jiných studiích tento aspekt u potkanů sledován nebyl. Pro porovnání ve studii Moe et al. (1997) popsali dobu trvání infekce u myší. U jedinců 2 - 4 týdnů starých byla zaznamenána infekce pouze do tří týdnů po infekci. U jedinců starých 4 - 6 týdnů trvala infekce už jen po dobu dvou týdnů po infekci. Díky takto krátkým dobám trvání infekce by Balb/c myši byly

pro účely našich experimentů nevhodné. Díky tomuto výsledku můžeme konstatovat, že outbrední Wistar potkaní model je vhodný i pro studium vlivu blastocyst na hostitelský organismus z dlouhodobějšího hlediska oproti modelu myším.

Vliv věku na infekci *Blastocystis* ST1 u laboratorního potkana

Dalším důležitým aspektem sledovaným během naší studie byl vliv věku experimentálních potkanů na infekci *Blastocystis* ST1. U myšího modelu je vliv věku podstatným faktorem pro infekci blastocyst u experimentálních zvířat (Moe et al., 1997). Autoři studie zjistili, že vhodný věk, pro infekci myší blastocystami, je přibližně mezi 3. až 8. týdnem věku. Ze tří vybraných věkových kategorií a to tří, čtyř a pěti měsíců starých potkanů se nám zdařila infekce u všech potkanů. Zdá se, že věk u potkanů tedy nemá vliv na infekce ST1. Například Yoshikawa et al. (2004b) použil ke svému výzkumu tři týdny staré Wistar potkany, kteří byli úspěšně infikováni. I další studie popisuje zdařilé infekční pokusy na potkanech ve věku čtyř týdnů (Hussein et al., 2008; Suresh et al., 1995). Dokonce autorům studie Li et al. (2013) se podařilo infikovat experimentální zvířata ve věku šesti týdnů. Tímto experimentem jsme se ujistili o další výhodě využití potkaního modelu pro studium blastocyst oproti modelu myším.

Inkubační doba infekce blastocyst u experimentálních potkanů

V průběhu našich experimentů jsme vypožorovali, že inkubační doba infekce blastocyst u outbredních Wistar potkanů je 12 dnů od infekce. Po této době se začaly v kultivacích připravených z pravidelně odebíraných vzorků trusu infikovaných zvířat objevovat vakuolární formy. Hussein et al. (2008) ve své studii pozoroval potkany infikované subtypem ST1 po dobu dvou týdnů, avšak ve svých výsledcích inkubační dobu infekce neuvádí. Naproti tomu autoři studie Li et al. (2013) pozorovali první známky infekce ST1 u některých potkanů již šestý den po infekci. Všichni ostatní byly pozitivní desátý den po infekci. Podle všech výše uvedených výsledků se dá shrnout, že inkubační doba *Blastocystis* ST1 se pohybuje mezi 6-12 dny. Dalším důkazem variability inkubační doby infekce blastocyst je studie Yoshikawa et al. (2004b), kde též pozorovali rozdílnou inkubační dobu. Tato inkubační doba byla mezi 9-15 dny. Myslíme si, že tato variabilní inkubační doba infekce ST1 může být způsobena individuální citlivostí potkanů, myší, a jejich linií vůči

infekci blastocyst. Může to samozřejmě souviset i s využitím outbredních linií potkanů při těchto studiích.

Sledování vlivu infekce *Blastocystis* ST1 na zdravotní stav potkanů

V našich experimentech jsme doposud pro infekce potkanů použili pouze subtyp blastocyst ST1. Nicméně mnoho studií poukazuje na to, že jednotlivé subtypy blastocyst se ve svém vlivu na lidský organismus zásadně liší (Coyle et al., 2012; Domínguez et al., 2009; Doyle et al., 1990; Eroglu et al 2009; Hussein et al 2008; Leder et al., 2005; Poirier et al., 2012; Scanlan et al., 2013; Stenzel et al., 1996; Tan et al 2008; Yan et al., 2006). Zatímco subtyp ST1 je často považován za komenzála a jeho infekce bývají asymptomatické (Miller a Minshew 1988; Parfrey et al., 2014; Shlim et al, 1995; Scanlan 2012; Scanlan a Stensvold 2013; Scanlan et al., 2014), tak například subtyp ST3 a ST4 je často spojován s klinickým onemocněním (Alfellani et al., 2013; El Safadi et al., 2014; Hameed et al., 2011; Roberts et al., 2013; Roberts et al., 2014; Stensvold et al., 2011; Tan et al., 2008). Proto studium pouze jednoho subtypu blastocyst (v našem případě ST1) nebude pro celkový obraz role blastocyst ve střevním ekosystému dostatečný.

Z výše popsaných faktů je důležité klást důraz na výzkum, který by dokázal jednou pro vždy objasnit vztahy mezi subtypy blastocyst a jejich hostiteli. Například v studii Hussein et al. (2008) zkoumali u izolátů blastocyst, získaných od pacientů trpících gastrointestinálními problémy a od lidí s asymptomatickými infekcemi, jejich dopad na hostitelský organismus. V průběhu studie zachytili čtyři nejběžněji se u lidí vyskytující subtypy a to ST1-ST4. Nejvíce prevalenční byl subtyp 3 (u 54,5 % pacientů), zatímco subtyp 1 a 4 byl nalezen u 18,2 % pacientů a nejméně častý byl subtyp 2 (u 9,1 % pacientů). Těmito izoláty byly následně infikováni čtyři týdny staří outbrední samci potkanů Wistar. Poté autoři studie sledovali jejich zdravotní stav po dobu dvou týdnů po infekci, zdali se projeví nějaké příznaky infekce. Podle jejich výsledků se u potkanů klinicky projeví subtypy ST1, ST 3 a ST4. Jen u subtypu ST2 nebyly prokázány, žádné zdravotní změny u infikovaných zvířat. Naopak u potkanů infikovaných ST1 docházelo ke ztrátám srsti, výraznému hubnutí, a 25% úmrtnosti. Existují ještě další studie, ve kterých ST1 figuroval jako patogen (Kaneda et al. 2001; Moosavi et al., 2012; Yakoob et al. 2010; Yan et al. 2006).

V našich experimentech jsme u infikovaných potkanů subtypem ST1 nepozorovali žádné změny zdravotního stavu a k žádným úmrtím vlivem této infekce také nedošlo. *Blastocystis* ST1 se nám u našich experimentálních potkanů jeví spíše jako komenzál než patogen. Toto naše tvrzení dále podporují výsledky Li et al. (2013), kde infikovali potkany ve čtyřech skupinách. Jedinci v každé skupině byli infikováni jinou koncentrací cyst a to 10^2 , 10^3 a 10^4 . Jedna ze skupin byla infikována pouze fyziologickým roztokem a byla použita jako negativní kontrola. Všichni potkani byly pozorováni po dobu dvou týdnů po infekci a jejich infekce byla kultivačně potvrzena. Po této době proběhla pitva, která měla ukázat rozsah histopatologických změn u infikovaných jedinců. Výsledky této studie naznačují, že ST1 nemá patogenní vliv na hostitelský organismus, a jeho případná patogenita je dán spíše individuálními fyziologickými faktory hostitele než samotným subtypem.

Na základě publikovaných informací a našich pozorování klinického působení *Blastocystis* ST1 infekce na outbrední SPF Wistar potkany se nám tento subtyp jeví spíše jako komenzální. Tudíž by tento subtyp mohl být použit jako vhodný modelový organismus pro výzkum spojený s onemocněním IBD, na který se zaměřuje naše laboratoř.

Infekce ST1 mezi potkany

Pro dokonalé zavedení outbredního Wistar potkaního modelu bylo dále naprosto nezbytné experimentálně ověřit, zda je možné infikovat potkany infekčními dávkami připravených z trusu jedinců infikovaných *Blastocystis* ST1. V prvním takovém experimentu se experimentální potkani ukázali kultivačně negativní. Rozhodli jsme se experiment opakovat pro vyvrácení nebo potvrzení prvního výsledku, přesto byli potkani opakovaně negativní. V tuto chvíli si tento výsledek vysvětlujeme faktem, že buňky ST1 s největší pravděpodobností ve střevech potkanů neencystují a proto je nemožné jimi infikovat další potkany. Bohužel mikroskopicky se nám tuto skutečnost nepodařilo potvrdit. Přítomnost cyst (zejména u dávek z donora) byla vždy kontrolována pomocí světelné mikroskopie a cysty byly vždy nalezeny. I infekční dávky z potkaního materiálu byly mikroskopicky kontrolovány a určitá stádia podobná cystám byla detekována. Bohužel velikost těchto stádií se pohybuje mezi 2-5 μm a bylo obtížně rozlišitelné, zda se opravdu jedná o stádia cyst anebo vakuolární formy deformované osmotickou aktivitou cukerného roztoku používaného v sacharózovém gradientu.

Encystace prvoků ve střevě je závislá na mnoha faktorech a to zejména na teplotě a na přítomnosti symbiotických bakterií napomáhajících encystaci (např. Skotarczak, 1984). Skutečnost, že prvek *Blastocystis* ST1 u potkana jako hostitele neencystuje, si vysvětlujeme především odlišným složením střevního mikrobiomu a zejména pak absencí potřebných symbiotických bakterií. Nicméně tento fakt by musel být prověřen sekvenčními analýzami nové generace na vzorcích potkanů a lidského donora. Podobným příkladem může být střevní nálevník, *Balantidium coli*, který encystuje pouze u svého rezervoárového hostitele (prasete), zatímco u jiných hostitelů jako je člověk či lidoopi neencystují a v jejich trusu jsou detekovány pouze trofozoiti (Pomajbíková et al., 2010). Dalším možným vysvětlením by mohl být fakt, že se u *Blastocystis* spp. vytváří dva typy cyst popsané autory studie Singh et al. (1995). Tlustostěnná, která umožňuje šíření infekce ve vnějším prostředí díky své rezistenci vůči okolním vlivům a tenkostěnná, jenž je zodpovědná za autoinfekci ve střevě svého hostitele. Pokud by se ve střevě u našich experimentálních potkanů vyvíjel tenkostěnný typ cyst, další infekce by nebyla možná, jelikož by cysty nevydržely kyselé prostředí žaludku.

Z tohoto důvodu jsme byly nuceni hledat další vhodný experimentální model, který by vylučoval cysty *Blastocystis* ST1.

Experimentální model jako zdroj cyst ST1 buněk

Vzhledem k opakovaně nezdařilým infekcím mezi potkany jsme se snažili hledat jiný vhodný experimentální zvířecí model produkující cysty prvoka *Blastocystis* ST1. Tento model bychom využili jako zdroj cyst ST1 pro následné infekce potkanů v experimentech zaměřených pro studium blastocyst. Zaměřili jsme se na nejčastěji používané laboratorní hlodavce a to pískomila mongolského (*Meriones unguiculatus*), mastomyš (*Mastomys coucha*) a bílou myš (linie CD1). Infekční dávky byly opět připraveny ze vzorku stolice od našeho donora cyst ST1. Na základě informací o “self-limitujících” infekcích ve studii Moe et al. (1997) jsme se rozhodli infikovat dvě věkové skupiny, a to mladší osmi týdnů a starší osmi týdnů, abychom vyloučili případné nezdařilé infekce, které by mohli být ovlivněny věkem zvířat.

Úspěšné infekce subtypem ST1 se ukázaly pouze u pískomilů, a to v obou věkových kategoriích. První ST1 buňky jsme kultivačně detekovali pátý den po infekci a jejich infekce trvá již 13 měsíců. Pískomilové se ukázali jako další citlivé laboratorní zvíře pro infekce

Blastocystis ST1. Odlišnou inkubační dobu si vysvětlujeme odlišnou fyziologií gastrointestinálního traktu pískomilů společně s jiným složením střevního mikrobiomu, jež mohou urychlit životní cyklus blastocyst.

Dále jsme se zaměřili na experimenty, kde jsme využili trus pískomilů pro přípravu infekčních dávek s cystami ST1 pro následnou infekci potkanů. Ani v případě těchto experimentů jsme nebyli opakovaně úspěšní. Pískomily sice je možné infikovat, ale opět není možné infikovat potkany infekčními dawkami připravenými z jejich trusu. Tuto skutečnost si opět vysvětlujeme podobně jako v případě potkanů, že *Blastocystis* ST1 u pískomilů neencystuje.

V případě mastomyší a CD1 myší byly výsledky opakovaně negativní a to v případě obou věkových kategorií. Tuto skutečnost si vysvětlujeme tak, že uvedená zvířata nejsou citlivá k infekcím *Blastocystis* ST1. Zajímavé je, že několik studií úspěšně použilo laboratorní myši pro infekci *Blastocystis*. Autoři ve svých studiích použili vždy jiné linie myší. Ve studii Moe et al. (1997) použili imunokompetentní Balb/c myši. Infekce se mu zdařili i u myší dvou věkových kategorií a to mladší a starší čtyř týdnů. Dále ve studii Elwakil et al. (2010) ke svému výzkumu používali laboratorní myši nedefinované linie. Yao et al. (2005) využíval ICR myši a Zhang et al. (2006) použil Kuning myši. Autoři výše zmíněných studií bohužel neuvádí jaký subtyp *Blastocystis* použili pro infekci myší, tedy nemůžeme s jistotou porovnat rozdíl v citlivosti myšího modelu. Zdali se naše pokusy s mastomyší a CD1 myší nezdařili kvůli infekci jiným subtypem nebo použitím odlišné linie, nelze zjistit.

Na základě našich výsledků a výše uvedených publikovaných dat se nám opakovaně potvrdilo, že myší model je pro naše účely nevhodný.

Infekce pískomilů vakuolárními formami ST1

Než jsme zjistili, že potkany není možné infikovat z trusu pískomilů pozitivních na *Blastocystis* ST1, tak jsme se zaměřili na možnost infikovat pískomily vakuolárními formami z kultur. Tento experiment vzešel ze dvou na sebe navazujících faktů. Za prvé, jsme se inspirovali zkušeností spolupracující laboratoře (Laboratoř veterinární a medicínské protistologie) se získáváním cyst *Giardia intestinalis* s využitím pískomilů infikovaných trofozoity z kultur (nepublikovaná data). Infekce pískomilů vakuolárními formami je zřejmě možná z důvodu vyššího pH žaludečních šťáv, podle ústního sdělení doc. Ing. Martina

Kváče, Ph.D. (Vedoucí Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parasitologický ústav, Biologické centrum AV ČR v.v.i., Branišovská 31, České Budějovice) dne 21. dubna 2016. Za druhé, v zahraničních sbírkách jsou různé subtypy blastocyst zamrazeny ve stádiích vakuolárních forem a ty bychom mohli získat pro studium jejich vlivu na hostitelský organismus s využitím potkaního modelu. Pro infekce potkanů jsou nezbytná stádia cyst, která bychom získávali infekcemi pískomilů. Zároveň by izoláty získaných subtypů mohly být v pískomilech dlouhodobě udržovány.

Pro infekce těmito vakuolárními formami jsme zvolili pět týdnů staré pískomily. Využili jsme pro infekce již připravené vzorky blastocyst v kultivačním médiu. V experimentu jsme vzorky z infikovaných pískomilů kultivačně vyhodnotili jako pozitivní. Tento model by tedy mohl být aplikovatelný pro práci s jinými subtypy získaných ze zahraničních sbírek. Vzhledem k tomu, že *Blastocystis* ST1 ve střevě pískomila zřejmě také neencystuje a neexistuje tak možnost infikovat potkany, je tedy pro naše účely studia blastocyst nevyužitelný.

Optimalizace infekčních dávek

Pro studium vlivu blastocyst na hostitelský organismus a zejména pak na složení jeho střevní mikroflóry jsme se pokusili využít infekční dávky (získané od donora s ST1) ošetřené 10% chlornanem sodným. Hlavním důvodem bylo odstranění bakterií z infekčních dávek, které by mohly zkreslovat právě složení střevního mikrobiomu v průběhu experimentů na potkanech. Všechny provedené infekce se nezdařily.

Dále bylo vhodné optimalizovat množství cyst v infekčních dávkách připravených z trusu infikovaných potkanů. V případě neúspěšných blastocystových infekcí mezi potkany, jsme se domnívali, že mohou být zapříčiněny nízkou koncentrací cyst v potkaním trusu v porovnání s lidským vzorkem stolice. Provedli jsme tedy experimenty, v kterých jsme připravovali infekční dávky z většího množství sesbíraného trusu potkanů sbíraných ve třech po sobě jdoucích dnech. Tento materiál byl uchováván ve dvou roztocích a to v PBS a dvojchromanu draselném v lednici. Jako pozitivní kontrolu jsme opět zvolili stolicí od lidského donora uchovávanou stejným způsobem. Kromě pozitivních kontrol, byly infekce potkanů opět negativní. Výsledek tohoto experimentu opět může potvrzovat naši hypotézu, že *Blastocystis* ST1 u potkanů neencystuje. Pro účely následujících experimentů jsme se

rozhodli používat důsledně pouze lidský biologický materiál pozitivní na blastocysty pro úspěšné infekce potkanů.

VI. ZÁVĚR

V této práci se nám podařilo nalézt vhodný experimentální *in vivo* model, ve kterém by bylo možné z dlouhodobějšího hlediska studovat vliv *Blastocystis* ST1 na imunitní systém hostitelského organismu. Jako vhodný experimentální model se nám jeví outbrední SPF Wistar potkani, kteří jsou citliví na infekci lidským subtypem *Blastocystis* ST1. V našich experimentech jsme dosáhli téměř 100% úspěšnosti infekce potkanů tímto subtypem.

V rámci dalšího dílčího cíle, zaměřeného na zjištění délky trvání infekce *Blastocystis* ST1 u potkanů, se nám potvrdilo dlouhodobé přetrvávání infekce *Blastocystis* ST1. Délka u infikovaných potkanů trvala po dobu jednoho roku. Bohužel během našich experimentů se ukázalo, že potkani zřejmě nejsou schopni produkovat cysty *Blastocystis* ST1 a tudíž není možné infikovat další potkany. Z tohoto důvodu jsme si stanovili jako další cíl najít jiný zvířecí model, který by produkoval cysty *Blastocystis* ST1, a tak mít zdroj cyst pro infekce potkanů. V rámci našich experimentů se nám podařilo nalézt další citlivý zvířecí model, ve kterém infekce *Blastocystis* ST1 přetrvává. Tímto modelem je pískomil mongolský. Nicméně ani v tomto případě se nám nepodařily následné infekce potkanů a tak se domníváme, že ani pískomilové neprodukují cysty.

K dalším studiím zaměřeným na *Blastocystis* ST1 je nezbytné najít vhodný model, který by produkoval cysty, se kterými by bylo možné infikovat potkany. Studium blastocyst u laboratorních potkanů by dále mohlo významně přispět k detailnímu studiu jejich biologie nebo vlivu na imunitní systém.

VII. POUŽITÁ LITERATURA

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.

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.

Andersen LO, Vedel NH, Stensvold CR (2013). Waiting for the human intestinal eukaryotome. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 7:1253-1255.

Anuar TS, Ghani MK, Azreen SN, Salleh FM, Moktar N (2013). *Blastocystis* infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasites & Vectors*, 6:40.

Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, Yano T, Hasegawa M (2002). Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of Stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49:42-53.

Arrowood MJ, Sterling CR (1987). Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *Journal of Parasitology*, 73:314–319.

Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis* and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors*, 1: 40.

Boreham PFL, Stenzel DJ (1993). *Blastocystis* in human and animals – morphology, biology, and epizootiology. *Advances in Parasitology*, 32:1-70.

Burghilea B, Radulescu S (1991). Ultrastructural evidence for a possible differentiation way in the life-cycle of *Blastocystis hominis*. *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*, 50:231–244.

Clark CG (1997). Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 87:79–83.

- Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR (2013).** Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in Parasitology*, 82:1-32.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2012).** The impact of the gut microbiota on human health: An integrative View. *Cell*, 148:1258-1270.
- Chen XQ, Singh M, Ho LC, Moe KT, Tan SW, Yap EH (1997).** A survey of *Blastocystis* in rodents. *Laboratory Animal Science*, 47:91-94.
- Coyle CM, Varughese J, Weiss, LM, Tanowitz HB (2012).** *Blastocystis*: to treat or not to treat. *Clinical Infectious Diseases*, 54:105–110.
- Domínguez MMV, Guna R, Muñoz C, Gómez MMT, Borrás R (2009).** High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitology Research*, 105:949–955.
- Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM (1990).** Epidemiology and Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28:116-121.
- 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. *BioMed Central Infection Diseases*, 14:164.
- Elwakil HS, Hewedi IH (2010).** Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitology Research*, 107:685–689.
- Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS (2009).** Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptom- atic patients by PCR. *Parasitology Research*, 105:1589–1592.
- Fayer R, Elsasser T, Gould R, Solano G, Jr Urban J, Santin M (2014).** *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology Research*, 113:1465-1472.
- Hameed DMA, Hassanin OM, Fakkar NMZ (2011).** Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitology Research*, 108:553-560.

- Hussein EM, Hussein AM, Eida Mohamed M, Atwa Maha M (2008).** Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitology Research*, 102:853–860.
- Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, Kimata I (2007).** Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitology International*, 56:107–112.
- 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.
- Kaneda Y, Horiki N, Cheng XJ, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H (2001).** Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65:393–396.
- 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 LI, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK (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.
- Li J, Deng T, Li X, Cao G, Li X, Yan Y (2013).** A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitology Research*, 112:3537-3541.
- Li LH, Zhou XN, Du ZW, Wang XZ, Wang LB, Jiang JY, Yoshikawa H, Steinmann P, Utzinger J, Wu Z, Chen JX, Chen SH, Zhang L (2007).** Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitology International*, 56:281–286.
- Lorencová M (2014).** Diversity of genus *Blastocystis* (Stramenopiles) in reptiles and arthropods. *Diplomová práce*. Praha. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra zoologie.

- Lukeš J, Stensvold CR, Jirků KP, Parfrey LW (2015).** Are human intestinal eukaryotes beneficial or commensals? *Plos Pathogens*, 11:e1005039.
- Nasirudeen AM, Hian YE, Singh M, Tan KS (2004).** Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. *Microbiology*, 150:33–43.
- Nasirudeen AM, Tan KS, Singh M, Yap EH (2001).** Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology*, 123:235–246.
- Miller RA, Minshew B (1988).** *Blastocystis hominis*: an organism in search of a disease. *Reviews of Infectious Diseases*, 10:930–938.
- 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*, 83:319–386.
- Moosavi A, Haghghi A, Mojarad EN, Zayeri F, Alebouyeh M, KhazanH, Kazemi B, Zali MR (2012).** Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitology Research*, 111:2311–2315.
- Özyurt M, Kurt O, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR (2008).** Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitology International*, 57:300-306.
- Pakandl M (1992).** An experimental transmission of porcine strains of *Blastocystis* sp. in the laboratory mice and gerbils. *Folia Parasitologica*, 39:383-386.
- Parfrey LW, Walters WA, Lauber CL, Clemente JC, Berg-Lyons D, Teiling C, Kodira C, Mohiuddin M, Brunelle J, Driscoll M, Fierer N, Gilbert JA, Knight R (2014).** Communities of microbial eukaryotes in the mammalian gut within the context of environmental eukaryotic diversity. *Frontiers in Microbiology*, 5:298.
- Parija SC, Jeremiah SS (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 MA, Porsbo LJ, Hammerum AM, Nordgaard LI, Nielsen HV, Krogh KA (2013).** Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 48:638-639.
- Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, Alaoui HE (2012).** New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *Plos Pathogens*, 8:e1002545.
- Pomajbíková K, Petrželková KJ, Profousová I, Petrášová J, Modrý D (2010).** Discrepancies in the occurrence of *Balantidium coli* between wild and captive african great apes. *The Journal of Parasitology*, 96:1139–1144.
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J (2013).** Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32:335-343.
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J (2014).** Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*, 6:17.
- 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.
- Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilic-Stojanovic M, Heiling HG, De Vos WM, O'Toole PW, 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.
- Scicluna SM, Tawari B, Clark CG (2006).** DNA Barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157:77-85.
- Shlim DR, Hoge CW, Rajah R, Rabold G, Echeverria P (1995).** Is *Blastocystis hominis* a cause of diarrhea in travelers? A prospective controlled study in Nepal. *Clinical Infectious Diseases*, 21:97–101.
- Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG (1996).** Human parasite finds taxonomic home. *Nature*, 308:398-398.

- Singh M, Ho LC, Yap ALL, Ng GC, Tan SW, Moe KT, Yap EH (1996).** Axenic culture of reptilian *Blastocystis* isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitology Research*, 82:165–169.
- 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.
- Skotarczak B (1984). **Wpływ niektórych czynników zewnętrznych na encystacje i ekeystacje *Balantidium coli*. *Wiadomości parazytologiczne*, 30:565-573.**
- Stensvold CR (2013).** *Blastocystis*-genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical Parasitology*, 3:26–34.
- Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG (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, Christiansen DB, Olsen KEP, Nielsen HV (2011).** *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-Positive patients presenting with acute diarrhea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84:883-885.
- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, 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*, 9:563–584.
- Stenzel DJ, Boreham PFL, McDougall R (1991).** Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *International Journal for Parasitology*, 21:807-812.
- Suresh K, Chong SY, Howe J, Ho LC, Ng GC, Yap EH, Singh M (1995).** Tubulovesicular elements in *Blastocystis hominis* from the caecum of experimentally-infected rats. *International Journal for Parasitology*, 25:123-126.
- Tan KSW (2004).** "Blastocystis in humans and animals: new insights using modern methodologies". *Veterinary Parasitology*, 126:121–44.
- Tan KSW (2008).** New insights on classification, identification, and clinical relevance of

Blastocystis spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21:639-665.

Tan KSW, Howe J, Yap EH, Singh M (2001). Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death? *Parasitology Research*, 87:362–367.

Tan TC, Suresh KG (2006). Amoeboid form of *Blastocystis hominis* – a detailed ultrastructural insight. *Parasitology Research*, 99:737-742.

Tan TC, Suresh KG, Smith HV (2008). Phenotypic and genotypic characterization of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. *Parasitology Research*, 104:85–93.

Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R (2010). Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 106:1033–1038.

Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo X, Chen G (2006). Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitology Research*, 99:597–601.

Yao FR, Qiao JY, Zhao Y, Zhang X, Yang JH, Li XQ (2005). Experimental infection of mice with *Blastocystis hominis*. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*, 23:444-448.

Yoshikawa H, Nagano I, Yap EH, Singh M, 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.

Yoshikawa H, Wu ZL, Kimata I, Iseki M, Ali IKMD, Hossain MB, Zaman V, Haque R, Takahashi Y (2004a). Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology Research*, 92: 22-29.

Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanri K, Iwatani S, Kimata M (2004b). Feco-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology Research*, 94:361–366.

Zaman V, Khan KZ (1994). A comparison of direct microscopy with culture for the diagnosis of *Blastocystis hominis*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25:792-793.

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*, 23:73–74.

Zhang H, Li W, Yan QY, He LJ, Su YP (2006). Impact of *Blastocystis hominis* infection on ultrastructure of intestinal mucosa in mice. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*, 24:187-191.

Zhang X, Qiao JY, Dong XH, Li YQ, Li XQ, Li C (2003). Study on morphology of *Blastocystis hominis* in culture and from diarrhea patients. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 21:116–8.

Zhang X, Zhang S, Qiao J, Wu X, Zhao L, Liu Y, Fan X (2012). Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 110:1165-1172.

Zierdt CH (1973). Studies of *Blastocystis hominis*. *The Journal of Protozoology*, 20:114121.

Zierdt CH, Tan HK (1976). Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. *Zeitschrift für Parasitenkunde-Parasitology Research*, 50:277-283.

doc. Ing. Martina Kváče, Ph.D. – ústní sdělení (Vedoucí Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parasitologický ústav, Biologické centrum AV ČR v.v.i., Branišovská 31, České Budějovice) dne 21. dubna 2016.