Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Studium střevních prvoků rodu *Blastocystis* v mikrobiomu člověka

Diplomová práce

Bc. Zuzana Lhotská

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, PhD.

Školitel – specialista, konzultant: RNDr. Milan Jirků

České Budějovice 2019

Bc. Lhotská Z., (2019): Studium střevních prvoků rodu *Blastocystis* v mikrobiomu člověka. [Study of *Blastocystis* in Human Microbiome. Mgr. Thesis, in Czech] – 64 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main aim of this study is to determine the prevalence and subtype diversity of the gut protist *Blastocystis* spp. in a volunteer group across the Czech Republic. Interestingly, *Blastocystis* has been recently considered as a part of the healthy gut microbiome in human. Beside the prevalence study, some factors such as animal contact, lifestyle, gender, and age have been associated with the presence of this gut protist in this sample dataset. We used two different diagnostic methods for detection of *Blastocystis* presence or absence: i) xenic cultivation and ii) specific PCR, based on which is also possible to distinguish *Blastocystis* subtypes. In total, we collected 411 samples from which 360 were processed within this study so far. Of these, the total prevalence of *Blastocystis* was determined – 21 % in humans and 9 % in animals. Nine subtypes were detected (ST1-ST7, ST10, ST14), of which six were detected in humans (ST1-ST4, ST6, ST7). We found out that some factors such as age, lifestyle (traveling, urban vs. rural) and contact with animals might affect the human colonization with *Blastocystis*, while we didn't detect any correlations in case of gender. Based on our results, we realized that PCR is more sensitive than cultivation.

Prohlášení:

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

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

Tato práce je součástí projektu, který byl posouzen Etickou komisí Biologického centra AV ČR v. v. i. v Českých Budějovicích jako eticky přípustný (číslo rozhodnutí 1/2017).

V Českých Budějovicích dne**:** Podpis……..…

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat Kateřině a Milanovi Jirků za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi během přípravy této diplomové práce věnovali.

V neposlední řadě děkuji celému týmu Laboratoře parazitární terapie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v.v.i. za pomoc a přátelské prostředí, dále také Laboratoři veterinární a medicínské protistologie za umožnění přístupu do jejich laboratoří.

Obsah

1 Úvod 1
1.1 Životní cyklus a reprodukce *Blastocystis* 1
1.2 Morfologie 2
1.2.1 Vakuolární forma 2
1.2.2 Granulární forma 3
1.2.3 Améboidní forma 3
1.2.4 Cysta 3
1.2.5 Ostatní morfologické formy 4
1.3 Genetická diverzita a hostitelská specifita 4
1.3.1 Subtypy vyskytující se u člověka 5
1.3.2 Subtypy vyskytující se u ostatních teplokrevných obratlovců 5
1.3.3 *Blastocystis* u studenokrevných obratlovců a bezobratlých 6
1.4 Role *Blastocystis* v mikrobiomu člověka 7
1.5 Prevalence *Blastocystis* a faktory ovlivňující kolonizaci člověka 8
1.5.1 Rozvojové země 8
1.5.2 Industrializované země 9
1.6 Diagnostika 9
1.6.1 Koproskopická diagnostika 9
1.6.2 Molekulární diagnostika 10
1.6.2.1 „Barcoding“ blastocyst 11
2 Cíle práce 13
3 Materiál a metodika 14
3.1 Získávání a sběr vzorků 14
3.1.1 Metody oslovení dobrovolníků v rámci celé ČR 14
3.2 Diagnostika Blastocystis 15
3.2.1 Kultivace 15
3.2.1.1 Modifikované Jonesovo médium 15
3.2.2 Molekulární detekce 16
3.2.2.1 Izolace DNA 16
3.2.2.2 Amplifikace SSU rDNA 16
3.2.2.3 Elektroforéza 17
3.2.2.4 Sekvenování a určování subtypů Blastocystis 18
3.2.2.5 Klonování 18

3.3 Zjišťování prevalence Blastocystis 20
4 Výsledky 21
4.1 Získaný dataset vzorků 21
4.2 Porovnání senzitivity dvou diagnostických metod 23
4.3 Prevalence *Blastocystis* spp. a určení jeho subtypů 23
4.4 Zjištění prevalence blastocyst a jejich subtypů v rámci jednotlivých rodin 27
4.5 Korelace výskytu/absence *Blastocystis* spp. se specifickými faktory 29
4.5.1 Životní styl 29
4.5.1.1 Život ve městě/vesnici 29
4.5.1.2 Cestování 30
4.5.2 Kontakt se zvířaty 31
4.5.3 Pohlaví a věk 34
4.5.3.1 Vliv pohlaví na prevalenci *Blastocystis* 34
4.5.3.2 Vliv věku na prevalenci *Blastocystis* 35
5 Diskuze 37
6 Závěr 50
7 Seznam použité literatury 52
8 Přílohy 65

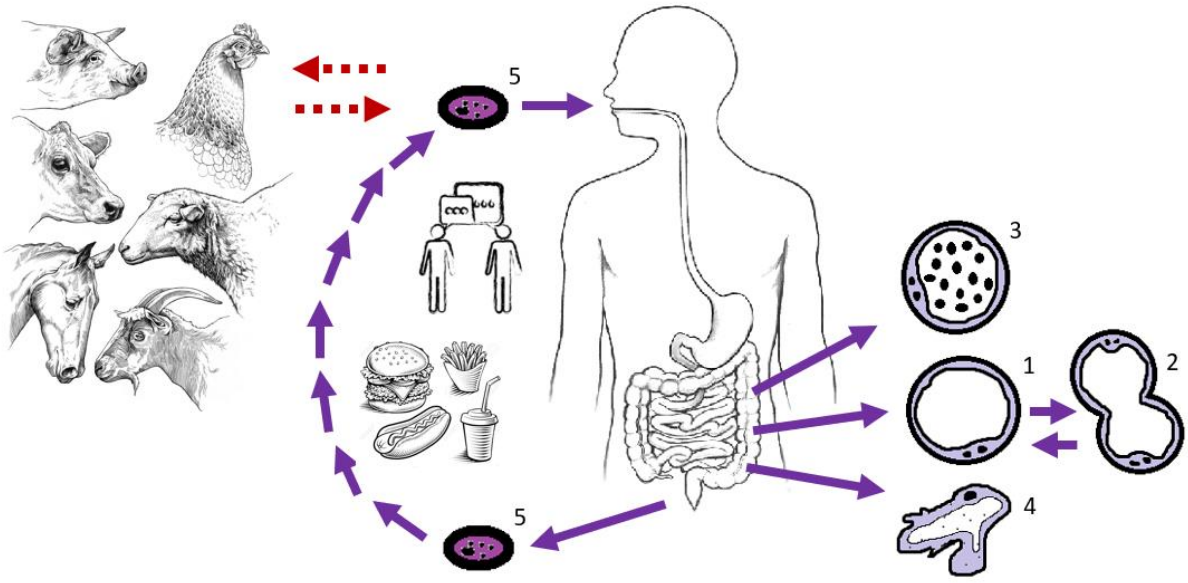
1 Úvod

Blastocystis je anaerobní prvok vyskytující se v zažívacím traktu širokého spektra obratlovců (např. Alfellani et al., 2013), ale byl objeven také u některých bezobratlých (Zaman et al., 1993). Blastocysty byly v době svého objevení považovány za střevní kvasinky (Alexeieff 1911; Brumpt 1912), nicméně dnes jsou fylogeneticky řazeny do skupiny Stramenopiles. Role tohoto střevního prvoka v lidském zdraví a nemoci je stále nejasná (např. Parfrey et al., 2014b; Poirier et al., 2012) a jejímu porozumění jsou kromě *in vitro* a *in vivo* experimentálních studií zapotřebí také další studie epidemiologické, zejména u zdravé populace lidí. Takovýchto výzkumů je však zatím málo.

1.1 Životní cyklus a reprodukce *Blastocystis*

Všechny aspekty životního cyklu blastocyst dosud nejsou zcela zřejmé, a to hlavně díky absenci vhodného experimentálního modelu (Tan et al., 2002). V nedávné studii se však ukázalo, že tímto modelem by mohl být potkan (Růžková et al., 2018). Jediným morfologickým stádiem schopným infekce jsou cysty (Moe et al., 1997; Yoshikawa et al., 2004). Všeobecně k nákaze blastocystami dochází fekálně – orální cestou, například kontaminovanou vodou nebo potravou (Angelici et al., 2018; Lee et al., 2012), či přímým kontaktem (Anuar et al., 2013). Po pozření cyst dochází v zadní části gastrointestinálního traktu (tj., cékum a kolon) hostitele k excystaci a uvolnění vakuolární formy, která se následně může přeměnit i v další morfologické formy (Moe et al., 1997). V lumenu tlustého střeva dochází opět k encystaci vakuolárních forem a tvorbě cyst, které jsou uvolňovány stolicí nebo trusem hostitele do vnějšího prostředí. Vakuolární formy *Blastocystis* se nejčastěji rozmnožují jednoduchým binárním dělením, ale byly pozorovány i další způsoby rozmnožování, jako je pučení, mnohonásobné dělení, nebo také schizogonie (Zhang et al., 2007). Vývojový cyklus *Blastocystis* je graficky znázorněn na obrázku 1.

Obr. 1: Životní cyklus *Blastocystis* (1 – vakuolární forma; 2 – binární dělení; 3 – granulární forma; 4 – améboidní forma; 5 – cysta).



1.2 Morfologie

Životní cyklus tohoto prvoka zahrnuje čtyři základní morfologické formy, a to vakuolární, granulární, améboidní a cysta. Kromě nich ale existují i méně známá vegetativní stádia – multivakuolární a avakulární formy (Stenzel et al., 1991).

1.2.1 Vakuolární forma

Vakuolární forma je charakteristická velkou centrální vakuolou vyplňující téměř celý prostor buňky, čímž vytlačuje cytoplasmu a buněčné organely na její periferii (MacPherson & MacQueen, 1994). Ve skutečnosti se ukázalo, že tyto takzvané vakuoly jsou vlastně membránou opatřená „tělíska“ nerovnoměrně vyplněná vločkovitým či granulárním materiálem, tvořeným sacharidy a lipidy (Yoshikawa et al., 1995). Tyto vegetativní formy mají kulatý tvar a jsou velmi variabilní ve své velikosti, která se pohybuje v širokém rozmezí 2-200 μm (Stenzel & Boreham, 1996). Cytoplasma na periferii buňky obsahuje nejčastěji dvě jádra, vzácněji i více (MacPherson & MacQueen, 1994). S vakuolárními formami se lze setkat v lumen střeva a také v *in vitro* kulturách (Zhang et al., 2012).

1.2.2 Granulární forma

Granulární forma je svým tvarem velmi podobná vakuolární formě, nicméně liší se přítomností drobných heterogenních granulí, které jsou kromě centrální vakuoly obsaženy i v tenkém pásu cytoplasmy na periferii buňky (MacPherson & MacQueen, 1994). Díky analýze elektronovým mikroskopem byla zjištěna existence tří typů těchto granulí, a to reprodukčních, metabolických a lipidových. Reprodukční granule se nacházejí pouze v centrální vakuole, metabolické pouze v pásu cytoplasmy a lipidové granule můžeme najít v obou těchto místech (Tan & Zierdt, 1973). Tyto morfologické formy vznikají pravděpodobně za nepříznivých podmínek z vakuolární formy (Zhang et al., 2012) a jsou častěji nalézány ve starších, a nebo axenických kulturách (Tan, 2008).

1.2.3 Améboidní forma

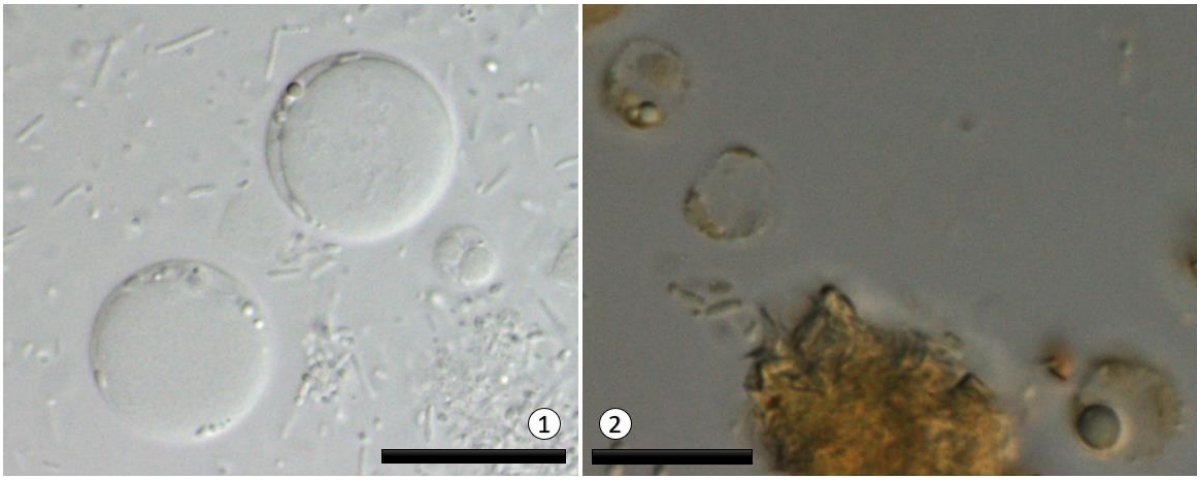
Méně častým morfologickým typem je améboidní forma, jejíž popis se v rámci studií odlišuje. Jsou charakteristické nepravidelným tvarem a jejich velikost je popisována v rozmezí 5-50 μm (Tan & Suresh, 2006). Přestože je přítomna jedna nebo dvě pseudopodie, ani toto stádium není pohyblivé. Pseudopodie slouží pravděpodobně k fagocytóze bakterií (Tan et al., 2002). Améboidní formy byly často nacházeny v *in vitro* kulturách pocházejících od pacientů s průjmy, a proto byly zkoumány pro svůj patogenní potenciál (Tan & Suresh, 2006b).

1.2.4 Cysta

Za přenos a infekci je zodpovědné stádium cysty, jehož velikost se pohybuje mezi 2-5 μm a jedná se tedy o nejmenší morfologický typ *Blastocystis* (Stenzel et al., 1991). Cysty jsou odolná stádia se silnou mnohovrstevnou stěnou, která umožňuje jejich přežití ve vnějším prostředí a přenos mezi hostiteli (Yoshikawa et al., 2004). Jejich tvar je variabilní, nejčastěji však oválný, nebo kulatý. V cytoplasmě může být obsaženo jedno nebo více jader (až čtyři) a další organely, jako například drobné vakuoly a mitochondriím podobné organely (Tan, 2008). Obvykle jsou popisovány dva typy cyst. Tenkostěnná cysta je pravděpodobně zodpovědná za autoinfekci ve střevě hostitele, zatímco silnostěnná cysta zajišťuje přenos ve vnějším prostředí (Singh et al., 1995). Porovnání vakuolární formy a cysty *Blastocystis* je patrné na obrázku 2.

1.2.5 Ostatní morfologické formy

Kromě výše zmíněných základních morfologických forem jsou popsány ještě další, méně známé typy. Jedná se o avakuolární formu, která neobsahuje centrální vakuolu, a dále multivakuolární formu s větším počtem menších vakuol (Tan et al., 2002).



Obr. 2: *Blastocystis* ST1 morfologická stádia. 1 – vakuolární formy v Jonesově médiu, měřítko = 20 µm; 2 – cysty získané z lidského donora pomocí Merthiolate-Iodine-Formaldehyde (MIF) sedimentace a barvené Lugolovým roztokem, měřítko = 10 µm. (adoptováno z Růžková et al., 2018).

1.3 Genetická diverzita a hostitelská specifita

Blastocystis vykazuje značný genetický polymorfismus, který byl ale objeven až po zavedení molekulárních metod v devadesátých letech 20. století. Do té chvíle se předpokládalo, že jsou tito prvoci vysoce hostitelsky specifičtí, proto byly všechny lidské izoláty pojmenovány jako *Blastocystis hominis*, zatímco izoláty ze zvířat na základě hostitelského druhu (např. *Blastocystis anatis* z kachny) (např. Belova 1991; Belova 1992a; Singh et al., 1996). Později se ale na základě genetických analýz ukázalo, že hostitelská specifita blastocyst je poměrně nízká a pro taxonomii není rozhodující (Noël & Dufernez, 2005; Rivera, 2008). Genetická variabilita je nyní určována molekulárně – fylogenetickými analýzami, především na základě sekvencí genu malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA). Díky velké genetické diverzitě a skutečnosti, že se jednotlivé subtypy mohou vyskytovat u různých hostitelských druhů, se od názvu *B. hominis* upouští a nyní se používá *Blastocystis* spp. Různé genetické formy z teplokrevných obratlovců se poté rozdělují na jednotlivé subtypy (Stensvold et al., 2007).

V současné době je pozornost věnována zejména blastocystám z teplokrevných obratlovců, zatímco druhy ze studenokrevných obratlovců a bezobratlých jsou často opomíjeny (Lorencová, 2014). Dodnes je známo 17 subtypů *Blastocystis* z teplokrevných obratlovců, označených jako ST1 – ST17, nicméně je velmi pravděpodobné, že v budoucnu budou popsány subtypy další (Alfellani et al., 2013).

1.3.1 Subtypy vyskytující se u člověka

U lidí byly popsány nálezy prvních devíti ze 17 již zmíněných subtypů (ST1 – ST9), přičemž ST5 – ST9 se u člověka vyskytuje jen velmi zřídka a jedná se pravděpodobně o výsledek zoonotického přenosu (Alfellani et al., 2013; Clark et al., 2013). Až v 90 % případů se u lidí jedná o kolonizaci subtypy ST1 – ST4, obzvlášť častý je ST3 (Alfellani et al., 2013). Přestože se tyto čtyři subtypy vyskytují i u zvířat, jejich převažující se výskyt v lidské populaci je pravděpodobně způsoben zejména přenosem mezi lidmi samotnými (Tan, 2008; Clark et al., 2013). Z ostatních méně běžných subtypů byl u lidí detekován subtyp ST9, který byl na rozdíl od ostatních vzácnějších subtypů (tj., ST5-ST8) nalezen výhradně u lidí (Alfellani et al., 2013). Další zřídkakdy se vyskytující subtypy ST5 – ST8 se ve větší míře vyskytují u zvířat. Jejich přítomnost u lidí je proto dávána do souvislosti se zoonotickým přenosem (Parkar et al., 2010a; Yan et al., 2007a).

1.3.2 Subtypy vyskytující se u ostatních teplokrevných obratlovců

Kromě člověka byly blastocysty objeveny i u širokého spektra dalších teplokrevných obratlovců. Subtypy ST1–4 jsou sice nejčastěji nalézány u lidí, nicméně objevují se i u některých zvířat. Příkladem jsou subtypy ST1 a ST2, které se kromě lidské populace mohou objevit například u psů (Ramírez et al., 2013; Wang et al., 2013). Další subtyp ST3 byl v minulosti detekován kromě člověka také u některých hospodářských zvířat (Ramírez et al., 2013), přestože jsou pro ně typické subtypy jiné (viz níže). Subtyp ST4 se objevil například u hlodavců a také vačnatců (Stensvold et al., 2009). U prasat je typickým subtypem ST5 (Noël & Dufernez, 2005; Parkar et al., 2010b; Udonsom et al., 2018), ale tento subtyp byl detekován i u jiných hospodářských zvířat, jako je skot a ovce (Stensvold et al., 2009; Yan et al., 2007a). Za hostitelsky specifičtější „ptačí subtypy“ jsou označovány ST6 a ST7, díky jejich převažujícím se výskytu právě u ptáků (Cian et al., 2017; Greige et al., 2018). Nicméně s těmito subtypy se můžeme setkat i u jiných zvířat a také u člověka. Subtyp ST8 bývá

detekován zejména u primátů (Stensvold et al., 2009), ale také u vačnatců (Ramírez et al., 2013). U ovcí, skotu a koz je častým nálezem kolonizace subtypem ST10 (Alfellani et al., 2013; Li et al., 2018; Masuda et al., 2018). Autoři Parkar et al. (2010) popsali výskyt dalších subtypů ST11 u slonů, ST12 u žiraf a ST13 u klokanů. Subtyp ST14 byl kromě telat (Fayer et al., 2012) nalezen také u ovcí a koz (Li et al., 2018; Udonsom et al., 2018), ale i u muflonů (Alfellani et al., 2013). Dalším subtypem, který byl nalezen u zvířat je ST15, který se objevil u velbloudů a primátů, a poslední dva subtypy, tj. ST16 a ST17 byly zatím popsány pouze u vačnatců a hlodavců (Alfellani et al., 2013).

1.3.3 *Blastocystis* u studenokrevných obratlovců a bezobratlých

Kromě teplokrevných obratlovců byly blastocysty zřídka pozorovány také u některých studenokrevných obratlovců a bezobratlých. O studenokrevné obratlovce se v souvislosti s *Blastocystis* se začali poprvé zabývat autoři Teow et al. (1991), když v rámci své studie nově popsali přítomnost těchto prvoků u mořských hadů *Lapemis hardwickii*. O rok později tito autoři popsali také blastocysty u tří druhů želv, krokodýla a hadů, jejichž morfologie se shodovala s morfologií blastocyst u člověka (Teow et al., 1992). Přítomnost těchto prvoků u želv byla znovu potvrzena ve studii Kostka et al. (2007). V roce 2004 byly blastocysty také izolovány z žab, u nichž se vyskytovaly s vysokou prevalencí 84-100 % (Yoshikawa et al., 2004).

O *Blastocystis* u bezobratlých živočichů (konkrétně pijavek) se poprvé zmiňují již studie provedené na počátku 20. století (Alexeieff 1911; Brumpt 1912). Dalším druhem bezobratlých živočichů, kde byly blastocysty také objeveny, jsou švábi (Zaman et al., 1993). Se studiem blastocyst pocházejících ze švábů pokračovali později také autoři Yoshikawa et al. (2007). Jejich izoláty se morfologicky neodlišovaly od izolátů lidských a bylo možné je geneticky odlišit pouze molekulárně, podobně jako u výše popsaných blastocyst z poikilotermních hostitelů.

1.4 Role *Blastocystis* v mikrobiomu člověka

Přestože o existenci těchto prvoků víme již více než 100 let (Alexeieff 1911; Brumpt 1912), jejich role v lidském zdraví a nemoci, zejména ve střevním mikrobiomu, není dosud zcela objasněná a je stěžejní otázkou mnoha studií (např. Hameed et al., 2011; Ajjampur & Tan, 2016; Audebert et al., 2016). Donedávna byly blastocysty považovány za patogen a úzce spojovány převážně s etiologií střevních onemocnění, jako je syndrom dráždivého tračníku [Irritable bowel syndrome - IBS] (Poirier et al., 2012). Touto funkční gastrointestinální poruchou trpí zhruba 5-24 % lidí v industrializovaných zemích a jako jeden z hlavních příznaků je udávána bolest břicha, průjem a nadýmání (Roberts et al., 2014). Mezi další příznaky, které bývají přisuzovány infekci *Blastocystis*, jsou různé kožní projevy, a to kopřivka s akutním či chronickým průběhem (Hameed et al., 2011). V rámci některých studií byly blastocysty také častěji detekovány u imunosuprimovaných pacientů s HIV (Adamu et al., 2013) a také u lidí s imunitně zprostředkovanými střevními záněty [např. Inflammatory Bowel Diseases - IBD] (Crisafi et al., 2015). Nicméně autoři jiných studií nezaznamenali žádnou spojitost mezi infekcí *Blastocystis* a výše zmiňovanými onemocněními (např. Krogsgaard et al., 2015; Petersen et al., 2013; Rossen et al., 2015).

Nedávno se začaly objevovat názory, že blastocysty jsou důležitou součástí střevního mikrobiomu, dokonce by jej mohly stabilizovat, a tak by mohly naopak být člověku prospěšné (Parfrey et al., 2014a; Scanlan & Stensvold, 2013a; Stensvold & Giezen, 2018) Hlavním důvodem, který přispěl k této hypotéze, byl objev vysoké prevalence blastocyst u zdravých lidí, v porovnání s pacienty s IBS či IBD, v rámci větších epidemiologických studií (Petersen et al., 2013; Krogsgaard et al., 2015; Rossen et al., 2015). Dalším důvodem je skutečnost, že blastocysty jsou shopné kolonizovat lidské střevo po dlouhou dobu – buď jsou tedy schopné dlouhodobě modulovat imunitní odpověď, a nebo je náš imunitní systém považuje za „přátelské“ (Scanlan et al., 2014; Krogsgaard et al., 2015). Zazněl také názor, že přítomnost těchto prvoků u zdravých lidí souvisí s optimální diverzitou střevního mikrobiomu (Scanlan & Stensvold, 2013; Stensvold & Giezen, 2018). Zjistilo se totiž, že složení bakteriálního mikrobiomu u pacientů s IBD a zdravých jedinců se liší (Ni et al., 2017). Zatímco u zdravých jedinců převládá ve střevě striktně anaerobní prostředí, u lidí trpících IBD dochází k přesmyku na fakultativně anaerobní prostředí a tato částečná přítomnost kyslíku způsobí změnu bakteriálního prostředí spojenou s dysbiózou [tzn. nerovnováhou střevní mikroflóry] (Rigottier 2013; Rivera et al., 2017). Naopak přítomnost *Blastocystis*, jako striktně anaerobního prvoka (Zierdt, 1986), je nyní spojována s vyšší bakteriální diverzitou ve střevech, zejména tedy u zdravých lidí (Audebert et al., 2016; Stensvold & Giezen, 2018).

Vzhledem ke kontroverzním faktům, které *Blastocystis* obklopují, se zdá být nepravděpodobné, že by mohly hrát významnou roli při střevních onemocněních. Přítomnost těchto prvoků ve stolici pacientů s IBD nemusí nutně znamenat, že jsou původcem zdravotních problémů a měly by být prověřeny i další příčiny infekčního či neinfekčního původu (Stark et al., 2007a).

1.5 Prevalence *Blastocystis* a faktory ovlivňující kolonizaci člověka

Výskyt *Blastocystis* je kosmopolitní a jejich prevalence se výrazně liší mezi rozvojovými a industrializovanými zeměmi (Jeremiah & Parija, 2013). Mezi jeden z faktorů ovlivňujících kolonizaci člověka blastocystami patří třeba kontakt se zvířaty. V rámci několika studií byly blastocysty často nacházeny u lidí, kteří pracují jako ošetřovatelé v zoologických zahradách, na farmě a nebo na jatkách (Cian et al., 2017; Greige et al., 2018; Parkar et al., 2010a) a u některých subtypů byl na základě molekulárních analýz i přímo zdokumentován přenos mezi zvířaty a člověkem, tedy přenos zoonotický (Greige et al., 2018; Lee et al., 2012; Yan et al., 2007b). Blastocysty byly také častěji zaznamenány u lidí, kteří v minulosti navštívili tropické země (Bart et al., 2013). Dá se tedy říct, že cestování je dalším faktorem přispívajícím ke kolonizaci člověka blastocystami. V neposlední řadě se mezi faktory zvyšující pravděpodobnost získání kolonizace blastocystami počítají také zhoršené hygienické podmínky (El Safadi et al., 2014) a pití užitkové, chemicky neošetřené vody (Angelici et al., 2018; Leelayoova et al., 2018).

V neposlední řadě je také třeba zdůraznit, že výsledky prevalence jsou do značné míry ovlivněny použitou diagnostickou metodou (Roberts et al., 2011a).

1.5.1 Rozvojové země

V rozvojových zemích je udávána výrazně vyšší prevalence *Blastocystis*, než v zemích industrializovaných, a to obvykle mezi 30 až 76 % (např. Clark et al., 2013; Mohammad et al., 2017; Oliveira-Arbex et al., 2018, atd.). Zatím vůbec nejvyšší 100% prevalence byla zaznamenána u dětí pocházejících z malých vesnic v Senegalu (El Safadi et al., 2014). Poměrně vysoké množství lidí pozitivních na blastocysty bylo také v Thajsku, konkrétně se jednalo o 51 % (Pipatsatitpong et al., 2015). Epidemiologická studie provedená ve dvou malých rybářských vesnicích v brazilském São Paolo zjistila přítomnost těchto prvoků u 45 a

75 % jejich obyvatel (David et al., 2015). Naopak pouze 26 % pozitivních případů bylo detekováno v rámci čtyř venkovských komunit v Nepálu (Lee et al., 2012).

Vyšší prevalence blastocyst v rozvojových zemích bývá přisuzována horší socioekonomické situaci v jednotlivých rodinách, zhoršeným hygienickým podmínkám a také nedostatku vzdělání (Leelayoova et al., 2018; Pipatsatitpong et al., 2015).

1.5.2 Industrializované země

Prevalence v industrializovaných zemích se pohybuje kolem 20 % (např. Bart et al., 2013). V rámci evropských zemí bylo provedeno pouze několik epidemiologických studií zaměřených na blastocysty. Například ve Francii zaznamenali prevalenci 23 % (El Safadi et al., 2016). Za zmínku také stojí nizozemská studie, která se zabývala výskytem blastocyst u pacientů v nemocnici (Bart et al., 2013). Autoři této studie zjistili pozitivitu u 24 % lidí. V rámci Evropské unie pochází další práce ze severního Kypru, kde byla zjištěna prevalence blastocyst 28 % (Seyer et al., 2017). Naopak poměrně nízký počet lidí pozitivních na tyto prvoky byl zaznamenán v USA, a to 7 % (Scanlan et al., 2016) a dokonce pouze 1 % pozitivních případů se vyskytovalo v Japonsku (Hirata et al., 2007). Autor starší epidemiologické studie provedené v USA však detekoval prevalenci vyšší, než v předchozím případě, a to 16 % (Amin, 2009).

1.6 Diagnostika

Pro diagnostiku *Blastocystis* se používá celá řada diagnostických metod s různou senzitivitou (Roberts et al., 2011a). Díky jejich morfologické podobnosti s kvasinkami a cystami dalších střevních prvoků, případně s tukovými kapénkami, nemusí být koproskopická diagnostika vždy jednoduchá (Tan, 2008).

1.6.1 Koproskopická diagnostika

Pro diagnostiku blastocyst ze stolice byla hlavně v minulosti často používána přímá mikroskopie nativních vzorků stolice, obvykle v kombinaci s barvenými roztěry stolice (různé trichromany), či sedimentačními metodami (Roberts et al., 2011a). Nicméně dnes se od těchto metod postupně upouští, hlavně kvůli jejich nízké sensitivitě, a bývají nahrazovány kultivací a molekulární diagnostikou.

Existují tři základní typy kultur používaných pro diagnostiku blastocyst a rozrůstání buněk pro *in vitro* studie. První z nich je xenická kultivace, kde prvoci rostou v přítomnosti nedefinované mikroflóry (Clark & Diamond, 2002). Pro xenickou kultivaci je nejčastěji používáno Jonesovo médium, které bylo vytvořeno již v roce 1946 a později bylo modifikováno do podoby, v jaké ji známe dodnes (Leelayoova et al., 2002; Suresh & Smith, 2004). Dalším typem je monoxenická kultura, ve které daný prvok roste ještě v přítomnosti dalšího definovaného mikroorganismu (Clark & Diamond, 2002). Posledním typem je axenická kultura, kde cílový organismus roste bez přítomnosti jakýchkoliv dalších mikroorganismů (Clark & Diamond, 2002). Axenická kultivace je pro studium blastocyst nejvýhodnější, nicméně získat čistou suspenzi buněk bez příměsi bakterií a dalších kontaminujících mikroorganismů je velmi komplikované a často také neefektivní (Lhotská, 2016).

1.6.2 Molekulární diagnostika

V dnešní době je nejpoužívanější metodou konvenční nebo real–time PCR s využitím specifických primerů pro rod *Blastocystis* (např. Roberts et al., 2011a). Jednotlivé subtypy jsou dále obvykle specifikovány buď za použití sekvenování části malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA) z PCR produktů, nebo PCR s použitím STS [subtype-specific sequence-tagged-site] diagnostických primerů (Stensvold et al., 2013). Výhodou STS primerů v diagnostice je skutečnost, že není nutné provádět sekvenaci PCR produktů, protože nedochází k amplifikaci jiné DNA, než blastocyst. Nicméně použití těchto primerů má svá omezení. Jsou schopné zachytit pouze subtypy ST1-ST7 a mnoho vzorků proto může zůstat falešně negativních. Navíc jednotlivé subtypy blastocyst vykazují značnou intra-subtypovou variabilitu (Stensvold et al., 2012) a zatím není známo, zda jsou tyto specifické primery schopné detekovat všechny genetické varianty (Stensvold, 2013).

Velmi často jsou nyní pro diagnostiku blastocyst využívány primery pro „barcoding“, označované BhRDr a RD5 (Scicluna et al., 2006). Na základě dosud získaných sekvencí je možné rozlišit nejen všechny subtypy blastocyst (ST1-ST17), ale do jisté míry také určit intra-subtypovou variabilitu na základě rozdílnosti specifických alel (Stensvold, 2013). Sekvence jsou vyhodnocovány s použitím barkódovací platformy speciálně určené pro blastocysty a dostupné na www.pubmlst.org/blastocystis (viz kapitola 1.6.2.1). Tyto primery byly navrženy pro diagnostiku *Blastocystis* z xenických kultur (Scicluna et al., 2006), nicméně se velmi často používají také přímo pro diagnostiku ze vzorku stolice či trusu. V tomto případě je detekce

blastocyst komplikovanější vzhledem nižší specifitě „forward“ primeru RD5, na rozdíl od primeru BhRDr. Díky této specifitě dochází občas k amplifikaci nejen blastocyst, ale také například plísní a hub, a všechny takzvaně pozitivní vzorky je tedy třeba ověřovat sekvenačně (Stensvold, 2013).

Další hojně používanou molekulární metodou pro diagnostiku blastocyst je již zmíněná real-time PCR, jejíž výhodou je vysoká senzitivita a specifita. Tato metoda je často používána pro prvotní „screening“ vzorků (Stensvold et al., 2012). Poté následuje opět získání sekvencí a jejich otypování (viz výše).

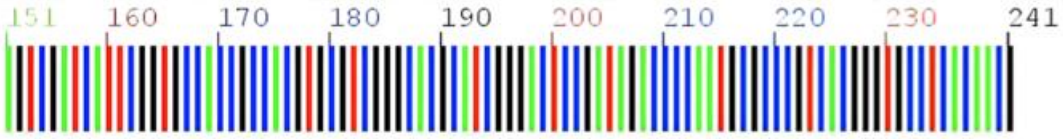
1.6.2.1 „Barcoding“ blastocyst

Jedná se o molekulárně-fylogenetickou metodu sloužící k rychlé identifikaci druhů různých organismů (od obratlovců a rostlin, až po prvoky), a to na základě sekvence krátkých úseků DNA pomocí vysoce universálních primerů (Hebert et al., 2003). Tyto úseky DNA musí splňovat podmínku vysoké variability na úrovni druhu, či genetické varianty (rozdílnost do 5 procent), a následně jsou otypovány ve formě „čárového kódu“, tzv. „barcode“ (Obr. 3), ve speciálních barkódovacích databázích. U prvoků je dnes pro „barcoding“ vybírán nejčastěji úsek malé ribozomální podjednotky [SSU rRNA] (Pawlowski et al., 2012) . Autoři Scicluna et al. (2006) tedy zvolili pro zavedení barcodingu u tohoto prvoka právě sekvenci SSU rRNA o velikosti 600 bp, která se ukázala jako dostatečně variabilní pro určení subtypů blastocyst. Pro barkódování *Blastocystis* jsou používány primery zmíněné již v předchozí kapitole, a to BhRDr a RD5 (Scicluna et al., 2006).

Molekulární epidemiologie *Blastocystis* bývá často zkoumána na základě jednotlivých subtypů, analýzy alel na základě SSU rRNA, nebo multilokusové sekvenační typizaci [MLST; multilocus sequence typing]. Pro tyto účely byla vytvořena platforma pro barkódování u blastocyst, která je dostupná na www.pubmlst.org/*Blastocystis* a obsahuje jak sekvence získané z barkódovacího protokolu, tak i z MLST. Bylo zjištěno, že blastocysty vykazují značný genetický polymorfismus (Stensvold et al., 2012) a právě „barcoding“ umožňuje analýzu alel na základě SSU rRNA, která je platným ukazatelem genetické variability uvnitř subtypů (Scicluna et al., 2006). Například v rámci ST3 je nyní identifikováno 35 různých alel (http://www.blastocystis.net/p/lab-stuff.html). Díky schopnosti této barcodovací platformy zachytit i intra-subtypovou variabilitu (tzn. variabilitu v rámci jednoho subtypu), není pro většinu vzorků nutné provádět dodatečné fylogenetické analýzy. Tato metoda umožňuje

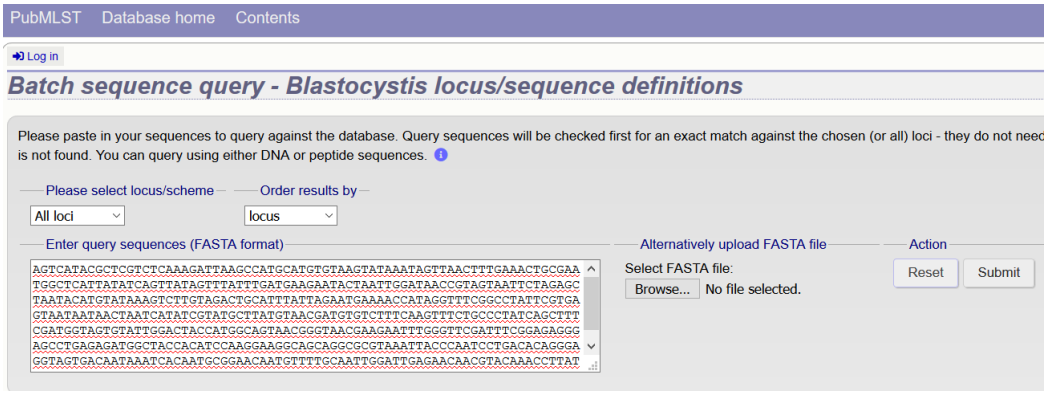
jednodušší a komplexnější výzkum. Lze například odhalit, zda infekce u dvou jedinců pochází ze stejného zdroje (pokud je shodný subtyp a také alela), apod. Fylogenetické analýzy se používají jen v případě nově objevených subtypů nebo alel, které tato platforma zatím nezná. Použití této barkódovací platformy je velmi jednoduché. Stačí pouze vložit sekvenci DNA, jak je vidět na obrázku 4 a 5.

Obr. 3: DNA „barcode“; modifikováno z Yu et al. (2017)

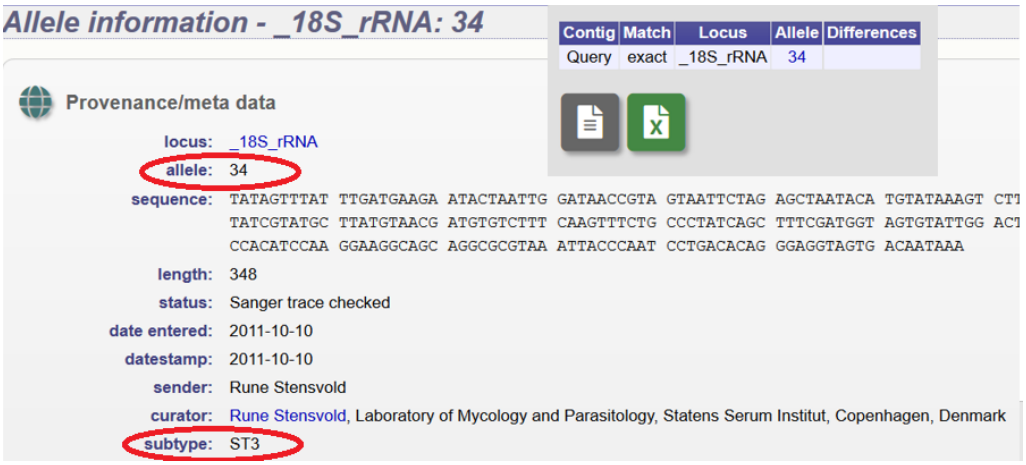


Obr. 4: Použití platformy pro „barcoding“ – vložení sekvence.

(https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_blastocystis_seqdef&page=batchSequenceQuery).



Obr. 5: Výsledný záznam barcodovací platformy (určení subtypu a jednotlivých alel v rámci intra-subtypové variability).



2 Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo zjistit prevalenci střevního prvoka rodu *Blastocystis* spp. v souboru zdravých dobrovolníků pocházejících z České republiky.

Dílčí cíle byly následující:

- získat dostatečný počet vzorků stolice od zdravých dobrovolníků, jejich rodinných příslušníků, a případně zvířat;
- určit celkovou prevalenci střevního prvoka rodu *Blastocystis* v získaném datasetu dobrovolníků, včetně určení jeho subtypů;
- ověřit a porovnat sensitivitu dvou diagnostických metod – xenické kultivace a molekulární diagnostiky (PCR);
- zjistit prevalence blastocyst a jejich subtypů v rámci jednotlivých rodin;
- zjistit případné korelace četnosti výskytu *Blastocystis* spp. s určitými specifickými faktory, jako jsou životní styl (cestování, venkov/město), kontakt se zvířaty, pohlaví a věk;

3 Materiál a metodika

3.1 Získávání a sběr vzorků

Vzorky stolice byly získávány neinvazivní cestou od dobrovolníků, kterým byla nabídnuta dobrovolná a neplacená účast v projektu. Kromě vzorků lidských byly v případě zájmu přijímány také vzorky trusu zvířat, se kterými jsou účastníci v úzkém kontaktu. Tyto vzorky byly důležité hlavně pro hlubší porozumění vztahu mezi prevalencí *Blastocystis* spp. u lidí a u zvířat, zejména případného zoonotického potenciálu (tj., sdílení stejných subtypů blastocyst u lidí a zvířat v jedné lokalitě/rodině). Všichni zúčastnění vyplnili formulář s informacemi potřebnými pro náš výzkum, a to informace o dietě (vegetarián, vegan, atp.), kontaktu se zvířaty, četnosti cestování a zda trpí zánětlivým onemocněním střev.

Všechna data byla striktně anonymizována a zpracovávána dle zákona č. 101/200 Sb. O ochraně osobních údajů. Tato práce byla zároveň součástí větší studie, která byla posouzena jako eticky přípustná a odpovídající rozsahu Etické komise Biologického centra AV ČR v.v.i. v Českých Budějovicích (číslo rozhodnutí 1/2017).

3.1.1 Metody oslovení dobrovolníků v rámci celé ČR

Pro oslovení jednotlivých účastníků studie byly použity různé strategie. Kromě přímého oslovení z řad známých a rodiny byly také použity informační plakáty, které byly vyvěšovány na různých veřejných místech – například veterinární ordinace, vývěsní tabule, informační nástěnky na studentských kolejí apod. Dále byla použita média, jako jsou noviny či rozhovory v různých rozhlasových, nebo televizních pořadech. Poslední zmíněná varianta měla největší ohlas. Každý zúčastněný obdržel informační brožuru, která obsahovala všechny potřebné informace o studii, způsobu odběru vzorku a jeho uchovávání. Zúčastnění, kteří neměli možnost vzorek doručit osobně, jej zasílali doporučeně poštou podle podrobných pokynů, které obdrželi od nás emailem či telefonicky.

3.2 Diagnostika Blastocystis

Pro diagnostiku prvoka rodu *Blastocystis* ze vzorků byly použity dvě nezávislé diagnostické metody. První metodou byla kultivace v tekutém modifikovaném Jonesově médiu (Leelayoova et al., 2002; Suresh & Smith, 2004) s následnou mikroskopickou kontrolou. Jako paralelní diagnostika a metoda pro určení subtypů *Blastocystis* byla využita molekulární detekce s využitím PCR a následně otypování sekvencí (ví informací níže).

3.2.1 Kultivace

Pro kultivaci blastocyst bylo použito tekuté modifikované Jonesovo médium. Kultivace probíhala při 37°C v uzavřených skleněných kultivačních zkumavkách se šroubovacím závitem. Třetí den kultivace byla kultura přeočkována sterilní skleněnou Pasteurovou pipetou do čerstvého média (Clark & Diamond, 2002). Kultivační zkumavky byly vždy umístěny v termostatu (Sanyo MIR-153) s teplotou 37°C. Po dalších třech dnech byla zjišťována přítomnost/absence blastocyst mikroskopicky (Olympus CX22LED) při zvětšení 400x.

3.2.1.1 Modifikované Jonesovo médium

Tekuté Jonesovo médium je používáno zejména pro diagnostiku *Blastocystis* ve vzorcích stolice či trusu získaných od nejrůznějších hostitelů. Toto médium bylo modifikováno (Leelayoova et al., 2002; Suresh & Smith, 2004).

Seznam chemikálií a jejich navážek pro přípravu modifikovaného Jonesova média:

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

Příprava média:

Nejprve byly připraveny pracovní roztoky dle následujícího popisu:

- 0,946g Na_2HPO_4 a 0,908g KH_2PO_4 se separovaně rozpustilo ve 100 ml destilované vody;
- 1,8g NaCl se rozpustilo ve 200 ml destilované vody;
- z těchto pracovních roztoků bylo následně připraveno finální médium;
- dané objemy pracovních roztoků (31,2 ml Na_2HPO_4, 10,4 ml KH_2PO_4 a 187,5 ml NaCl) byly smíchány;
- dále bylo přidáno 0,23g kvasničného autolyzátu;
- následovala sterilizace v autoklávu při teplotě 121°C a tlaku 101,5 kPa (50 min);
- po vychladnutí takto připraveného roztoku bylo nakonec sterilně přidáno inaktivované koňské sérum, a to 10% celkového objemu výsledného roztoku;

Nakonec byly sterilně připraveny alikvóty média po 4 ml do předem připravených sterilních 10 ml kultivačních zkumavek se šroubovacím závitem. Takto připravené médium bylo do svého použití krátkodobě uchováváno při 4°C.

3.2.2 Molekulární detekce

3.2.2.1 Izolace DNA

Celková DNA byla izolována komerčním kitem (PSP Spin Stool DNA, Stratec, Německo) podle protokolu dodaného výrobcem. Z každého vzorku bylo takto získáno 200 µl DNA, která byla následně rozpipetována a dlouhodobě uchovávána při teplotě -20°C.

3.2.2.2 Amplifikace SSU rDNA

Amplifikace vhodně zvoleného úseku (600 bp) DNA (Scicluna et al., 2006) byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití dvou specifických primerů (dodavatel Sigma-Aldrich, USA) pro *Blastocystis* (označení RD5, BhRDr), viz tabulka 1.

Tab.1: Přehled použitých primerů.

Název primeru	Citace	Sekvence 5´- 3´
RD5	Scicluna et al. (2006)	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT
BhRDr		GAGCTTTTTAACTGCAACAACG

Pro reakční směs bylo použito 5 µl komerčně vyráběného 2x koncentrovaného mastermixu (AccuPower® Taq PCR PreMix; Bioneer), ke kterému se přidalo po 1 µl obou primerů (pracovní koncentrace 10 µM) a 2 µl DNA. Tato směs byla nakonec doplněna sterilní PCR vodou do konečného objemu 10 µl. Kromě testovaných vzorků DNA obsahovala každá sada PCR reakcí také negativní kontrolu. DNA v tomto případě nahrazovala voda (tzv. blank) a pozitivní kontrolu obsahující DNA z trusu potkana pozitivního na *Blastocystis*. Vlastní PCR reakce probíhala v cycleru (T100^{TM} Thermal Cycler, Biorad, USA) za optimalizovaných podmínek: 94°C po dobu 5 minut; 34x (94°C/1 min; 56°C/1 min; 72°C/1 min); a 72°C po dobu 5 minut.

3.2.2.3 Elektroforéza

Pro zviditelnění a kontrolu vlastní PCR reakce byla použita gelová elektroforéza na 1% agarózovém gelu. Ten byl připraven smícháním 0,5 g agarózy (Amresco, USA) a 50 ml pufru (1x koncentrovaný) TAE (Tris-Acetate-EDTA). Do agarózového gelu byl navíc během přípravy přidán 1 µl ethidium-bromidu (10 mg/ml) pro zviditelnění amplifikované DNA při osvícení UV zářením. Tento roztok byl nalit do předem připravené vaničky, do které byly následně vloženy hřebínky. Po ztuhnutí takto připraveného gelu bylo do každé z jamek naneseno 8 µl reakční směsi. Pro odhad velikosti separovaných DNA fragmentů se do jedné z jamek nanesl také velikostní marker (Invitrogen, USA) s definovanou velikostí jednotlivých fragmentů. Elektroforéza probíhala při napětí 70-100 V po dobu cca 35 minut. Vizualizace gelu probíhala pomocí UV transiluminátoru (UltraLum 900-1425-24).

Pokud se amplifikoval velikostně odpovídající fragment, byla provedena extrakce DNA z gelu a její následná izolace pomocí komerčního kitu (GenElute TM Gel Extraction Kit, Sigma – Aldrich, USA).

3.2.2.4 Sekvenování a určování subtypů Blastocystis

Sekvenace vzorků s ověřenou pozitivitou na *Blastocystis* byla provedena firmou Eurofins GATC Biotech (Německo). Pro tyto účely byly vzorky připravovány smícháním 5 µl PCR amplikonu, 1 µl reverse (případně forward) primeru a 4 µl PCR vody. Výsledné sekvence byly ověřeny pomocí online serveru BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) a následně zpracovávány v programu Geneious Prime 2019.0.4.

Pro určení subtypů byly sekvence následně otypovány v platformě pro barcoding (http://pubmlst.org/blastocystis/), umožňující analýzu na základě SSU rRNA alel, která je platným ukazatelem genetické variability uvnitř subtypů (Scicluna et al., 2006).

3.2.2.5 Klonování

Suspektní vzorky, obsahující v sekvenci více signálů, resp. překrývající se signály, byly dále klonovány, aby byly odhaleny případné smíšené infekce více subtypů blastocyst.

Pro klonování byl použit pGEM®-T Easy Vector Systém I (Promega, USA), jehož použití je uvedeno v tabulce 2. Takto připravená směs se nechala přes noc inkubovat při 4°C.

Tab. 2: Sloučeniny pro přípravu vektoru a jejich použité množství.

Název sloučeniny	**Přidaný objem [µl]**
2x Rapid Ligation Buffer	5
pGem®-T Easy vector	1
PCR produkt	2,3
T4 DNA Ligase	1
PCR voda	0,7

Transformace kompetentních buněk:

Klonovací vektor byl dále smíchán se 100 µl kompetentních buněk *E. coli* (kmen XL1) a ponechán 10 min na ledu. Poté byl proveden tzv. „heat shock“ zahřátím směsi v termobloku Bio TDB-100 (Biosan) na 42 °C po dobu 52 s. Následovalo prudké zchlazení na ledu po dobu cca 2 min. Po provedeném teplotním šoku bylo ke směsi přidáno 150 µl SOC média (trypton, kvasničný autolyzát, NaCl, glukóza) předehřátého na 37°C. Takto připravené zkumavky se nechaly třepat v horizontální poloze po dobu 40 minut při 37°C.

Kultivace buněk na agarových plotnách:

Pro následnou kultivaci byly předem připraveny Petriho misky s bakteriálním agarem obohacené ampicilinem (25 mg/ml). Před vlastním výsevem buněk bylo na každou Petriho misku naneseno a rovnoměrně rozetřeno pomocí bakteriologické hokejky 35 µl X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid, Amresco, USA) a 5 µl IPTG (izopropyl-β-D-thiogalaktosid, Amresco, USA) (Green & Sambrook, 2012). Po inkubaci byla nakonec nanesena připravená směs buněk. Takto připravené Petriho misky se nechaly přes noc inkubovat při teplotě 37°C.

Namnožení hostitelských buněk:

Po skončení inkubace byly z každého vzorku na Petriho misce sterilní špičkou odebrány tři bílé kolonie a přeneseny do připravených zkumavek se 4 ml tekutého LB média (trypton, kvasničný extrakt a NaCl) obohaceného o ampicilin (4 µl zásobního roztoku ampicilinu o koncentraci 25mg/ml na 1ml LB média). Tato směs byla opět inkubována přes noc v třepačce při 37°C. Narostlé buňky byly následně odstředěny v 1,5 ml mikrozkumavkách při maximální rychlosti. Získaný sediment byl použit pro následnou izolaci plazmidové DNA.

Izolace plazmidové DNA:

Pro izolaci plazmidové DNA byl použit komerční kit High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Švýcarsko) dle návodu uvedeného výrobcem.

Restrikční štěpení:

Vyizolovaná plazmidová DNA byla štěpena pomocí restrikčního enzymu EcoRI (New England Biolabs, USA) pro ověření, nese-li fragment odpovídající velikosti. Reakční směs obsahovala 3 µl plasmidové DNA, 1 µl pufru (10x koncentrace) s 2 jednotkami enzymu EcoRI a 6 µl PCR vody.

Takto připravená směs byla následně inkubována 30 minut v termostatu (Sanyo MIR-153) s teplotou 37°C. Následnou elektroforézou na 1 % agarózovém gelu bylo dle velikosti klonovacího vektoru a velikosti inzertu ověřeno, zda klon obsahuje inzert, či nikoliv.

Vybrané klony byly sekvenovány (Eurofins GATC Biotech). Vzorky pro sekvenaci byly připraveny smícháním 5 µl plasmidové DNA, 1 µl primeru T7 forward (5´-TAATACGACTCACTATAGGG- 3´) (Invitrogen, USA) a 4 µl PCR vody.

3.3 Zjišťování prevalence Blastocystis

Na základě výsledků PCR a xenické kultivace, výskytu blastocyst a jejich subtypů a také v korelaci s různými faktory, byly počítány prevalence. Celková prevalence byla vypočítána ze všech vzorků, tj. zvířecích i lidských. Pro ostatní výpočty prevalence v korelaci s určitými faktory se vycházelo vždy z počtu vzorků v dané kategorii, jak je vždy přesně uvedeno ve výsledcích.

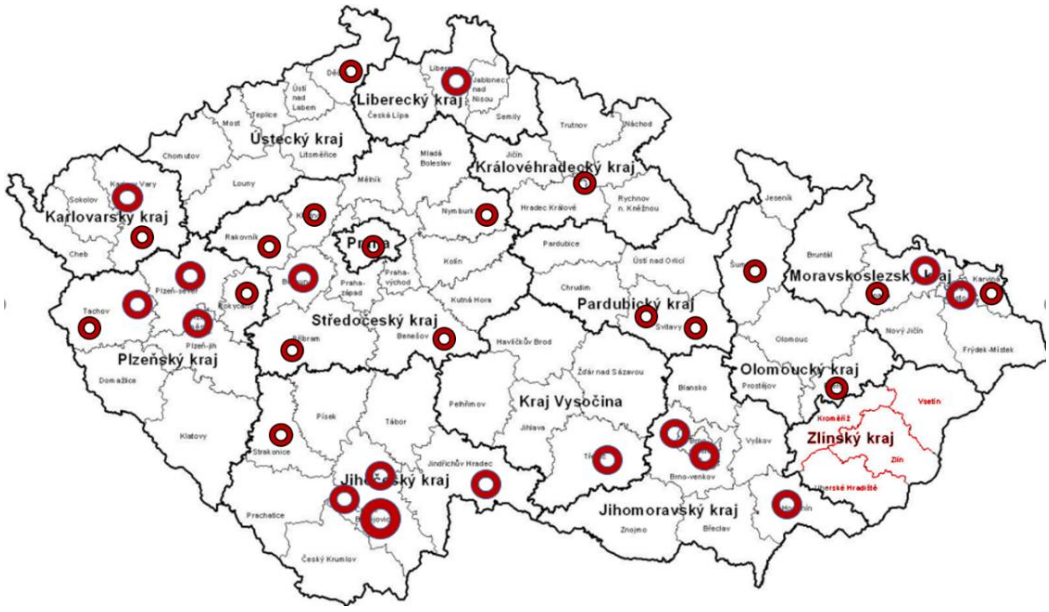
4 Výsledky

4.1 Získaný dataset vzorků

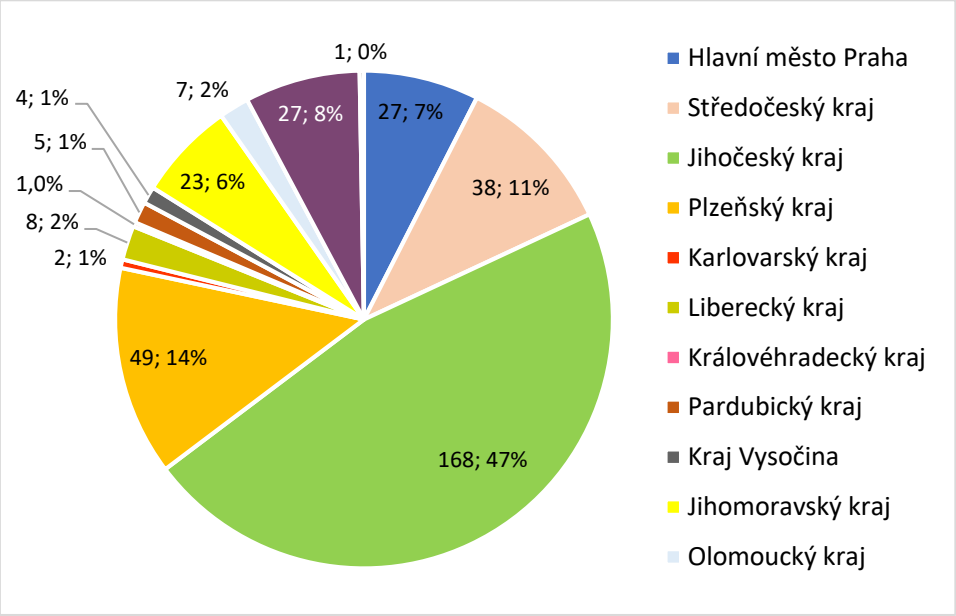
Celkem bylo získáno 411 vzorků a v rámci této práce bylo zpracováno 360 vzorků, z nichž 242 vzorků je lidských a 118 vzorků pochází od zvířat, se kterými jsou zúčastnění v blízkém kontaktu. Většinu vzorků jsme získali až v pokročilé fázi této studie, proto budou analýzy zbývajících vzorků z časových a kapacitních důvodů dokončeny později a vyústí plánovanou vědeckou publikací.

Vzorky byly získávány z různých částí České republiky, jak je pro ilustraci znázorněno na následující mapě (viz Obr. 6). V datasetu vzorků jsou zastoupeny téměř všechny kraje České republiky, vzorky chybí pouze ze Zlínského kraje, který je na mapě zabarvený červeně. Nejvíce vzorků pochází z Jihočeského kraje (47 %), následuje Plzeňský (14 %) a Středočeský kraj (11 %). Procentuální zastoupení vzorků ze všech krajů České republiky je graficky znázorněno v grafu 1. Celkem bylo také získáno 118 vzorků různých zvířat, se kterými jsou zúčastnění v těsném kontaktu. Nejvíce vzorků pocházelo od psů (40 %), dále od koní (13 %) a od koček (12 %). Do skupiny označené jako „ostatní“ spadal pouze jeden vzorek pocházející z ježka afrického. Množství vzorků získaných od zvířat je shrnuto v tabulce 3. Zastoupení těchto vzorků v procentech je dále graficky znázorněno v grafu 2.

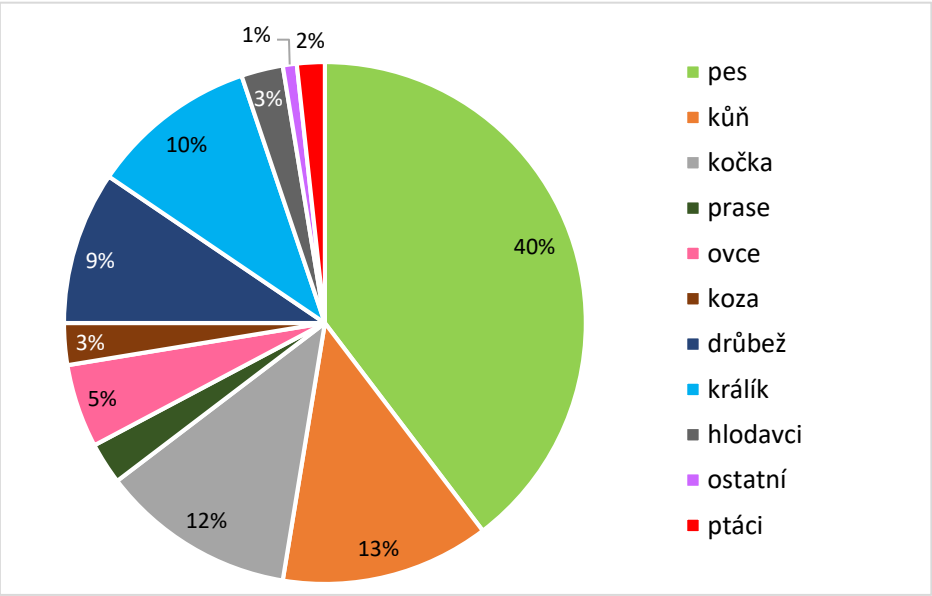
Obr. 6: Grafické znázornění jednotlivých lokalit ČR, ze kterých byly vzorky získány.



Graf 1: Zastoupení vzorků lidí a jejich zvířat v rámci jednotlivých krajů ČR. První číslo vyjadřuje počet vzorků, číslo za středníkem hodnotu v procentech, a to z celkových 360 zpracovaných vzorků.



Graf 2: Procentuální zastoupení vzorků různých druhů zvířat.



Tab. 3: Množství vzorků získaných od zvířat.

Zvíře	Počet vzorků	Zvíře	Počet vzorků
psi	46	kozy	3
koně	15	králíci	12
kočky	14	drůbež	11
prasata	3	ostatní ptáci	2
ovce	6	ostatní	1
hlodavci	3		

4.2 Porovnání senzitivity dvou diagnostických metod

Pro detekci blastocyst ve vzorcích byly použity dvě různé diagnostické metody. Jednalo se o klasickou xenickou kultivaci v Jonesově médiu a molekulární diagnostiku. Pro každý vzorek byly použity obě zmíněné metody.

Kultivace odhalila infekci v 55 vzorcích z celkových 63 sekvenačně pozitivních případů, selhala tedy v osmi případech. Jednalo se především o vzorky zvířat, konkrétně o dva vzorky kravské, jeden koňský, jeden ovčí a jeden psí. Kultivace dále nebyla efektivní také u tří lidských vzorků. Molekulární diagnostika sice odhalila osm případů *Blastocystis* spp. více oproti kultivaci a měla tedy vyšší citlivost, ale zároveň bylo 11 vzorků pravděpodobně falešně pozitivních. Až po sekvenaci těchto vzorků bylo zjištěno, že se o blastocysty nejedná. V devíti z 11 případů těchto falešně pozitivních vzorků se jednalo o vzorky zvířat. Sekvenace většinou odhalila bakterie, plísně, či rostlinné kontaminace. Ani jedna z použitých metod nebyla samostatně 100% úspěšná, nicméně kombinace obou zmíněných se ukázala být nejvhodnější.

4.3 Prevalence *Blastocystis* spp. a určení jeho subtypů

Celková prevalence blastocyst (tj. lidí a zvířat) v našem datasetu vzorků je 17 %. Pozitivních vzorků bylo celkem 62 a negativních 298 z počtu 360 zpracovaných vzorků. Prevalence u lidí dosahuje 21 % (pozitivních 51 vzorků z 242 zanalyzovaných vzorků od lidí), zatímco u zvířat pouze 9 % (pozitivních 11 vzorků ze 118 zanalyzovaných vzorků od zvířat). Naše výsledky prevalence *Blastocystis* u lidí a zvířat v České republice jsou znázorněny na grafu 4. Celkově bylo u lidí a u zvířat zaznamenáno devět různých subtypů blastocyst, jmenovitě ST1-ST7, ST10, ST14. Dále byly detekovány tři neidentifikované subtypy – u těchto vzorků bude nutné provézt fylogenetické analýzy, které budou dopracovány pro následnou publikaci. U lidských vzorků bylo zjištěno celkem šest z devíti popsaných subtypů, jejichž výskyt byl zaznamenán u člověka (Alfellani et al., 2013). Konkrétně se jednalo o subtypy ST1, ST2, ST3, ST4, ST6,

ST7. Zajímavým výsledkem je nalezení typicky ptačích subtypů *Blastocystis* ST6 a ST7 u lidí (Stensvold et al., 2009), a to čtyř případů subtypu ST6 a pěti ST7. Co se týče celkového výskytu jednotlivých subtypů, nejčastěji byl zaznamenán subtyp ST3 s 36% prevalencí, na druhém místě subtyp ST1 s 20% prevalencí a následně ST7 se 14% prevalencí. Přehled zjištěných subtypů u lidí a u zvířat je shrnut v grafu 5. U lidí byl nejčastějším subtypem ST3 (42 %), dále ST1 (23 %) a ST7 (11 %).

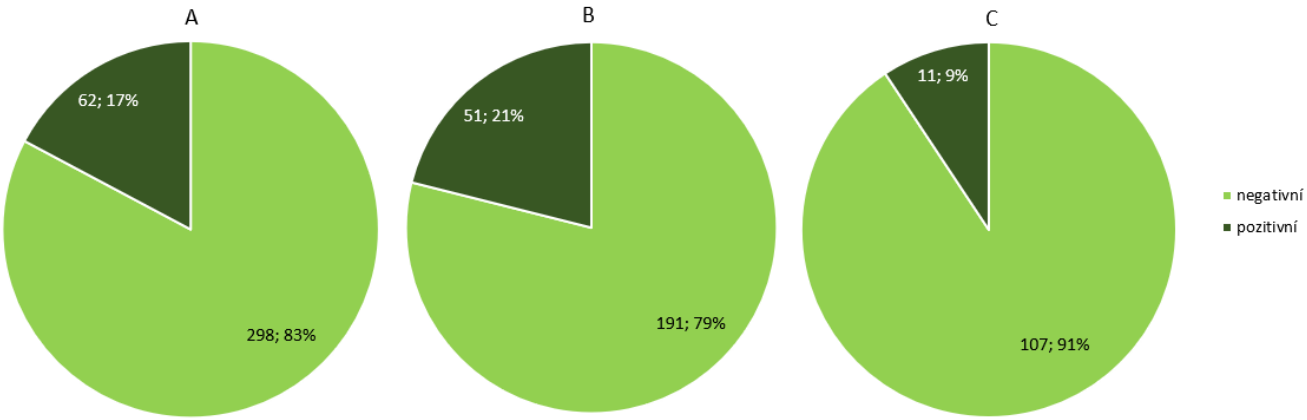
V datasetu vzorků byla na základě SSU rRNA zaznamenána také značná intra-subtypová variabilita (tzn. variabilita v rámci jednoho subtypu). U lidských vzorků byly v rámci jednotlivých subtypů detekovány tyto alely: ST1- alela 4; ST2 - alela 9, 11 a 12; ST3 - alela 34 a 38; ST4 - alela 42 a 92; ST6 - alela 123; a ST7 - alela 41, 110 a 112. Jednotlivé alely v rámci daných subtypů jsou shrnuty také v tabulce 4. Z trusu zvířat byly dále detekovány subtypy ST5 (alela 17 a 119) u prasat, ST7 (alela 112) u husy, ST10 (alela 43) a ST14 u ovcí, ST10 (alela 43) byl detekován dále také u dvou vzorků z krav. U dvou psů byl zaznamenán ST7 (alela 112). Rozdíly ve variabilitě subtypů u lidí a u zvířat jsou pro porovnání znázorněny v grafu 6.

U dvou lidských a tří zvířecích vzorků se nám nepodařilo najít shodu alel v rámci barkódovací databáze pro *Blastocystis* (http://pubmlst.org/ blastocystis/) a pravděpodobně se jedná o alely nové, a nebo v této databázi zatím neuvedené. Tyto neznámé alely jsou v textu uvedeny jako „alela x“. Největší podobnost alel v rámci intra-subtypové variability byla zaznamenána u ST1, kdy se ve všech 12 případech jednalo o stejnou alelu, a to alelu 4 (Tab. 4). Také u ST6 se vyskytla vždy stejná alela 123. Nízká intra-subtypová variabilita byla také u ST3, kdy se v 95 % případů jednalo o alelu 34. Naopak velká intra-subtypová variabilita se vyskytla například u subtypů ST2 a ST7.

V rámci zjišťování, zda lidé a zvířata sdílejí nějaké subtypy (pro případné zhodnocení zoonotického potenciálu), byl odhalen pouze jeden subtyp, a to ST7, který byl ve dvou případech nalezen jak u lidí, tak u psů a jedné husy. V obou případech se jednalo o alelu 112.

Dále jsme identifikovali tři případy možné smíšené infekce, nicméně klonování se nezdařilo a je třeba ho ještě opakovat. To, jak se jednotlivé subtypy od sebe liší, je znázorněno v alignmentu (Obr. 7). Nejvyšší variabilita byla zaznamenána v úsecích 85-95, 145-160, 195-230, 280-290 a 300-310 nukleotidů.

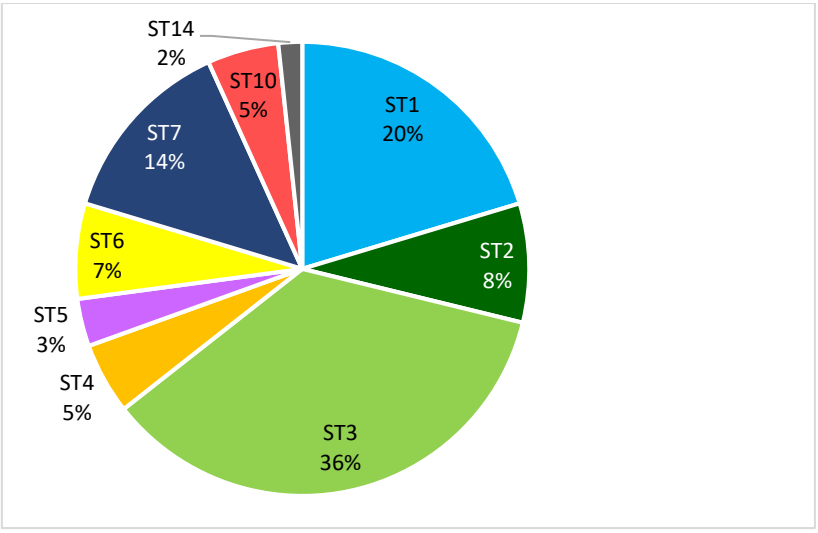
Graf 4: Celková prevalence *Blastocystis* spp. v datasetu dobrovolníků a jejich zvířat (A – celková prevalence; B – prevalence u lidí; C – prevalence u zvířat). První číslo vyjadřuje vždy počet vyšetřených vzorků, číslo za středníkem prevalenci v procentech.



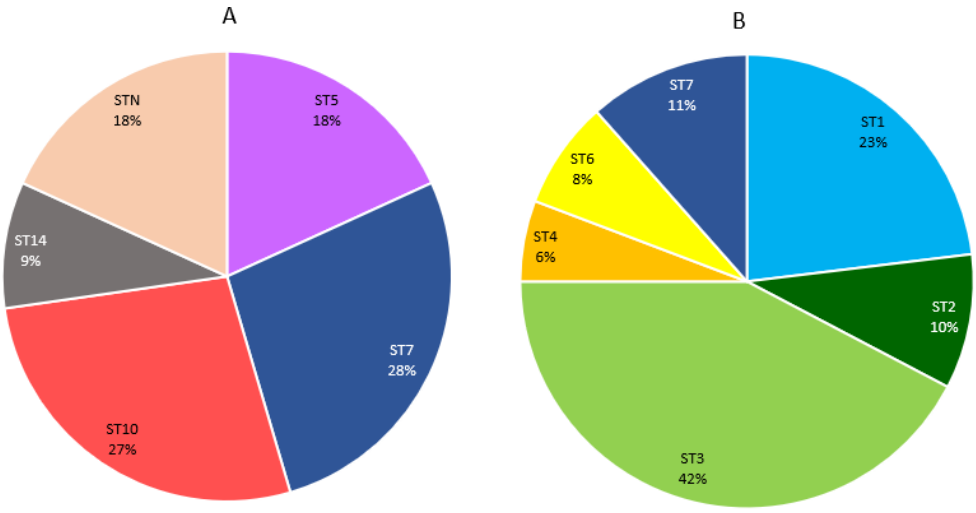
Tab. 4: Intra-subtypová variabilita v datasetu vzorků. (N = počet pozitivních vzorků)

Subtyp	Hostitel	N vzorků	Alela/-y	Subtyp	Hostitel	N vzorků	Alela/-y
ST1	člověk	12	12× alela 4	**ST6**	člověk	4	4× alela 123
ST2	člověk	5	2× alela 9 2× alela 11 1× alela 12	**ST7**	člověk psi husa	8	2×alela 41 1× alela x 4× alela 112 1× alela 110
ST3	člověk	21	20× alela 34 1× alela 38	**ST10**	krávy ovce	3	1× alela x 2× alela 43
ST4	člověk	3	2× alela 42 1× alela 92	**ST14**	ovce	1	1× alela x
ST5	prasata	2	1× alela 17 1× alela 119				

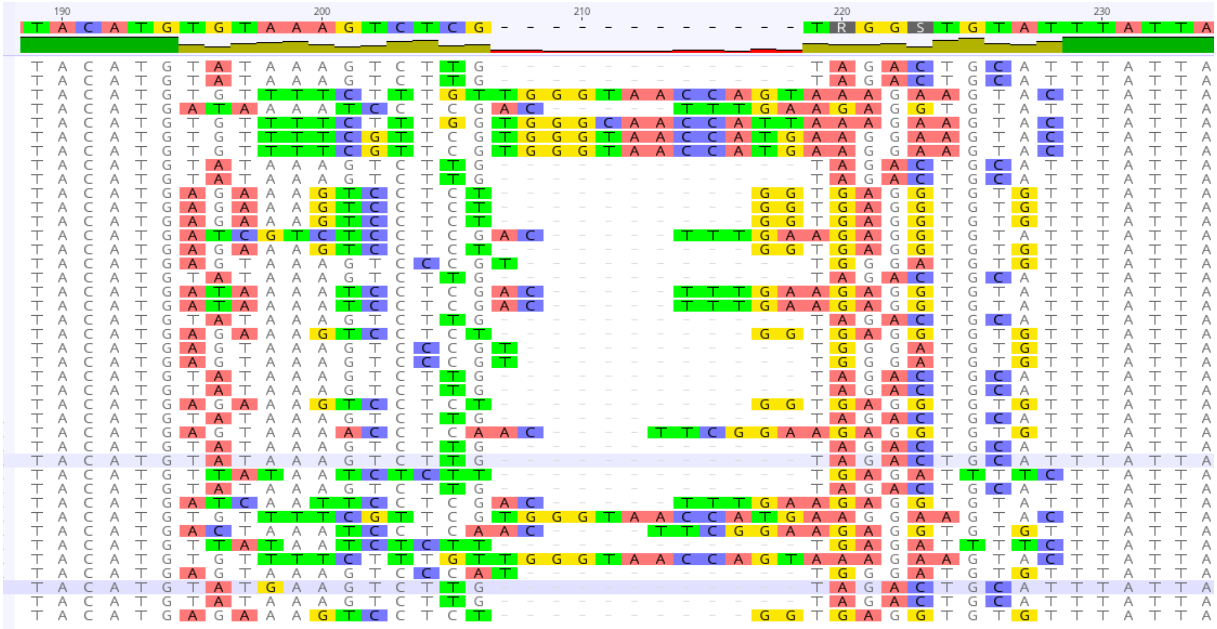
Graf 5: Celkové zastoupení jednotlivých detekovaných subtypů u lidí i zvířat v procentech.



Graf 6: Porovnání výskytu subtypů u lidí a u zvířat (A – subtypy detekované u zvířat; STN – neidentifikovaný subtyp; B – subtypy detekované u lidí).



Obr. 7: Část alingmentu jedné z nejvariabilnějších oblastí amplifikovaného úseku SSU rRNA genu u *Blastocystis* spp. (195-230 nukleotidů).



4.4 Zjištění prevalence blastocyst a jejich subtypů v rámci jednotlivých rodin

V průběhu této práce se nám podařilo získat poměrně velké množství vzorků, které pochází od více rodinných příslušníků a bylo tedy možné zjistit, zda se infekce *Blastocystis* spp. přenáší i mezi jednotlivými členy rodiny. Každá rodina byla označena svým kódem dle abecedy a data byla shrnuta do výsledné tabulky. Za „rodinu“ bylo považován soubor dvou a více členů. Rodiny byly dále ještě rozděleny do dvou kategorií – na ty, které žijí ve městě a rodiny žijící na vesnici. Tento aspekt byl dále rozvíjen také v rámci posledního dílčího cíle práce.

V naší studii je zahrnuto celkem 54 rodin, z nichž polovina rodin (27) byla pozitivních na blastocysty a polovina (27) rodin byla negativních. Ve většině případů (21/27) byl pozitivní pouze jeden člen rodiny. Zajímavé bylo také zjištění, že se v některých rodinách objevovalo více subtypů – například u jedné čtyřčlenné rodiny byl detekován ST1 (alela 4), ST2 (alela 9) a ST6 (alela 123). Podobných případů bylo nalezeno více, jak je dobře vidět v tabulce 6.

Shodné subtypy u více rodinných příslušníků byly nalezeny pouze ve třech případech. Jednalo se o jednu rodinu žijící ve městě, kde oba manželé sdíleli stejný subtyp ST3 a také stejnou alelu 34. Dále dvě rodiny žijící na vesnici – v obou případech se jednalo o tříčlennou rodinu, u které se vyskytoval ve všech případech stejný subtyp ST1 a stejná alela 4. Dá se tedy předpokládat, že se infekce *Blastocystis* spp. může mezi rodinnými příslušníky přenášet, ale nedochází k tomu příliš často.

Tab.6: Přehled výskytu blastocyst a jejich subtypů v jednotlivých rodinách (Ozn. – označení rodiny; N – počet členů; N + - počet pozitivních členů rodiny; za lomítkem hodnota v procentech). Modře zabarvené buňky s křížkem označují rodiny, které byly negativní na *Blastocystis* a žijící ve městě; zeleně zabarvené u negativních rodin žijících na vesnici.

Rodiny ve městě								Rodiny na vesnici			
Ozn	**N**	**N+ /%**	**Subtyp/-y (alela/-y)**	**Ozn**	**N**	**N+ /%**	**Subtyp/-y (alela/-y)**	**Ozn**	**N**	**N+ /%**	**Subtyp/-y (alela/-y)**
A2	2	1/50	ST3 (34)	V2	2	0/0	×	A1	3	3/100	ST1 (4) ST1 (4) ST1 (4)
B2	4	3/75	ST1 (4) ST6 (123) ST2 (9)	W2	2	0/0	×	B1	2	1/50	ST3 (34)
C2	3	1/33	ST1 (4)	X2	2	1/50	ST7 (110)	C1	3	1/33	ST4 (92)
D2	2	0/0	×	Y2	5	0/0	×	D1	2	0/0	×
E2	2	0/0	×	Z2	3	1/33	ST7 (41)	E1	4	1/25	ST1 (4)
F2	2	0/0	×	AA2	2	2/100	ST3 (34) ST3 (34)	F1	3	0/0	×
G2	2	1/50	ST3 (34)	BB2	3	1/33	ST3 (34)	G1	2	0/0	×
H2	2	0/0	×	CC2	3	0/0	×	H1	3	1/33	ST6 (123)
I2	2	0/0	×	DD2	3	1/33	ST3 (34)	I1	2	2/100	ST3 (34) ST6 (123)
J2	2	0/0	×	EE2	5	0/0	×	J1	3	1/33	ST7 (41)
K2	3	0/0	×	FF2	4	2/50	ST3 (34) *STx*	K1	3	3/100	ST1 (4) ST1 (4) ST1 (4)
L2	3	1/33	ST3 (38)	GG2	2	1/50	ST7	L1	3	1/33	ST3 (34)
M2	3	0/0	×					M1	2	1/50	ST3 (34)
N2	4	0/0	×					N1	5	0/0	×
O2	2	0/0	×					O1	4	0/0	×
P2	2	0/0	×					P1	2	1/50	ST7 (112)
Q2	4	0/0	×					Q1	2	0/0	×
R2	2	0/0	×					R1	2	0/0	×
S2	5	0/0	×					S1	3	1/33	ST1 (4)
T2	2	1/50	ST3 (34)					T1	2	1/50	ST3 (34)
U2	2	0/0	×					U1	4	1/25	ST6 (123)

4.5 Korelace výskytu/absence *Blastocystis* spp. se specifickými faktory

U všech vzorků bylo dále zjišťováno, zda existují nějaké korelace mezi výskytem/absencí blastocyst s některými faktory uvedenými níže.

4.5.1 Životní styl

U všech 242 lidských vzorků zde byl testován vliv životního stylu na výskyt/absenci blastocyst. V této kategorii byly zahrnuty dva faktory, jmenovitě život ve městě *versus* na vesnici a vliv cestování. Vesnice byla definována počtem obyvatel, do této kategorie spadaly malé obce do 2000 obyvatel. Cestování bylo rozděleno do tří kategorií – lidé, kteří v minulosti nikdy necestovali, lidé cestující v rámci Evropské unie (EU) a ti, kteří cestují i mimo EU.

4.5.1.1 Život ve městě/vesnici

Z celkového počtu 242 lidských vzorků žije na vesnici 73 lidí (30 %) a ve městě 169 lidí (70 %). Z těchto čísel vychází následující výpočty prevalence *Blastocystis.* U lidí žijících na vesnici bylo zaznamenáno 21 pozitivních vzorků z celkových 73 patřících do této kategorie. U lidí, kteří uvedli život ve městě, bylo detekováno 30 pozitivních vzorků z celkových 169 v této kategorii. Výsledky prevalence a zastoupení subtypů u lidí žijících ve městě a na vesnici jsou shrnuty v tabulce 7.

Výrazně vyšší prevalence byla zjištěna u lidí žijících na vesnici, a to 29 %. Nejčastějším subtypem v této skupině byl ST1 (33 %), dále ST3 (29 %) a ST6 (14 %). Naopak u lidí žijících ve městech prevalence *Blastocystis* spp. dosahuje 18 %. Výrazně zde převažoval ST3 (50 %), dále ST1 (17 %) a ST2 (13 %). V porovnání s lidmi žijícími na vesnici, se u lidí ve městech vyskytuje výrazně menší podíl vzorků pozitivních na ST6, který je typicky ptačím subtypem (Stensvold et al., 2009).

Tab.7: Výsledky prevalence a zastoupení subtypů u lidí ve městě/na vesnici.

kategorie	prevalence	zastoupení subtypů	kategorie	prevalence	zastoupení subtypů
vesnice	29% (21/73)	ST1 / 33% ST2 / 5% ST3 / 29% ST4 / 5% ST6 / 14% ST7 / 10%	**město**	18% (30/169)	ST1 / 17% ST2 / 13% ST3 / 50% ST4 / 7% ST6 / 3% ST7 / 10%

4.5.1.2 Cestování

Z celkového počtu 242 lidských vzorků 25 lidí (10 %) uvedlo, že vůbec necestuje; 139 lidí (58 %) cestuje pouze v rámci EU a 78 lidí (32 %) cestuje i mimo EU. Z těchto čísel vychází následující výpočty prevalence *Blastocystis*. Z 25 vzorků lidí, kteří necestují, bylo zaznamenáno pět pozitivních vzorků. U 139 lidí, kteří cestují pouze v rámci EU, bylo pozitivních 26 vzorků a u poslední skupiny lidí cestujících i mimo EU bylo pozitivních 20 ze 78 vzorků.

Nejvyšší prevalence (26 %) byla zaznamenána u skupiny lidí, kteří cestují i mimo Evropskou unii. Mezi skupinami, které necestují, nebo cestují pouze v rámci EU nebyl podstatný rozdíl (u lidí, kteří necestují 20 %; u lidí cestujících v rámci EU 19 %). Ve všech skupinách se nejčastěji vyskytoval ST3 (s výjimkou první skupiny, kde se se stejnou prevalencí vyskytoval také ST1).

Výsledky prevalence a zastoupení subtypů u lidí, kteří a) cestují mimo EU, b) cestují pouze v rámci EU a c) necestují, jsou shrnuty v tabulce 8.

Tab.8: Výsledky prevalence a zastoupení subtypů u lidí, kteří a) cestují mimo EU, b) cestují v rámci EU, c) necestují.

kategorie	prevalence	zastoupení subtypů
EU, mimo EU	26 % (20/78)	ST1 / 35 % ST2 / 10 % ST3 / 35 % ST4 / 5 % ST6 / 5 % ST7 / 10 %
EU	19 % (26/139)	ST1 / 15 % ST2 / 8 % ST3 / 42 % ST4 / 8 % ST6 / 12 % ST7 / 12 %
necestují	20 % (5/25)	ST1 / 20 % ST2 / 20 % ST3 / 60 %

4.5.2 Kontakt se zvířaty

Dalším vnějším faktorem, u kterého byly zjišťovány korelace mezi výskytem a absencí blastocyst, byl kontakt se zvířaty. Pro tyto účely byla všechna zvířata rozdělena do dvou podskupin, a to na domácí zvířata (kočky, psi, apod.) a hospodářská zvířata (krávy, koně, prasata, drůbež, apod.). Z celkového počtu 242 lidských vzorků bylo v kontaktu se zvířaty celkem 205 lidí (85 %), zatímco pouze 37 lidí (15 %) v kontaktu se zvířaty nebylo.

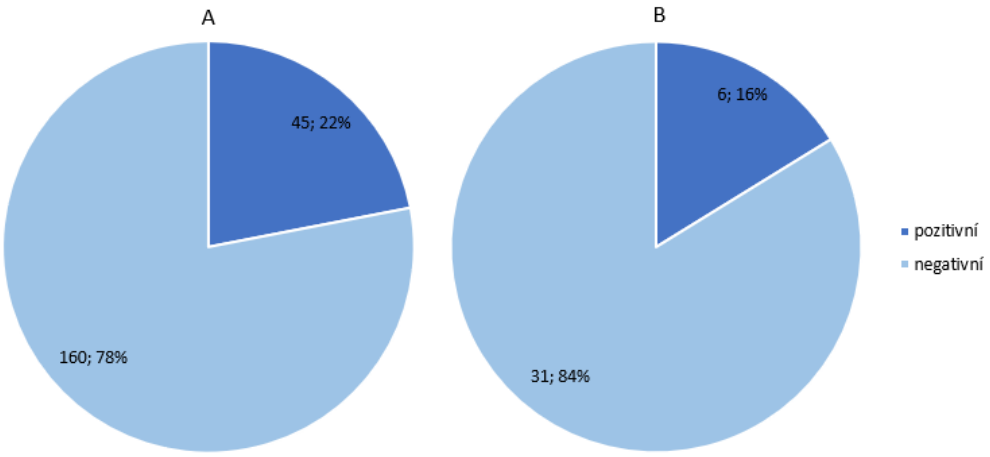
Celková prevalence *Blastocystis* spp. u lidí, kteří jsou v blízkém kontaktu se zvířaty, dosahuje 22 %, zatímco u lidí bez kontaktu se zvířaty pouze 16 %. Výsledky prevalence *Blastocystis* u lidí v kontaktu se zvířaty a u lidí bez kontaktu jsou graficky znázorněny v grafu 10 a zastoupení jednotlivých subtypů také v tabulce 9.

Ve skupině lidí, která je v blízkém kontaktu se zvířaty, se nejčastěji vyskytoval subtyp ST3 (41 %), dále ST1 (27 %) a ST2 (11 %). U lidí spadajících do druhé skupiny (tzn. lidé bez kontaktu se zvířaty) byl také nejčastějším subtypem ST3 (43 %) a ST7 (43 %), dále se zde vyskytoval pouze jeden subtyp – ST6 (14 %).

Tab.9: Výsledky prevalence a zastoupení subtypů u lidí, kteří a) jsou v kontaktu se zvířaty, b) nejsou v kontaktu se zvířaty.

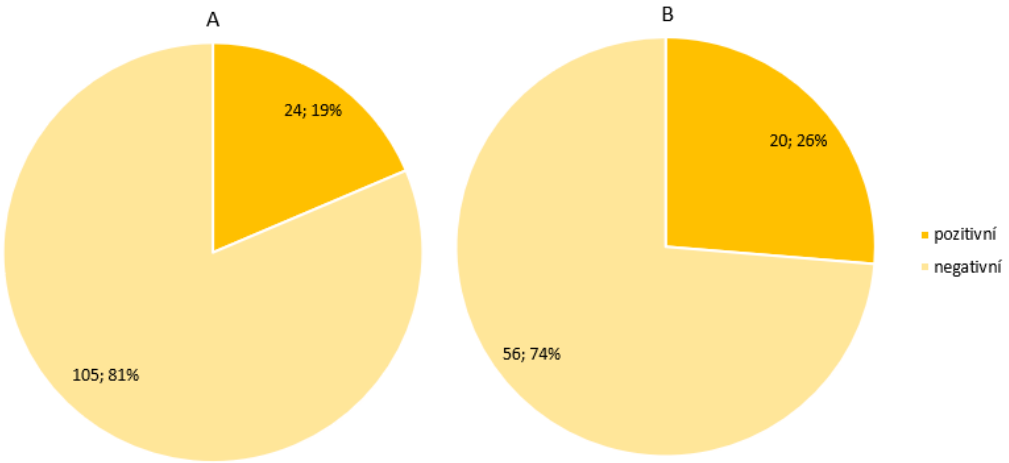
kategorie	prevalence	zastoupení subtypů
v kontaktu	22 % (45/205)	ST1 / 27 % ST2 / 11 % ST3 / 41 % ST4 / 7 % ST6 / 7 % ST7 / 5 %
bez kontaktu	16 % (6/37)	ST3 / 43 % ST6 / 14 % ST7 / 43 %

Graf 10: Celková prevalence *Blastocystis* spp. v korelaci s kontaktem se zvířaty (A – lidé v kontaktu se zvířaty; B – lidé bez kontaktu se zvířaty). První číslo vyjadřuje vždy počet vyšetřených vzorků, číslo za středníkem prevalenci v procentech.



V další části bylo 205 lidí, kteří v dotazníku uvedli blízký kontakt se zvířaty, rozděleno na další dvě podskupiny – ti, co jsou v kontaktu s domácími zvířaty (129) a lidé, kteří jsou kromě domácích zvířat v kontaktu i se zvířaty hospodářskými (76). U lidí v kontaktu se zvířaty bylo 24 z celkových 129 vzorků pozitivních (19 %) a u lidí, kteří jsou v kontaktu i s hospodářskými zvířaty, bylo pozitivních 20 ze 76 vzorků (26 %).

Graf 11: Prevalence *Blastocystis* spp. u lidí A) v kontaktu s domácími zvířaty, B) v kontaktu s hospodářskými zvířaty. První číslo vyjadřuje vždy počet vyšetřených vzorků, číslo za středníkem prevalenci v procentech.



Jak je patrné z grafu 11, vyšší prevalence (26 %) byla zaznamenána u lidí, kteří jsou v kontaktu s hospodářskými zvířaty (např. koně, krávy, prasata). Prevalence u druhé skupiny (pouze v kontaktu s domácími zvířaty) byla o 7 % nižší (19 %). Výsledky prevalence a zastoupení subtypů u těchto skupin jsou shrnuty také v tabulce 10.

U lidí, kteří byli v kontaktu pouze s domácími zvířaty, je nejčastějším subtypem ST3 (50 %), dále ST1 a ST2 (17 %). U druhé skupiny (tzn. v kontaktu s hospodářskými zvířaty), se nejčastěji vyskytoval ST1 (40 %), ST3 (30 %) a ST6 (10 %).

U vzorků zvířat, které jsme měli k jednotlivcům/ případně celým rodinám k dispozici, nebyl ani v jednom případě nalezen shodný subtyp, který by sdílelo zvíře se svým majitelem.

Tab.10: Výsledky prevalence a zastoupení subtypů u lidí, kteří a) jsou v kontaktu s domácími zvířaty, b) jsou v kontaktu s hospodářskými zvířaty.

Kategorie	Prevalence	Zastoupení subtypů
V kontaktu s domácími zvířaty	19 % (24/ 105)	ST1 / 17 % ST2 / 17 % ST3 / 50 % ST4 / 8 % ST6 / 4 % ST7 / 4 %
V kontaktu s hospodářskými zvířaty	26 % (20/76)	ST1 / 40 % ST2 / 5 % ST3 / 30 % ST4 / 5 % ST6 / 10 % ST7 / 5 %

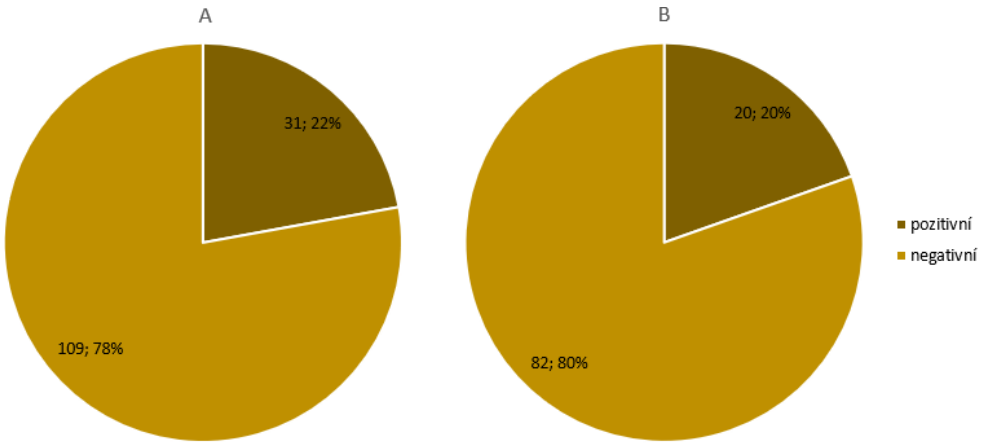
4.5.3 Pohlaví a věk

4.5.3.1 Vliv pohlaví na prevalenci *Blastocystis*

Z celkového počtu 242 lidských vzorků bylo 140 vzorků žen a 102 vzorků mužů. Ze 140 vzorků pocházejících od žen bylo pozitivních vzorků 31, zatímco u mužů 20 ze 102. Rozdíl mezi prevalencí u mužů (20 %) a u žen (22 %) není příliš výrazný. Prevalence *Blastocystis* spp. je graficky znázorněna v grafu 12 a výskyt jednotlivých subtypů také v tabulce 11.

Nejčastějším subtypem byl v obou skupinách ST3 (u mužů 43 %, u žen 40 %). Na druhém místě je u mužů ST1 (30 %), podobně jako u žen (20 %). Zajímavostí je vyšší výskyt subtypů ST6 a ST7 u žen (10 % a 13 %), v porovnání s muži (5 % a 5 %).

Graf 12: Prevalence *Blastocystis* spp. u různých pohlaví. (A) u žen, (B) u mužů. První číslo vyjadřuje vždy počet vyšetřených vzorků, číslo za středníkem prevalenci v procentech.



Tab.11: Výsledky prevalence a zastoupení subtypů mužů a u žen.

Kategorie	Prevalence	Zastoupení subtypů
Muži	20 % (20/102)	ST1 / 30 % ST2 / 10 % ST3 / 45 % ST4 / 5 % ST6 / 5 % ST7 / 5 %
Ženy	22 % (31/140)	ST1 / 20 % ST2 / 10 % ST3 / 40 % ST4 / 7 % ST6 / 10 % ST7 / 13 %

4.5.3.2 Vliv věku na prevalenci *Blastocystis*

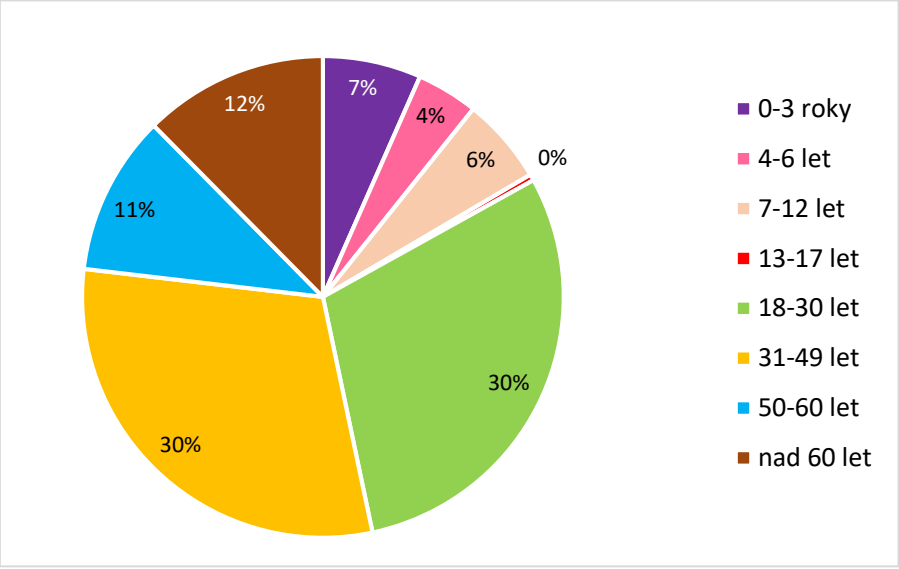
Všechny lidské vzorky byly dále rozděleny do 8 věkových kategorií, aby bylo možné zjistit případné korelace mezi věkem a výskytem/absencí blastocyst. Počty vzorků v jednotlivých kategoriích jsou znázorněny v grafu 13.

Nejpočetněji zastoupené jsou věkové kategorie 18-30 let a 31-49 let. Naopak do kategorie 13-17 let spadal pouze 1 vzorek.

Prevalence *Blastocystis* spp. v rámci těchto věkových kategorií a zastoupení jednotlivých subtypů jsou shrnuty v tabulce 12.

Nejvyšší prevalence byla zaznamenána u věkové kategorie 4-6 let (40 %), ale vzhledem k menšímu počtu vzorků v rámci této skupiny však není možné vyvozovat žádné závěry. Další věkovou kategorií s poměrně vysokou prevalencí tohoto prvoka je skupina 50-60 let (35 %). Zajímavých nálezem byl jeden pozitivní vzorek spadající do kategorie 0-3 roky, jednalo se o dvouleté dítě. U dětí do 2 let věku je podle některých studií výskyt blastocyst zaznamenán jen ve velmi malém měřítku (např. Scanlan et al., 2018).

Graf 13: Grafické znázornění rozdělení věkových kategorií a jejich procentuální zastoupení.



Tab.12: Prevalence a zastoupení subtypů v jednotlivých věkových kategoriích.

kategorie	prevalence	zastoupení subtypů	kategorie	prevalence	zastoupení subtypů
0-3 roky	6 % (1/16)	ST3 / 100 %	**18-30 let**	18 % (13/72)	ST1 / 25 % ST2 / 8 % ST3 / 50 % ST4 / 17 %
4-6 let	40 % (4/10)	ST1 / 25 % ST2 / 25 % ST6 / 25 % ST7 / 25 %	**31-49 let**	25 % (18/73)	ST1 / 28 % ST2 / 6 % ST3 / 39 % ST6 / 17 % ST7 / 11 %
7-12 let	29 % (4/14)	ST1 / 50 % ST2 / 25 % ST7 / 25 %	**50-60 let**	35 % (9/26)	ST1 / 13 % ST2 / 13 % ST3 / 50 % ST4 / 13 % ST7 /13 %
13-17 let	0 % (0/1)		**nad 60 let**	10 % (3/30)	ST3 / 100 %

5 Diskuze

Od objevení střevního prvoka *Blastocystis* spp. uběhlo už více než 100 let (Alexeieff, 1911; Brumpt, 1912), přesto však není jeho role ve střevním mikrobiomu člověka zcela objasněna. O tom, zda mohou být blastocysty potenciálním patogenem anebo stabilní součástí střevního mikrobiomu, se dodnes stále vedou diskuze. V minulosti byly blastocysty považovány především za lidský patogen (Stark et al., 2007) a spojovány s etiologií některých střevních onemocnění, jako je syndrom dráždivého tračníku [Irritable Bowel Syndrome - IBS] (např. Poirier et al., 2012). Nicméně skutečnost, že se tito striktně anaerobní prvoci vyskytují častěji u zdravých jedinců v porovnání s lidmi trpícími nespecifickými střevními záněty (Petersen et al., 2013; Krogsgaard et al., 2015), přivedlo některé autory k hypotéze, že jsou blastocysty pouze neškodní komenzálové žijící v tlustém střevě (Parfrey et al., 2014; Scanlan & Stensvold, 2012). Dokonce zazněl i názor, že se podílejí na optimalizaci diverzity střevního bakteriálního mikrobiomu a mohli by tak naopak být člověku prospěšní (Audebert et al., 2016b; Stensvold & van der Giezen, 2018).

K objasnění role *Blastocystis* v lidském organismu jsou kromě experimentálních výsledků důležité zejména epidemiologické studie, a to především u zdravé populace lidí (resp. asymptomatické). Takových studií je zatím poměrně málo a v České republice zcela chybí.

Prevalence a určení subtypů *Blastocystis* spp.

Jak již bylo zmíněno, hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit prevalenci *Blastocystis* spp. u zdravých lidí v České republice. U lidí a zvířat jsme zaznamenali celkovou prevalenci 17 %, přičemž prevalence u lidí dosahuje 21 %. Tato data se dobře shodují s výsledky studií provedených v jiných evropských zemích. Například studie z Francie zaznamenala prevalenci 23 % (Safadi et al., 2016) a podobná prevalence byla také v Nizozemí, a to 24 % (Bart et al., 2013a). Poměrně nízkou 7% prevalenci blastocyst zaznamenali v USA (Scanlan et al., 2016), v Japonsku dokonce jen 1% (Hirata et al., 2007). Naopak 100% prevalence byla zjištěna u dětí žijících v Senegalu (El Safadi et al., 2014). Další epidemiologické studie pochází například z Kolumbie, kde prevalence u lidí dosahovala 45 % (Ramírez et al., 2014), nebo z Kypru, s prevalencí 28 % (Seyer et al., 2017), či z Thajska, kde se blastocysty vyskytovaly v 51 % případů (Pipatsatitpong et al., 2015).

Kromě znalostí celkových prevalencí je třeba znát i výskyt a zastoupení jednotlivých subtypů, protože ty se mohou lišit svou případnou patogenitou (Hussein et al., 2008). Například ST3, byl dosud častěji detekován u pacientů s gastrointestinálními problémy (Rajamanikam & Govind, 2013) a bývá tedy považován za patogenní subtyp. Nicméně příčinou pozorování korelace mezi jeho výskytem a patogenitou, může být i prostý fakt, že se tento subtyp obecně vyskytuje v populaci lidí nejčastěji (např. Alfellani et al., 2013). Hlavním faktorem zodpovědným za patogenitu blastocyst mohou být podle některých studií jejich proteázy schopné degradovat imunoglobulin A, který je součástí střevní slizniční imunity (Mirza & Tan, 2009). Vyšší aktivita proteáz byla zjištěna také u ST7, ve srovnání s ST4 (Wu et al., 2014).

V rámci naší studie jsme detekovali celkem vysoký počet zastoupených subtypů, u lidí bylo zjištěno šest z celkově devíti popsaných subtypů, které se u člověka běžně vyskytují (Alfellani et al., 2013). Konkrétně se jednalo o subtypy ST1-ST4, ST6 a ST7. Srovnatelný počet a diverzita subtypů byla zaznamenána v několika dalších studiích (Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016). V jiných studiích je většinou detekován nižší počet subtypů, nejčastěji tři [ST1-ST3] (Jalallou et al., 2017; Mohamed et al., 2017; Scanlan et al., 2016b), nebo čtyři [ST1-ST4] (Barbosa et al., 2017).

Nejčastěji detekovaným subtypem v naší studii byl ST3 s prevalencí 36 %. I tento výsledek je opět srovnatelný s většinou dalších epidemiologických studií - ve Švédsku zaznamenali ST3 ve 47,6 % (Forsell et al., 2012), v Nizozemí 43,4% (Bart et al., 2013a) a ve Francii 43,3% (El Safadi et al., 2016). Nicméně je třeba poznamenat, že ve většině těchto prací měli autoři k dispozici řádově vyšší počet analyzovaných vzorků, než my. Jako druhý nejčastější subtyp u lidí je obvykle udáván ST1 nebo ST2, případně ještě ST4 (např. Alfellani et al., 2013; Stensvold et al., 2009). V naší studii se ukázal být druhým nejpočetnějším subtypem ST1 (23 %). Na třetím místě byl ST7 (11 %), což je velmi neobvyklé vzhledem k tomu, že se jedná o subtyp specifický hlavně pro ptáky (Stensvold et al., 2009). V prevalenčních studiích se ST7 vyskytuje velmi zřídka (zmíněná studie ve Švédsku 1,6%, Nizozemí 1%, Francie 2,1%) a někde dokonce vůbec (např. Scanlan et al., 2016). Ve srovnání s jinými výsledky jsme zaznamenali pouze 10 % vzorků pozitivních na ST2, přičemž ve Francii se vyskytoval v 13 % (El Safadi et al., 2016), v Nizozemí ve 23 % (Bart et al., 2013) a v Íránu dokonce v 36 % (Jalallou et al., 2017). Neobvykle nízké počty (6 %) byly v naší studii zaznamenány také u ST4, který se v některých jiných studiích vyskytuje s vyšší prevalencí – např. Itálie 18 % (Meloni et al., 2011), Francie 20 % (El Safadi et al., 2016),

venkovské oblasti Nepálu dokonce 84 % (I. L. Lee et al., 2012) a v 76 % u dánských pacientů s průjmovým onemocněním (Stensvold et al., 2011).

Zajímavým nálezem byl také další subtyp ST6 opět hostitelsky specifický primárně pro ptáky (Stensvold et al., 2009). Ten se v našem datasetu u lidských vzorků objevil nezávisle čtyřikrát (tzn. v 8 %). K nákaze člověka s ST6 mohlo dojít přímým kontaktem s ptáky – například s drůbeží, u které byla v recentní době potvrzena jeho prevalence (32 %) a existuje dokonce důkaz přenosu tohoto subtypu mezi drůbeží a jejími ošetřovateli (Greige, et al., 2018). V naší studii žijí tři ze čtyř lidí pozitivních na ST6 na vesnici – přičemž dva z nich chovají kromě jiných zvířat také drůbež. Vzorky drůbeže jsme však od těchto lidí bohužel neměli k dispozici a u jiných zvířat, které vlastní, ST6 detekován nebyl. Dá se tedy jen hypoteticky usuzovat, že se od drůbeže mohli ST6 infikovat. Zbylí dva z výše zmíněných lidí uvedli, že v kontaktu s hospodářskými zvířaty, respektive s ptáky, nejsou.

Podobná situace je i u dalšího „ptačího" subtypu ST7, který jsme detekovali u pěti lidí, z nichž pouze dva uvedli kontakt se zvířaty (hlavně se psy). Jeden z těchto lidí chová drůbež a jiná hospodářská zvířata, nicméně k dispozici jsme měli pouze vzorek psa, který byl na blastocysty negativní. Druhý člověk je v kontaktu se psem, který je také negativní. ST7 byl kromě lidí v naší studii zaznamenán i u dvou psů a u jedné husy. U rodin, kterým tato zvířata patří a jsou s nimi v úzkém kontaktu, se však tento subtyp neobjevil.

V rámci naší studie byla zaznamenána relativně nízká prevalence u zvířat, na blastocysty bylo pozitivních 11 ze 118 vzorků (9 %). V jiných studiích se mezi sebou výsledky prevalence u zvířat výrazně liší. Například v australské zoo se u zvířat blastocysty vyskytovaly ve 42 % (Parkar et al., 2010), zatímco autoři další australské studie zahrnující kromě zoo i jiná zvířata, zaznamenali nižší prevalenci - 18 % (Roberts et al., 2013). Dalším podobným případem může být prevalenční studie u koček a psů, kde v USA určili celkovou prevalenci u koček a psů 10 % (Ruaux & Stang, 2014a), zatímco ve Španělsku byly všechny vyšetřované vzorky koček a psů negativní (Paulos et al., 2018). Kolumbijská studie detekovala *Blastocystis* u 90 % ptáků, 80 % skotu a u 37 % psů (Ramírez et al., 2013). Autoři Alfellani et al. (2013b) ve své práci uvádějí celkovou prevalenci u zvířat 21%.

K zajímavějším nálezům v našem souboru vzorků získaných od zvířat patří dva případy *Blastocystis* ST7 u psů. V jiných studiích jsou u psů běžně detekovány subtypy jiné, a to ST1 a ST2, zatímco ST7 se objevuje velmi zřídka (Ramírez et al., 2013; Wang et al., 2013). Autoři Ruaux & Stang (2014) zaznamenali u psů také subtyp ST10.

Dále byly blastocysty z našeho souboru vzorků nalezeny u tří ovcí, jednalo se o ST10, ST14 a jeden zatím neidentifikovaný subtyp. Subtypy ST10 a ST14 se u ovcí vyskytují zcela běžně (Alfellani et al., 2013b; Li et al., 2018; Stensvold et al., 2009). ST10 byl v našem datasetu zaznamenán také u dvou krav, což se opět shoduje se studiemi zmíněnými výše v případě ovcí. U obou vzorků prasat, které jsme získali, byl detekován ST5, podobně jako tomu bylo v některých dalších studiích (Alfellani et al., 2013b; Stensvold et al., 2009) a tento subtyp je považován za typicky prasečí (např. Stensvold et al., 2009). V dalších studiích byly u prasat nalezeny i další subtypy, a to ST1 a ST3 (Roberts et al., 2013; Yan et al., 2007a).

V recentní studii byla potvrzena poměrně vysoká prevalence *Blastocystis* u drůbeže (32 %) s výskytem dvou subtypů ST7 a ST6, který výrazně převažoval (Greige et al., 2018). Autoři Mokhtar & Youssef (2018) detekovali u drůbeže v Egyptě mnohem vyšší prevalenci dosahující až 69 %. Dalo by se tedy očekávat, že i v rámci našich vzorků objevíme prevalenci vyšší, nicméně pozitivní byl jen jeden ze 13 ptačích vzorků. Jednalo se o vzorek husy, u které byl detekován ST7.

Intra-subtypová variabilita

V naší studii jsme detekovali celkem devět subtypů *Blastocystis* (ST1-ST7, ST10, ST14) u lidí a zvířat, které se značně lišily svou intra-subtypovou variabilitou. Tato variabilita se vyhodnocuje na základě sekvencí vysoce variabilního úseku SSU rRNA genu pro *Blastocystis* spp. (Scicluna et al., 2006), který je pro účely diagnostického PCR amplifikován. Jednotlivé alely jsou určovány pomocí barkódovací platformy pro *Blastocystis*, která je dostupná na www.pubmlst.org/blastocystis (viz kapitola 1.6.2.1).

Nejvyšší variabilita byla u ST2, kdy jsme detekovali alelu 9, 11 a 12, a zároveň u ST7 s nalezenými alelami 41, 110 a 112. V případě ST2 byly stejné alely zaznamenány v íránské studii Rezaei et al. (2018). Epidemiologická studie provedená v Itálii zaznamenala u ST2 pouze alelu 9 (Crisafi et al., 2015), zatímco jinde byla nalezena vyšší intra-subtypová variabilita, kdy detekovali dokonce sedm různých alel u ST2 pozitivních objektů (9, 11, 12, 15, 67, 71, 73) s dominancí alely 9 ve 42 % (Ramírez et al., 2017).

U subtypu ST7 u lidí jsme zjistili tři různé alely (41, 112, 110) na rozdíl od jiných studií, kde detekovali jen alelu 137 (Rezaei et al., 2018) nebo alelu 142 (Ramírez et al., 2017). Zde je třeba podotknout, že alelu 112 jsme detekovali i ve vzorcích zvířat, konkrétně se jednalo

o dva psy a jednu husu. Pokud je nám známo, u těchto zvířat zatím v literatuře nebyly popsány jednotlivé alely, není tedy možné naše výsledky v tomto ohledu srovnávat.

U ST3 jsme zachytili dvě různé alely (34 a 38) s většinovou převahou alely 34 (95 %). Stejné alely byly pozorovány i ve studii provedené v severní Indii (Khalil et al., 2016). Naproti tomu autoři Rezaei et al. (2018) zaznamenali u tohoto subtypu pět různý alel, a to 31, 34, 36, 37 a 52. Ještě větší intra-subtypovou variabilitu u ST3 detekovali Ramírez et al. (2017), když ve své studii popsali devět různých alel (34, 36, 37, 38, 45, 49, 55, 134, 128), s převahou alely 38 (21 %).

Subtyp 4 byl v naší studii reprezentován dvěma alelami 42 a 92. V jiných studiích se ukázal tento subtyp jako velmi geneticky homogenní a nebylo pozorováno více alel (Crisafi et al., 2015; Ramírez et al., 2017), například pouze alela 42 (Ramírez et al., 2017).

ST5 byl v našem datasetu vzorků identifikován pouze z prasat, konkrétně se jednalo o alely 17 a 119. Obdobných studií, kde se zabývají intra-subtypovou variabilitou (zejména u zvířat) je velmi málo, a tudíž je obtížné tento výsledek srovnávat. Pouze jedna studie se zabývala intra-subtypovou variabilitou ST5 u zvířat. Jednalo se o čínskou práci provedenou u ovcí a koz, kdy byly zaznamenány čtyři různé „varianty“ (Li et al., 2018). Tyto sekvence tzv. variant se autorům nepodařilo srovnat se sekvencemi v „barcoding“ platformě pro *Blastocystis* (http://pubmlst.org/ blastocystis/), a tak nebylo možné zjistit konkrétní alely. Pravděpodobně se jedná o nové „varianty“ v této databázi zatím nespecifikované.

Obdobná situace je i u ST10, který byl v našich vzorcích nalezen pouze u dvou krav a jedné ovce. Ve dvou případech se jednalo o alelu 42 a u jedné alely nebyla nalezena shoda v „barcoding“ databázi pro *Blastocystis*. Autoři Li et al. (2018) u ovcí a koz opět našli v rámci ST10 několik „variant“, které se neshodovaly s žádnou alelou uvedenou v již zmíněné databázi.

Naopak nejnižší variabilita v rámci alel byla detekována u ST1 u lidí, kdy se ve všech 12 případech jednalo o alelu 4. Podobný výsledek získala i studie z Brazílie, kde se u všech vzorků pozitivních na ST1 jednalo o alelu 4 (Espirito et al., 2017). Nízká intra-subtypová variabilita u ST1 byla také potvrzena v rámci studie z roku 2018 (Rezaei et al., 2018). Naopak k odlišnému výsledku dospěli Ramírez et al. (2017), když u dětí pozitivních na ST1 z Kolumbie detekovali sedm různých alel (1, 2, 4, 81, 82, 83), přičemž se nejčastěji objevovala alela 2 (50 %). Naopak námi detekovaná alela 4 pouze v 9 %.

Nízká variabilita se v naší studii objevila také u ST6, kdy se vždy jednalo pouze o alelu 123. Stejnou alelu u všech vzorků patřících k subtypu ST6 detekovali také v rámci italské studie (Crisafi et al., 2015), nicméně Rezaei et al. (2018) a také Ramírez et al. (2017) zaznamenali u ST6 pouze alelu 122. V rámci detekce subtypů u lidí v Brazílii našli v rámci ST6 alelu 134 (Espirito et al., 2017).

Zastoupení subtypů Blastocystis v rámci jednotlivých rodin

Prevalenčních studií, které by se zabývaly výskytem subtypů a případných přenosů blastocyst mezi jednotlivými členy rodiny, je dosud velmi málo. Variabilita subtypů *Blastocystis* se liší napříč světadíly (Alfellani et al., 2013), takže je velmi obtížné naše výsledky srovnávat se studiemi jinde ve světě.

V této části studie nás zajímalo, jak často dochází k přenosům *Blastocystis* v rámci rodin. Prozkoumání tohoto aspektu bylo možné díky analýze intra-subtypové variability (analýza alel na základě SSU rRNA). Pokud jednotliví členové rodiny sdílejí jak stejný subtyp, tak i alelu, může se jednat právě o přenos v rámci rodiny. V opačném případě jej však můžeme vyloučit.

V naší studii byla polovina z celkového počtu 54 rodin pozitivní na blastocysty alespoň u jednoho člena rodiny. Většinou byl pozitivní pouze jeden člověk z rodiny (21/27). Zajímavým zjištěním byla také skutečnost, že se v některých rodinách vyskytovalo zároveň více subtypů (3/27). Zaznamenali jsme například čtyřčlennou rodinu, kde byly detekovány tři různé subtypy, konkrétně ST1 (alela 4), ST2 (alela 9) a ST6 (alela 123). Tito lidé tedy pravděpodobně nepřišli do styku se stejným zdrojem infekce.

Shodné subtypy u více rodinných příslušníků byly nalezené pouze ve třech případech (3/27). Jednalo se o dvě tříčlenné rodiny žijící na vesnici, kde všichni členové sdíleli jak stejný subtyp (ST1), tak i stejnou alelu 4 (což je pro daný subtyp a naší studii pravidlem) a dále o jeden manželský pár sdílející ST3 a shodnou alelu 34. Právě přítomnost stejné alely naznačuje, že může dojít k přenosu blastocyst mezi jednotlivými členy rodiny, nebo pochází ze stejného zdroje, což může být například kontaminovaná potrava nebo voda (např. Abdulsalam et al., 2012; Angelici et al., 2018). Zajímavé souvislosti byly zjištěny u jedné tříčlenné rodiny sdílejících ST1 a alelu 4. Tato rodina má vlastní malou čističku odpadních vod a přečištěnou vodu využívá na zahradě, mimo jiné k zalévání zeleniny. Je tedy možné, že k přenosu

blastocyst došlo právě díky tomu. V literatuře je totiž popsáno, že tito prvoci mohou být přenášeni vodou (Lee et al., 2012). K ostatním rodinám podobné informace bohužel nemáme.

Z našich výsledků vyplývá, že k přenosům mezi členy rodin docházet může, ale není to pravidlem. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena vysokými hygienickými návyky v industrializovaných zemích. K odlišnému výsledku došli autoři epidemiologické studie v Číně, když našli shodné subtypy blastocyst ve 21 z 39 rodin, což opět potvrzuje přenos mezi členy jednotlivých rodin (Li et al., 2007), případně používání stejných zdrojů vody, potravin a hygienických zařízení. Nicméně Čína je dosud většinově považována ještě za zemi rozvojovou a odlišné návyky a kultura mohly k vyšší prevalenci přispět. Naopak v rámci podobných studií provedených ve Španělsku a v USA nebyl přenos mezi rodinnými příslušníky potvrzen (Paulos et al., 2018; Pauline D. Scanlan et al., 2016a). Tyto výsledky podporují naši hypotézu, že k přenosům v rámci rodin dochází v industrializované společnosti spíše zřídka.

Korelace s vybranými specifickými faktory

V naší studii nás kromě obecné prevalence *Blastocystis* zajímalo, zda existují nějaké korelace mezi určitými specifickými faktory a přítomností těchto prvoků. Zaměřili jsme se na vliv životního stylu (život ve městě/na vesnici a cestování), kontaktu se zvířaty, pohlaví a věku. Všechny tyto faktory jsou obvykle v rámci prevalenčních studií zjišťovány, protože se předpokládá, že by na kolonizaci tímto prvokem mohly mít vliv (např. Forsell et al., 2012; El Safadi et al., 2016). Zdrojem našich informací byly anonymní dotazníky, které každý zúčastněný vyplnil.

a) život ve městě/na vesnici

Obecně se předpokládá, že lidé ve venkovských oblastech mají vyšší pravděpodobnost setkat se s potenciálními zdroji blastocyst, kterými může být kontaminovaná voda a potrava (např. Abdulsalam et al., 2012; Angelici et al., 2018), či kontakt se zvířaty (např. Parkar et al., 2010; Stensvold et al., 2009). Výsledky naší studie demonstrují výrazně vyšší prevalenci u lidí žijících na vsi (29 %), zatímco u lidí z města byla prevalence o 11 % nižší (tj. 18 %). Podobné výsledky byly zaznamenány v Brazílii, kdy v městské části Rio de Janeiro byla detekována prevalence 35 % (Barbosa et al., 2017), zatímco ve dvou malých rybářských vesničkách v São Paulo byla prevalence mnohem vyšší (tj., 45 a 71 %) (David et al., 2015), a také ve Španělsku,

kde byl také výrazný rozdíl mezi prevalencemi u lidí ve městě (44 %) a na vesnici (33 %) (Paulos et al., 2018). Naopak v některých dalších studiích nebyl nalezen podstatný rozdíl mezi prevalencí blastocyst v městských a venkovských oblastech (Kiani et al., 2016; Seyer et al. 2017; Ramírez et al., 2017).

Velmi zajímavým nálezem v našem datasetu vzorků je o 11% vyšší výskyt subtypu ST6 u lidí žijících na vesnici, v porovnání s lidmi, kteří v dotazníku uvedli život ve městě. Podobný výsledek zaznamenala turecká studie porovnávající diverzitu *Blastocystis* subtypů u lidí žijících na vesnici a ve městě (Koltas & Eroglu, 2016). Zde detekovali subtyp ST6 spolu s dalšími dvěma subtypy (ST5 a ST7) pouze u lidí z venkova. Předpokládáme, že takové výsledky by mohly souviset zejména s častějším kontaktem lidí se zvířaty, zejména drůbeží (Greige et al., 2018). Nicméně žádné ze zvířat v naší studii nesdílelo stejný subtyp se svým majitelem či ošetřovatelem, takže tuto domněnku nelze potvrdit.

b) cestování

Prevalence *Blastocystis* v industrializovaných zemích zahrnujících většinu evropských zemí je udávána kolem 20 % (např. Bart et al., 2013b), zatímco v rozvojových zemích se pohybuje kolem 50 % (např. Ramírez et al., 2014). Díky této skutečnosti je považováno cestování (především do tropických zemí) jako jeden z faktorů přispívajících ke kolonizaci tímto prvokem (např. El Safadi et al., 2016; Bart et al., 2013). Z těchto důvodů jsme jsme se na cestování zaměřili i v rámci naší studie.

Všechny lidské vzorky byly v našem datasetu vzorků rozděleny na tři skupiny, a to (i) lidé, kteří necestují; (ii) lidé, kteří cestují pouze v rámci EU; (iii) lidé, kteří cestují i mimo EU. Nejvyšší prevalence blastocyst (26 %) byla zaznamenána u lidí, kteří cestují i mimo EU, což se velmi dobře shoduje s výsledky v jiných studiích. Signifikatně vyšší prevalenci u lidí cestujících mimo EU zjistili například autoři El Safadi et al. (2016) v rámci jejich francouzské studie a podobný výsledek se objevil i v dalších epidemiologických studiích (např. Bart et al., 2013; Sekar & Shanthi, 2015). Nicméně někteří autoři přišli s odlišnými výsledky a korelaci mezi cestováním a častějším výskytem *Blastocystis* nepotvrdili (Abdulsalam et al., 2013; Seyer et al., 2017). V recentní dlouhodobé studii z Nizozemí (van Hattem et al., 2018) sledovali autoři dobrovolníky před a po absolvování cesty mimo EU a překvapivě se ukázalo, že novou infekci získalo pouze 5 % lidí ze sledovaných. Navíc 27 % z těch, kteří byli před započetím cestování na blastocysty pozitivní, infekci ztratilo a po návratu byli na blastocysty negativní. Otázkou zůstává, zda tito lidé během cesty neužívali například preventivně či

terapeuticky anti-parazitární přípravky, které by mohly ztrátu infekce způsobit – tyto informace autoři neuvádí.

Mezi skupinou lidí, která v našem dotazníku uvedla cestování pouze v rámci EU, a lidmi bez cestovatelské historie nebyl podstatný rozdíl v prevalenci blastocyst. Tento výsledek pravděpodobně souvisí s tím, že prevalence blastocyst v Evropě, a tedy i v České republice (zde vycházíme pouze z našich dat) je podobná.

c) kontakt se zvířaty

Některé subtypy blastocyst jsou považovány za typicky zvířecí a jsou mimo jiné zkoumány i pro svůj zoonotický potenciál (např. Yan et al., 2007b; Yoshikawa et al., 2009). Díky skutečnosti, že u zvířat se blastocysty vyskytují relativně často, je kontakt se zvířaty považován za jeden z faktorů, které zvyšují pravděpodobnost infekce tímto prvokem u lidí (Parkar et al., 2010; Stensvold et al., 2009). Na tento aspekt jsme se v rámci naší studie zaměřili také a zajímaly nás vzorky zvířat, se kterými jsou dobrovolníci v úzkém kontaktu.

Prevalence *Blastocystis* u lidí v naší studii, kteří nejsou v kontaktu se zvířaty, je 16 %, zatímco lidé v kontaktu se zvířaty vykazují prevalenci o 7 % vyšší (tj., 23 %). Lidé, kteří v dotazníku uvedli kontakt se zvířaty, byli dále rozděleni ještě do dvou podskupin – (i) na ty, kteří vlastní nebo jsou ve styku pouze s domácími „mazlíčky“ (kočky, psi, atp.) a (ii) ty, kteří kromě „mazlíčků“ chovají i zvířata hospodářská (koně, krávy, prasata, drůbež atd.). Zjistili jsme, že výskyt blastocyst je vyšší u skupiny lidí, kteří jsou v kontaktu s hospodářskými zvířaty, konkrétně se jednalo o 26 % pozitivních vzorků. Naopak lidé, kteří jsou v úzkém kontaktu pouze s „mazlíčky“, vykazovali prevalenci o 7 % nižší (tj., pouze 19 %). Tato data do jisté míry potvrzují výsledky jiných autorů, ve kterých je prevalence blastocyst u koček a psů nižší, na rozdíl od hospodářských zvířat (Ramírez et al., 2014; Udonsom et al., 2018).

U psů se sice lze díky jejich způsobu života (úzkému kontaktu s lidmi, se kterými zejména ve městě sdílejí životní prostory, atp.) setkat se subtypy blastocyst, které jsou běžné u lidí, ale na základě již provedených studií se zdá, že hrají pouze zanedbatelnou roli jako zoonotický rezervoár a pravděpodobně nejsou přirozenými hostiteli blastocyst (Osman et al., 2015; Wang et al., 2013a). Tato skutečnost byla potvrzena i v rámci několika studií, kde byly analyzovány vzorky lidí společně se vzorky jejich psů a koček, a přenos mezi nimi nebyl zaznamenán (Paulos et al., 2018; Ruaux & Stang, 2014b). Naopak hospodářská zvířata sice vykazují vyšší prevalenci blastocyst a v naší studii byli jejich chovatelé častěji pozitivní,

nicméně se nám nepodařilo u žádného zvířete detekovat stejný subtyp, jako měl jeho majitel. Pouze v jednom případě jsme zaznamenali u člověka stejný subtyp ST7 a alelu 112, jako měli dva psi a jedna husa. Je třeba dodat, že s těmito konkrétními zvířaty nepřišel daný člověk vůbec do styku. Přítomnost *Blastocystis* u těchto lidí tedy nemusí souviset pouze s chovem zvířat, ale pravděpodobně se jedná o kombinaci více faktorů. Přesto však existují studie, kde bylo prokázáno sdílení stejných subtypů u zvířat a jejich majitelů. Například autoři Yan et al. (2007) potvrdili přítomnost identického subtypu ST5 u prasat a jejich ošetřovatelů. V jiné studii byl potvrzen i přenos ST6 mezi drůbeží a pracovníky na jatkách (Greige et al., 2018). Naopak u dětí žijících v jedné z vesnic Indonésie (v horších hygienických podmínkách a v těsném styku se zvířaty) nebyly ani v jednom případě zjištěny subtypy pocházející z místních zvířat, které tvoří především prasata a drůbež (Yoshikawa et al., 2016). Autoři této studie předpokládají, že určité subtypy blastocyst mohou být úzce hostitelsky specifické.

d) pohlaví

V našem dotazníku byl i dotaz na pohlaví dobrovolníka, který vzorek poskytl. Z našich výsledků je však zřejmé, že žádný významný rozdíl mezi prevalencí blastocyst u mužů a u žen není. S touto skutečností se shoduje většina epidemiologických studií (Bart et al., 2013; Safadi et al., 2016; Seyer et al., 2017). Obecně není vliv pohlaví považován za klíčový faktor pro kolonizaci tímto prvokem, ale objevily se i některé studie, jejichž autoři mají jiný názor. Například Abdulsalam et al. (2013) zaznamenali vyšší prevalenci u mužů (26 %), než u žen (17 %). Zmíněná studie pochází z Libye a tyto rozdíly mezi muži a ženami mohou být způsobené například odlišnými sociálními návyky, který pramení z islámského náboženství. Podobných studií je však minimum.

e) věk

Dalším faktorem, který bývá sledován v rámci prevalenčních studií týkajících se prvoka rodu *Blastocystis*, je věk. Nejvyšší prevalence (40 %) v rámci našeho souboru vzorků byla zaznamenána u věkové kategorie 4-6 let, ale vzhledem k menšímu počtu získaných vzorků v této skupině není možné vyvozovat zásadnější závěry. Vyšší prevalenci u dětí (27 %) do 14 let v porovnání s ostatními věkovými kategoriemi zaznamenali ve své epidemiologické studii z Francie také autoři El Safadi et al. (2016). Podobnou zkušenost měli také autoři Paulos et al. (2018), když ve své recentní studii zaznamenali nejvyšší prevalenci blastocyst u věkové kategorie 6-10 let (55 %) a dále u větších dětí ve věku 11-15 let (52 %). I my jsme zaznamenali

poměrně vyšší prevalenci u dětí mezi sedmým a dvanáctým rokem života (29 %) v porovnání s ostatními věkovými kategoriemi. Nicméně ani v této skupině nemáme příliš velký počet vzorků. V epidemiologické studii provedené v Číně byla zjištěna nejvyšší prevalence v podobné věkové kategorii, a to 10 až 17 let, ale jen v určité oblasti (Li et al., 2007). Prevalence této věkové kategorie v dalších částech Číny se vymykaly tomuto trendu a nejvíce pozitivních případů se objevilo u lidí nad 60 let.

Z pohledu nejvyšší prevalence blastocyst v našem datasetu vzorků byla na druhém místě věková kategorie 50 až 60 let s hodnotou 35 %. Zde jsme zjistili prevalenci vyšší, než jaká byla popsána například v již zmíněné studii ve Francii, kde u lidí nad 50 let detekovali *Blastocystis* pouze u 13,6 % lidí (El Safadi et al., 2016). Nicméně rozdělení jednotlivých věkových kategorií je u každé studie odlišné, a proto se spolu tyto výsledky obtížně porovnávají.

U lidí nad 60 let jsme zjistili druhou nejnižší prevalenci blastocyst (a to 10 %), pokud nebereme v potaz věkovou kategorii 13 až 17 let s pouze jedním vzorkem. Podobný výsledek u lidí nad 60 let zaznamenali také autoři Forsell et al. (2012) ve své studii provedené u švédských pacientů s prevalencí pohybující se kolem 6 %. Tento trend negativní korelace mezi četností výskytu blastocyst a zvyšujícím se věkem může být způsoben změnami, kterými od určitého staršího věku prochází každý organismus – mění se imunitní systém, často i složení stravy, a navíc starší lidé obvykle užívají mnohem více léků než zbytek populace.

Naprosto nejnižší prevalenci vykazovala věková kategorie dětí do tří let, kde byl z 16 vzorků na blastocysty pozitivní pouze jeden (tzn. 6 %) - jednalo se o dvouleté dítě. Tyto naše výsledky se velmi dobře shodují s daty, která byla publikována v nedávné studii z Irska (Scanlan et al., 2018). Žádný z kojenců (tzn. dětí do 1 roku) zde nebyl na blastocysty pozitivní a nízká prevalence (pouze 5 %) byla detekována i u dětí do dvou let věku. Je tedy pravděpodobné, že u dětí dochází pouze k horizontálnímu přenosu blastocyst (Scanlan et al., 2018). Nulová prevalence u kojenců byla potvrzena i studií v Indii (Pandey et al., 2015). Takto malé děti jsou ve vyspělejších zemích pod stálým dozorem svých rodičů a obvykle nemají tolik příležitostí se s infekcí setkat (než například děti starší), což je pravděpodobně důvodem nízkých prevalencí v rámci této věkové kategorie.

Porovnání senzitivity dvou diagnostických metod

Pro detekci blastocyst ze stolice či trusu zvířat se používá několik diagnostických metod s vyšší či nižší citlivostí (Roberts et al., 2011). V minulosti byla často používána přímá mikroskopie nativních vzorků, která však měla nižší záchytnost a postupně byla nahrazena jinými metodami, například xenickou kultivací (Clark, & Diamond, 2002). V dnešní době jsou však tyto tradiční metody většinou nahrazovány citlivější molekulární diagnostikou s využitím PCR a specifických primerů (Roberts et al., 2011). Molekulární přístup také jako jediný umožňuje detekovat subtypy blastocyst, což je u ostatních diagnostických metod vyloučené (Scicluna et al., 2006).

Stále se však vyskytují studie, které jako jedinou diagnostickou metodu využívají kultivaci (např. Mohammad et al., 2017). V některých pracích používají výsledky kultivace jako prvotní „síto“ a molekulárně analyzují pouze vzorky, které byly kultivačně pozitivní (např. Barbosa et al., 2017; Nithyamathi et al., 2016; Thathaisong et al., 2003). Podle našich výsledků však kultivace nemusí mít 100% záchytnost, a proto je důležité molekulární diagnostikou ověřit i vzorky, které byly kultivačně negativní.

V rámci naší studie jsme se rozhodli zkombinovat dvě odlišné diagnostické metody. První z nich byla klasická xenická kultivace v modifikovaném Jonesově médiu (Leelayoova et al., 2002), ve kterém blastocysty nejen dobře rostou, ale jeho příprava je jednoduchá a finančně nenáročná. Pro paralelní diagnostiku a zároveň pro určení subtypů *Blastocystis* byla pro všechny vzorky využita molekulární detekce s využitím konvenčního PCR (Scicluna et al., 2006).

Pro mikroskopické ověření pozitivity/negativity blastocyst z xenické kultivace bylo důležité provézt minimálně jedno přeočkování do čistého média. V samotné kultivaci bez předchozího přeočkování nebylo ve většině případů možné blastocysty detekovat (v důsledku přítomnosti hustého detritu ze vzorku stolice/trusu) a tyto vzorky by mohly být chybně posouzeny jako negativní. Nicméně dva dny po prvním přeočkování do čerstvého média už byly v případě pozitivity dobře patrné vakuolární formy blastocyst. Kultivace odhalila přítomnost blastocyst v 55 z 63 PCR pozitivních a sekvenčně ověřených případů, selhala tedy v osmi případech (13 %). Ve většině těchto případů se jednalo o zvířecí vzorky. Důvodem mohly být některé vnější faktory, jako je nesprávný odběr vzorku, jeho stáří, nevhodné skladování (dle našich zkušeností jsou i cysty blastocyst ve vzorcích trusu/stolice velmi citlivé na nízkou teplotu).

V případě molekulární pozitivity a kultivační negativity můžeme uvést jako příklad jeden vzorek pocházející z ovce v domácím chovu. Původní kultivace tohoto vzorku byla vyhodnocena jako negativní, ale použitím molekulární diagnostiky bylo dosaženo opačnému výsledku (tzn. vzorek byl *Blastocystis* pozitivní). V tomto případě se nám podařilo získat nový čerstvý vzorek od téhož zvířete a opakovaná kultivace byla pozitivní. Následně byl vzorek pozitivní i molekulárně. Tady se můžeme pouze domnívat, že s prvním vzorkem, kultivačně vyhodnoceným jako negativní, bylo nesprávně zacházeno při jeho odběru, skladování či převozu. Proto je naprosto nezbytné dodržovat podmínky při sběru a nakládání se vzorky.

Podobně i ve studii Mohamad et al. (2017) autoři také porovnávali senzitivitu xenické kultivace oproti PCR. V tomto případě kultivace neodhalila přítomnost blastocyst v 8 % vzorků. Nicméně zpracovávali zde pouze lidské vzorky, u kterých jsme i my zaznamenali poměrně vysokou citlivost v obou diagnostických přístupech. Problémové u nás byly především vzorky zvířat. Na rozdíl od vzorků lidských, jsou zvířecí vzorky často odebírány se značnou prodlevou, což má rozhodně vliv na úspěšnost kultivace.

Molekulární diagnostika *Blastocystis* měla sice vyšší citlivost než kultivace, ale zároveň jsme zaznamenali celkem 11 případů pravděpodobné falešné pozitivity, tzn. vzorek byl kultivačně negativní, molekulárně pozitivní (na gelu byl viditelný amplikon v odpovídající velikosti blastocyst), ale následná sekvenace tohoto amplikonu ve většině případů odhalila bakterie, plísně, či rostlinné kontaminace. Použité primery byly původně navrženy a testovány pro diagnostiku DNA blastocyst z kultury, ale jsou velmi často využívány i pro přímou detekci blastocyst ze stolice či trusu zvířat. Nicméně kultura je „čistějším" materiálem, než trus či stolice, a neobsahuje tolik kontaminací a inhibitorů. Vzhledem k nižší specifitě používaných primerů dochází při detekci z trusu/stolice k amplifikaci SSU rRNA i eukaryot, především plísní a hub. Pokud jsou tedy používány pro přímou detekci ze stolice či trusu, je nutné počítat s určitým množstvím falešně pozitivních vzorků a je nutné je vždy ověřovat ještě sekvenačně (Stensvold, 2013). Opět se ve většině případů „falešné pozitivity" jednalo o vzorky pocházející od zvířat.

Kombinace těchto dvou metod (tzn. xenické kultivace a PCR) se ukázala být efektivní. Výsledky kultivace jsou dobrým vodítkem pro kontrolu citlivosti molekulárních metod a v mnohých případech mohou pomoci zachytit i pozitivní vzorky, které by mohly uniknout naší pozornosti.

6 Závěr

V této práci se nám podařilo nashromáždit dostatečný počet vzorků stolice od zdravých dobrovolníků, jejich rodinných příslušníků a trusu zvířat (s nimiž jsou v kontaktu), aby bylo možné provézt první prevalenční studii v České republice. Celkem bylo získáno 411 vzorků, které pocházejí téměř ze všech krajů České republiky a zpracováno bylo 360 vzorků.

Celková prevalence (tzn. lidí i zvířat) *Blastocystis* je 17 %, přičemž prevalence u lidí dosahuje 21 % a prevalence u zvířat 9 %. Molekulárními metodami se podařilo určit celkem devět různých subtypů blastocyst (ST1-ST7, ST10 a ST14), z nichž sedm subtypů se vyskytovalo u lidí (ST1-ST4, ST6, ST7). U jednotlivých subtypů jsme kromě toho zaznamenali také značnou intra-subtypovou variabilitu (tzn. variabilitu v rámci jednoho subtypu).

V rámci dalšího dílčího cíle zaměřeného na zjištění prevalence a subtypů *Blastocystis* v rámci jednotlivých rodin jsme detekovali přítomnost shodného subtypu a alely u několika členů rodiny celkem pouze ve třech případech. Dá se tedy předpokládat, že může v rodinách docházet k přenosům, nicméně jedná se pravděpodobně spíše o ojedinělý jev.

Dále jsme u všech vzorků zjišťovali vliv několika vybraných faktorů na kolonizaci tímto prvokem. Zjistili jsme, že vyšší pravděpodobnost výskytu blastocyst mají lidé žijící na vesnici, neboť prevalence v této kategorii byla o 18 % vyšší, v porovnání s lidmi z města. Vyšší prevalence byla zaznamenána také u lidí, kteří cestují mimo Evropskou unii (26 %), naopak mezi lidmi cestujícími pouze v rámci EU a těmi, kteří necestují vůbec, prakticky rozdíl v prevalenci blastocyst není (20 a 19 %). Další kategorií, u které se tito prvoci vyskytovali častěji, jsou lidé v kontaktu se zvířaty (prevalence o 6 % vyšší). Obzvlášť výrazný rozdíl v prevalenci byl mezi lidmi chovající hospodářská zvířata (26 %), v porovnání s těmi, kteří jsou v kontaktu pouze se zvířaty domácími (tzv. „mazlíčky“) s prevalencí pouze 19 %. Rozdíly v prevalenci byly zaznamenány také mezi věkovými kategoriemi, kdy nejvyšší procento pozitivních vzorků bylo potvrzeno u dětí 4-6 let starých (40 %), nicméně vzhledem k nižšímu poštu vzorků v této kategorii není na místě příliš vyvozovat závěry. Druhou nejvyšší prevalenci měla kategorie 50-60 let (35 %) a naopak nejnižší počet pozitivních vzorků byl zaznamenán u dětí do tří let (6 %). Prakticky žádný rozdíl v prevalenci blastocyst nebyl zjištěn v kategorii pohlaví, proto je málo pravděpodobné, že by tento faktor hrál roli v kolonizaci tímto prvokem.

V neposlední řadě bylo dílčím cílem také ověření senzitivity dvou diagnostických metod – xenické kultivace a molekulární diagnostiky. Molekulární diagnostika sice odhalila oproti kultivaci o 9 % případů *Blastocystis* spp. více a měla tedy vyšší citlivost, ale zároveň bylo 11 vzorků pravděpodobně falešně pozitivních. Až po osekvenování těchto vzorků bylo zjištěno, že se o blastocysty nejedná. Ani jedna z použitých metod nebyla samostatně 100% úspěšná, nicméně jejich kombinace se ukázala být přínosná.

7 Seznam použité literatury

Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Ahmed A, Surin J, Mak JW (2012). Drinking water is a significant predictor of *Blastocystis* infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology 139*(8): 1014–1020.

Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Hafeez Khan A, Ahmed A, Surin J, Mak JW (2013). Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasites & Vectors*, 8(6): 86.

Adamu H, Wegayehu T, Petros B (2013). High prevalence of diarrhoegenic intestinal parasite infections among non-ART HIV patients in Fitche Hospital, Ethiopia. *PLoS ONE*, *8*(8): 5–9.

Ajjampur SSR, Tan KSW (2016). Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitology International*, 65(6): 772-779.

Alexeieff, A (1911). Sur la nature des formations dites “Kystes de Trichomonas intestinalis” *Journal de la Société de biologie*, 71: 296–298

Alfellani MA, Stensvold, CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha, ESU, Fagbenro-Beyioku A, Clark CG (2013). Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica*, *126*(1): 11–18.

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*(4): 497–509.

Amin MO (2009). The epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. *Research Journal of Parasitology*, *1*(1): 1–10.

Angelici MC, Nardis C, Scarpelli R, Ade P (2018). *Blastocystis hominis* transmission by non-potable water: a case report in Italy. *New Microbiologica*, *41*(2): 173–177.

Anuar TS, Kamel M, Ghani A, Azreen SN, Salleh F (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*(1): 40.

Audebert C, Even G, Cian A, Loywick A, Merlin S, Viscogliosi E, Chabé M (2016b). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports*, 5(*6*): 25255.

Barbosa CV, Batista RDJ, Igreja RP, Masini C, Macedo HW, Lúcia H, Santos C (2017). Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro , Brazil. *10*(518): 1–9.

Bart A, Wentink-Bonnema EM, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJ, van Vugt M, Goorhuis A, van Gool T (2013a). Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp.in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infectious Diseases*, *13*(1): 389.

Brumpt, E (1912). *Blastocystis hominis n. sp. et formes voisines. Bulletin de la Société de pathologie exotique, 5:* 725–730.

Cian A, El Safadi D, Osman M, Moriniere R, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, Delgado-Viscogliosi P, Guyot K, Li L, Monchy S, Noel C, Poirier P, Nourrisson C, Wawrzyniak I, Delbac F, Bosc S, Chabé M, Petit T, Certad G, Viscogliosi E (2017). Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS ONE*, 12(1): e0169659.

Clark CG, Diamond LS (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(3): 329–341.

Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR (2013). Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in Parasitology*, 82: 1-32.

Crisafi B, Mattiucci S, Paoletti M, Cancrini G, Gabrielli S (2015). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiology and Infection*, *144*(03): 635–646.

David ÉB, Guimarães S, De Oliveira AP, De Oliveira-Sequeira TCG, Bittencourt GN, Nardi ARM, Ribolla PEM, Franco RMB, Branco N, Tosini F, Bella A, Pozio E, Cacciò SM (2015). Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasites and Vectors*, *8*(1): 1–12.

El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, Hamze M, Viscogliosi E (2014). Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infectious Diseases*, *14*(164): 1471–2334.

Espirito SMC, Gonçalves EMN, Paula FM, Melo GB, Castilho VLP, Criado PR, Vera LP, Maruta CW (2017). Identification of *Blastocystis* subtypes in clinical stool samples from Sao Paulo City, Brazil. *Parasitology Open*, *3*(3): 1–6.

Fayer R, Santin M, MacArisin D (2012). Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis, Cryptosporidium, Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitology Research*, 111(3): 1349-1355.

Forsell J, Granlund M, Stensvold CR (2012). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 31*(7): 1689–1696.

Greige S, El Safadi D, Bécu N, Gantois N, Pereira B, Chabé M, Benamrouz-Vanneste S, Certad G, El Hage R, Chemaly M, Hamze M, Viscogliosi E (2018). Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp . isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasites and Vectors, 11*(389): 1–10.

Green, M. and Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Hameed DM, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM (2011). Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitology Research*, 108(3): 553-560.

van Hattem JM, Arcilla MS, van Gool T, Molhoek N, Grobusch MP, Melles DC, de Jong MD, Schultz C, Bootsma MC, Bart A, Penders J, Goorhuis A (2018). Carriage of *Blastocystis* spp. in travellers - A prospective longitudinal study. *Travel Medicine and Infectious Disease, 27*: 87–91.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270*(1512): 313–321.

Hirata T, Nakamura H, Kinjo N (2007). Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa , Japan. *Parasitology Research, 101*(6), 1717–1719.

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*(5): 853–860.

Jalallou N, Iravani S, Rezaeian M, Alinaghizade A, Mirjalali H (2017). Subtypes distribution and frequency of *Blastocystis* sp. isolated from diarrheic and non-diarrheic patients. *Iranian Journal of Parasitology*, *12*(1): 63–68.

Jeremiah S, Parija S (2013). *Blastocystis*: taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology*, 3(1): 17-25.

Khalil S, Chaudhry R, Dattagupta S, Das R, Makharia GK, Mirdha BR (2016). Molecular characterization and subtyping of *Blastocystis* species in irritable bowel syndrome patients from North India. *Plos One*, *11*(1): e0147055.

Kiani H, Haghighi A, Rostami A, Azargashb E, Seyyed Tabaei SJ, Solgi A, Zebardast N (2016). Prevalence, risk factors and symptoms associated to intestinal parasite infections among patients with gastrointestinal disorders in Nahavand, western Iran. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *58*(1): 1–7.

Koltas IS, Eroglu F (2016). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates using SSU rRNA-DNA sequencing in rural and urban population in southern Turkey. *Experimental Parasitology*, *170*: 247–251.

Kostka M, Cepicka I, Hampl V, Flegr J (2007). Phylogenetic position of Karotomorpha and paraphyly of Proteromonadidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *43*(3): 1167–1170.

Krogsgaard LR, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, Bytzer P (2015). The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: A population-based case-control study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(3): 507-513.

Lee IL, Tan TC, Tan PC, Nanthiney DR, Biraj MK, Surendra KM, … Suresh, K. G. (2012). Predominance of *Blastocystis* sp . subtype 4 in rural communities , Nepal. *Parasitology Research*,110(4): 1553–1562.

Lee IL, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK (2012). *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites and Vectors*, 28(5): 130.

Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M (2018). Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *79*(3): 401–406.

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*(8): 803–807.

Lhotská Z (2016). Axenizace buněk střevního prvoka rodu *Blastocystis.* Bakalářská práce, Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice.

Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, Steinmann P, Utzinger J, Tong XM, Chen SH, Zhou XN (2007). Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitology Research*, *102*(1): 83–90.

Li WC, Wang K, Gu Y (2018). Occurrence of *Blastocystis* sp. and *Pentatrichomonas hominis* in sheep and goats in China. *Parasites and Vectors*, *11*(1): 1–7.

Lorencová M (2014). Diverzita rodu *Blastocystis* (Stramenopiles) v plazech a členovcích. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, 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*(1): 267–268.

Masuda A, Sumiyoshi T, Ohtaki T, Matsumoto J (2018). Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from dairy cattle in Kanagawa, Japan. *Parasitology International*, *67*(6): 702–705.

Meloni D, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Chabé M, Delhaes L, Dei-Cas E, Delbac F, Luigi Fiori P, Di Cave D, Viscogliosi E (2011). Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitology Research*, *109*(3): 613–619.

Mirza H, Tan KSW (2009). *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitology Research*, *104*(2): 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*, 84(4): 319-325.

Mohamed RT, El-Bali MA, Mohamed AA, Abdel-Fatah MA, El-Malky MA, Mowafy NM, Zaqhlool DA, Bakri RA, Al-Harthi SA (2017). Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. *Parasites and Vectors*, 10(1): 174.

Mohammad NA, Al-Mekhlafi HM, Moktar N, Anuar TS (2017). Prevalence and risk factors of *Blastocystis* infection among underprivileged communities in rural Malaysia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(5): 491-497.

Mokhtar A, Youssef A (2018). Subtype analysis of *Blastocystis* spp. isolated from domestic mammals and poultry and its relation to transmission to their in-contact humans in Ismailia governorate, Egypt. *Parasitologists United Journal*, *11*(2): 90–98.

Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT (2017). Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*(10): 573–584.

Nithyamathi K, Chandramathi S, Kumar S (2016). Predominance of *Blastocystis* sp. infection among school children in Peninsular Malaysia. *PLoS ONE*, *11*(2): 1–14.

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*(1): 348-355.

Oliveira-Arbex AP, David ÉB, Guimarães S (2018). *Blastocystis* genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, *57*(11): 59–63.

Osman M, Bories J, El Safadi D, Poirel MT, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, Delhaes L, Hugonnard M, Certad G, Zenner L, Viscogliosi E (2015). Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Veterinary Parasitology*, *214*(1–2): 167–170.

Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, Stensvold CR, Shouche YS (2015). Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infection, Genetics and Evolution*, *31*: 296–299.

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 (2014b). Communities of microbial eukaryotes in the mammalian gut within the context of environmental eukaryotic diversity. *Frontiers in Microbiology*, 5: 1-13.

Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RCA (2010b). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*, *169*(1–2): 8–17.

Paulos S, Koster PC, de Lucio A, Hernandez-de-Mingo M, Cardona GA, Fernandez-Crespo JC, Stensvold CR, Carmena D (2018). Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonoses and Public Health*, *65*(8): 993–1002.

Pawlowski J, Audic S, Adl S, Bass D, Belbahri L, Berney C, Bowser SS, Cepicka I, Decelle J, Dunthorn M, Fiore-Donno AM, Gile GH, Holzmann M, Jahn R, Jirků M, Keeling J, Kostka M, Kudryavtsev A, Lara E, Lukeš J, Mann DG, Mitchell EAD, Nitsche F, Romeralo M, Saunders GW Simpson AGB, Smirnov AV, Spouge JL, Stern RF, Stoeck T, Zimmermann J, Schindler D, de Vergas C (2012). CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS Biology*, *10*(11): e1001419.

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*(5): 638–639.

Pipatsatitpong D, Leelayoova S, Mungthin M, Aunpad R, Naaglor T, Rangsin R (2015). Prevalence and risk factors for blastocystis infection among children and caregivers in a child care center, Bangkok, Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(2): 310-315.

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*(3): 1–4.

Rajamanikam A, Govind SK (2013). Amoebic forms of *Blastocystis* spp. - evidence for a pathogenic role. *Parasites & Vectors*, *6*(1): 295.

Ramírez JD, Flórez C, Olivera M, Bernal MC, Giraldo JC (2017). *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS ONE*, *12*(2): 1–13.

Ramírez, J. D., Sánchez, L. V., Bautista, D. C., Corredor, A. F., Flórez, A. C., & Stensvold, C. R. (2014). *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, *22*: 223–228.

Rezaei Riabi T, Haghighi A, Mirjalali H, Poirier P, Zali MR, Delbac F, Haqhiqhi A, Wawrzyniak I (2018). Genetic diversity analysis of *Blastocystis* subtypes from both symptomatic and asymptomatic subjects using a barcoding region from the 18S rRNA gene. *Infection, Genetics and Evolution*, *61*:119–126.

Rigottier-Gois L (2013). Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: The oxygen hypothesis. *ISME Journal*, *7*(7): 1256–1261.

Rivera-Chávez F, Lopez CA, Bäumler AJ (2017). Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *105*(9): 93–101.

Rivera WL (2008). Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Veterinary Parasitology*, *156*(3–4): 178–182.

Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D (2011b). 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*(2): 308–312.

Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J (2013). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Veterinary Parasitology*, *196*(1–2): 85–89.

Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J (2014). Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*, *6*(1): 1–9.

Rossen NG, Bart A, Verhaar N, van Nood E, Kootte R, de Groot PF, D'Haens GR, **Ponsioen CY, van Gool T (2015).** Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(5): 1039–1044.

Ruaux CG, Stang BV (2014b). Prevalence of *Blastocystis* in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PLoS One, 9*(9): e107496.

Růžková J, Květoňová D, Jirků M, Lhotská Z, Stensvold CR, Parfrey LW, Jirků Pomajbíková K (2018). Evaluating rodent experimental models for studies of *Blastocystis* ST1. *Experimental Parasitology, 191*(6): 55–61.

El Safadi D, Cian A, Nourrisson C, Pereira B, Morelle C, Bastien P, Bellanger AP, Botterel F, Candolfi E, Desouberaux G, Lachaud L, Morio F, Pomares C, Wawrzyniak I, Delbac F, Gantois N, Certad G, Delhaes L, Poirier P (2016). Prevalence , risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp . from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infectious Diseases*, *16*(451): 1–11.

Scanlan PD (2012). *Blastocystis*: Past pitfalls and future perspectives. *Trends in Parasitology*, *28*(8): 327–334.

Scanlan PD, Knight R, Song SJ, Ackermann G, Cotter PD (2016a). Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* in family units living in the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, *45*: 95–97.

Scanlan PD, Ross RP, Stanton C, Cotter PD, Hill CJ, Ryan CA (2018). The intestinal protist *Blastocystis* is not a common member of the healthy infant gut microbiota in a Westernized country (Ireland). *Parasitology*, *145*(10): 1274–1278.

Scanlan PD, Stensvold CR (2013). *Blastocystis*: Getting to grips with our guileful guest. *Trends in Parasitology*, *29*(11): 523–529.

Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, Heilig HGHJ, 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(1): 326-330.

Scicluna SM, Tawari B, Clark CG (2006). DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, *157*(1): 77–85.

Sekar U, Shanthi M (2015). Recent insights into the genetic diversity, epidemiology and clinical relevance of *Blastocystis* species. *The Journal of Medical Research JMR*, 1(11): 33–39.

Seyer A, Karasartova D, Ruh E, Güreser AS, Turgal E, Imir T, Taylan-Ozkan A (2017). Epidemiology and prevalence of blastocystis spp. in North Cyprus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *96*(5): 1164–1170.

Singh M, Ho LC, Yap AL., 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*(2): 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*(5): 446–450.

Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J (2007b). Irritable bowel syndrome: A review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *International Journal for Parasitology*, *37*(1): 11–20.

Stensvold CR (2013). Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(1): 190–194.

Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen LOB, Nielsen HV (2012). Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(6): 1847–1851.

Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-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*(4): 473–479.

Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG (2012). Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(2): 263–273.

Stensvold CR, Christiansen DB, Elisabeth K, Olsen P, Nielsen HV (2011). Short Report : *Blastocystis* sp . Subtype 4 is common in danish *Blastocystis* -positive patients presenting with acute diarrhea. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *84*(6): 883–885.

Stensvold CR, van der Giezen M (2018). Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends in Parasitology*, *34*(5): 369–377.

Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoskikawa H, Clark CG (2007). Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends in Parasitology*, *23*(3): 93–96.

Stensvold CR, van der Giezen M (2018). Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends in Parasitology*, 34(5): 369-377.

Stenzel DJ, Boreham PF (1996). *Blastocystis hominis* revisited . *Clinical Microbiology Reviews*, *9*(4): 129–136.

Stenzel DJ, Boreham PFL, McDougall R (1991). Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *International Journal for Parasitology*, *21*(7): 807–812.

Suresh K, Smith H (2004). Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *23*(6): 509–511.

Tan HK, Zierdt CH (1973). Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. *Zeitschrift Für Parasitenkunde*, *42*(4): 315–324.

Tan KSW (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, *21*(4): 639–665.

Tan KSW, Singh M, Yap EH (2002a). Recent advances in *Blastocystis hominis* research: Hot spots in terra incognita. *International Journal for Parasitology*, *32*(7): 789–804.

Tan TC, Suresh KG (2006a). Amoeboid form of *Blastocystis hominis* - a detailed ultrastructural insight. *Parasitology Research*, *99*(6): 737–742.

Tan TC, Suresh KG (2006b). Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitology Research*, *98*(3): 189–193.

Teow WL, Ng GC, Chan PP, Chan YC, Yap EH, Zaman V, Singh M (1992). A survey of *Blastocystis* in reptiles. *Parasitology Research*, *78*(5): 453–455.

Teow WL, Zaman V, Ng GC, Chan YC, Yap EH, Howe J, Gopalakrishnakone P, Singh M (1991). A *Blastocystis* species from the sea-snake, *Lapemis hardwickii* (Serpentes: Hydrophiidae). *International Journal for Parasitology*, *21*(6): 723–726.

Thathaisong U, Worapong J, Tan-Ariya P, Viputtigul K, Mungthin M, Sudatis A,

Noonai A, Leelayoova S (2003). *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology, 41*(3): 967 975.

Udonsom R, Changbunjong T, Mori H, Popruk S, Mahittikorn A, Prasertbun R, Pintong AR, Sukthana Y, Komalamisra C (2018). *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infection, Genetics and Evolution, 65*(6): 107–111.

Wang W, Cuttell L, Bielefeldt-Ohmann H, Inpankaew T, Owen H, Traub RJ (2013b). Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasites and Vectors*, 24 (6): 215.

Wu Z, Mirza H, Teo JDW, Tan KSW (2014). Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *BioMed Research International,* 20: 392-396.

Yan Y, Su S, Ye J, Lai X, Lai R, Liao H, Chen G, Hou Z, Luo X (2007b). *Blastocystis* sp. subtype 5: A possibly zoonotic genotype. *Parasitology Research, 101*(6): 1527–1532.

Yoshikawa H, Kuwayama N, Enose Y (1995). Histochemical detection of carbohydrates of *Blastocystis hominis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology, 42*(1): 70–74.

Yoshikawa H, Morimoto K, Nagashima M, Miyamoto N (2004). A survey of *Blastocystis* infection in anuran and urodele amphibians. *Veterinary Parasitology*, *122*(2): 91–102.

Yoshikawa, H., Tokoro, M., Nagamoto, T., Arayama, S., Asih, P. B. S., Rozi, I. E., & Syafruddin, D. (2016). Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitology International*, *65*(6): 780–784.

Yoshikawa H, Wu Z, Howe J, Hashimoto T, Geok-Choo N, Tan KSW (2007). Ultrastructural and phylogenetic studies on Blastocystis isolates from cockroaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *54*(1), 33–37.

Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, Kanbara H (2009). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Veterinary Parasitology*, *160*(3–4): 295–300.

Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I (2004). Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology Research*, 94 (6): 391-396.

Yu N, Wei YL, Zhang X, Zhu N, Wang YL, Zhu Y, Zhang HP, Li FM, Yang L, Sun AD (2017). Barcode ITS2: A useful tool for identifying Trachelospermum jasminoides and a good monitor for medicine market. *Scientific Reports, 7*(1): 1–9.

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*(1): 73–74.

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*(1): 23–28.

Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC (2007). Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. *Parasitology Research*, *101*(1): 43–51.

Zierdt CH (1986). Cytochrome-free mitochondria of an anaerobic protozoan-*Blastocystis hominis*. *The Journal of Protozoology*, *33*(1): 67–69.

8 Přílohy

Obr. P1: Formlulář s potřebnými informacemi.

***Jméno: ……**
Pohlaví: ♀/♂ **Věk: .....……**
Národnost: ……
Zánětlivá onemocnění střev (IBD): ANO/NE
……
Cestování: v EU / mimo EU / necestuji
(v průběhu celého života)
……
Povolání: ……
Kontakt se zvířaty: ANO/NE
domácí zvířata (pes, kočka,...): **ANO/NE**
……
hospodářská z. (kráva, kůň,...) **ANO/NE**
……
jiné……

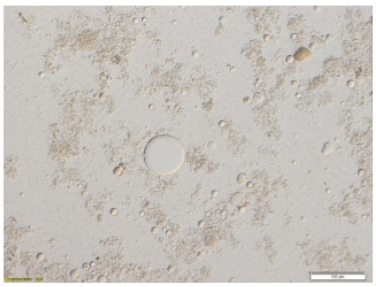
Vegetarián: ANO/NE
Místo bydliště (lokalita) ……
***Kontakt: ……**
Vzorkovnici je třeba naplnit alespoň do 1/2. Vzorek přineste co nejrychleji, maximálně však do 2 dnů. Udržujte jej v pokojové teplotě.
*není nutné uvádět
Poskytnutím vzorku souhlasíte s použitím výsledků v naší studii (anonymně).
podpis……..

Obr. P2: Přední strana informačního letáku, který byl formou složené brožury poskytován všem účastníkům studie.

Název a popis studie: Studium symbiotického střevního prvoka rodu *Blastocystis* v mikrobiomu člověka.

Průběh, podmínky a etická pravidla této studie vychází z Helsinské deklarace Světové lékařské asociace (64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013). Použití lidského biologického materiálu v ČR je řízeno platnou legislativou - Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů, Vyhláška č. 226/2008 Sb. o správné klinické praxi a bližších podmínkách klinického hodnocení léčivých přípravků, Zákon č. 101/2000 Sb. O ochraně osobních údajů a další.

Vedoucí pokusu: MVDr. Kateřina Jirků-Pomajbíková Ph.D. (kontakt: pomajbikova@paru.cas.cz, (+420-38-777-5470), Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice.

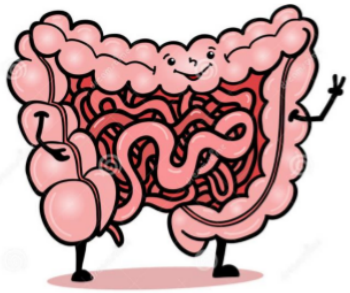


Obr.2: Prvok rodu *Blastocystis v kultuře s bakteriemi.*

Návod na sběr vzorku

- Při usednutí na toaletu si do ruky připravte složený toaletní papír nebo přiloženou špachtli
- Setřete část stolice na připravený papír nebo rovnou špachtlí
- Následně přeneste část stolice do odběrové nádoby (je potřeba ji naplnit alespoň do ½)
- Nádobu pevně uzavřete a vložte do sáčku se zipem
- Nezapomeňte do sáčku vložit vyplněný letáček, na němž je Váš informovaný souhlas a vyplněné obecné údaje (případně jméno nebo kontakt, pokud chcete být informování o výsledku kultivace na *Blastocystis*)
- Vzorek prosím skladujte při pokojové teplotě (18-24°C) a předejte co nejrychleji, nejdéle však do 24h kontaktní osobě

Možnost zapojení se do jedinečného výzkumu



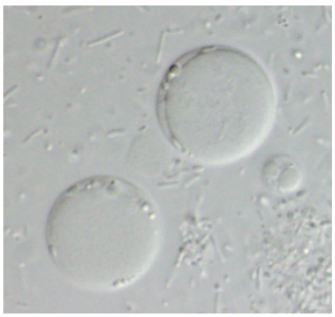
Obr. P3: Zadní strana informačního letáku.

Vážení zájemci,

dovolujeme si Vás touto cestou oslovit a požádat o Vaše zapojení do jedinečného výzkumu, který má za cíl přispět k objasnění role symbiotického prvoka rodu *Blastocystis* v mikrobiomu člověka.

O co se jedná? Prvok *Blastocystis* běžně osidluje tlusté střevo lidí i mnoha jiných savců. Dříve byl tento organismus považován za příležitostného patogena, nicméně nedávno bylo na základě předběžných výsledků prokázáno, že se nejspíš jedná o prvoka prospěšného lidskému zdraví. Nejenže se často vyskytuje u zdravých lidí, ale zřejmě se také podílí na udržování optimálního složení střevní mikroflóry. Dysbióza (nebo-li nerovnováha střevní mikroflóry) je s největší pravděpodobností důležitým faktorem přispívajícím k rozvoji Crohnovy choroby (CD) či ulcerózní kolitidy (UK). V našem výzkumu se zaměřujeme na výzkum souvislostí mezi výskytem prvoka *Blastocystis* a složením střevní bakteriální mikroflóry.

Jak k tomu došlo? V průběhu několika posledních desetiletí u obyvatel zejména vyspělých zemí prudce narůstá výskyt imunitně zprostředkovaných onemocnění zahrnujících alergie a autoimunitní onemocnění (mimo jiné například Crohnovu chorobu). Dramatický nárůst těchto onemocnění je dáván do souvislostí s moderním způsobem života, jehož součástí jsou vysoce hygienické návyky, chemicky ošetřovaná voda, potraviny a také nadměrné užívání antibiotik.



Obr.1: Prvok rodu *Blastocystis*.

Omezil se tak náš kontakt s mnoha mikroby, se kterými se náš organismus už od pradávna sžíval.

Co je CD a UK? Crohnova choroba je chronické zánětlivé střevní onemocnění, jehož přesná příčina není zatím známá. Postihuje nejčastěji obyvatele průmyslově vyspělých částí světa, proto se někdy označuje jako civilizační choroba. Léčba je velmi svízelná a omezuje se pouze na potlačení příznaků.
Ulcerózní kolitida je chronické onemocnění střevní sliznice - poškozuje ji a působí zánětlivé změny a vředy na jejím povrchu.

Jak se do výzkumu zapojit? Je to jednoduché! Stačí, když nám poskytnete vzorek stolice. V případě zájmu Vám bude u kontaktní osoby poskytnuta vzorkovnice s dotazníkem, kam vyplníte některé údaje. Vzorek můžete poskytnout samozřejmě i anonymně (tzn. nevyplníte jméno a případně ani kontakt). Veškerá data a výsledky budou ale i tak uchovávány a publikovány pouze anonymně!

K čemu tím přispějete? Zejména k hlubšímu studiu vlivu prvoka *Blastocystis* na mikrobiom člověka. Tyto poznatky by mohly v budoucnu přispět k využití blastocyst v prevenci či terapii výše uvedených onemocnění. V této době již na Parazitologickém ústavu AV ČR v.v.i. probíhá i experimentální výzkum na zvířecích modelech, nicméně je nezbytné tyto výsledky dávat do souvislostí se situací u lidí.

Kontaktní osoba: Bc. Zuzana Lhotská, Parazitologický ústav AV ČR, Branišovská 31, České Budějovice
email: zuzana.lhotska@paru.cas.cz