

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Výskyt střevního prvoka *Blastocystis* sp. u primátů
v zajetí**

Bakalářská práce

Anna Šejnohová

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, PhD.

Školitel – specialista: RNDr. Milan Jirků

Konzultant: RNDr. Zuzana Lhotská

České Budějovice

2021

Šejnohová, A., 2021: Výskyt střevního prvoka *Blastocystis* sp. u primátů v zajetí [The occurrence of intestinal protist *Blastocystis* sp. in captive primates. Bc. Thesis, in Czech.] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This bachelor thesis is focused on the occurrence of intestinal protist *Blastocystis* sp. in non-human primates held in captivity. The main aim of this study was to summarize all available information about *Blastocystis* sp. with a special focus on the occurrence, prevalence and diversity of its subtypes in wild and captive non-human primates. *Blastocystis* sp. and its role in health and disease is still unclear in both humans and non-human primates. Given that recent studies indicate that *Blastocystis* sp. is a commensal organism rather than a pathogen and has a close association with the diversity of intestinal bacteriome. Thus, I also focus on summarizing this information in my thesis.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne:

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem mým kolegům z Laboratoře parazitární terapie, především pak Kateřině a Milanovi Jirků za obrovskou pomoc, ochotu a trpělivost při vedení mé laboratorní a bakalářské práce. Dále bych také chtěla poděkovat Zuzaně Lhotské a Oldřišce Kadlecové za podání pomocné ruky, kdykoliv jsem ji potřebovala. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, že mi byla velkou oporou.

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Cíle práce	2
3.	Biologie prvoka <i>Blastocystis</i> sp.	3
3.1.	Taxonomické určení	3
3.2.	Životní cyklus	3
3.3.	Morfologická stádia <i>Blastocystis</i> sp.	4
3.3.1.	Vakuolární forma.....	5
3.3.2.	Granulární forma	5
3.3.3.	Améboidní forma.....	5
3.3.4.	Cysta	6
3.3.5.	Další morfologické formy	7
3.4.	Genetická diverzita a hostitelská specifita.....	8
3.4.1.	Genetická diverzita	8
3.4.2.	Hostitelská specifita.....	9
4.	Diagnostika <i>Blastocystis</i> sp.	11
4.1.	Koproskopické metody	11
4.1.1.	Koncentrační techniky	11
4.1.2.	Barvené roztěry exkrementů.....	12
4.2.	Kultivace	13
4.3.	Molekulární diagnostika	13
4.3.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	14
4.3.2.	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	16
5.	<i>Blastocystis</i> sp. versus patogenita	17
6.	Role <i>Blastocystis</i> sp. ve střevním mikrobiomu	20
6.1.	Základní poznatky.....	20
6.2.	Vliv <i>Blastocystis</i> sp. na střevní mikroflóru.....	21

7.	Výskyt <i>Blastocystis</i> sp. u nehumánních primátů	24
7.1.	Výskyt <i>Blastocystis</i> sp. u nehumánních primátů ve volné přírodě	24
7.2.	Výskyt <i>Blastocystis</i> sp. u nehumánních primátů v zajetí.....	27
7.3.	Zoonotický potenciál <i>Blastocystis</i> sp.....	31
8.	Experimentální část	35
8.1.	Materiál a metodika	35
8.1.1.	Získávání vzorků	35
8.1.2.	Diagnostické metody	35
8.2.	Průběžné výsledky	36
9.	Závěr.....	37
10.	Seznam citované literatury	38

1. Úvod

Jedním z nejčastěji se vyskytujících prvků v lidském střevě se ukazuje být *Blastocystis* sp. Tento prvek kolonizuje téměř jednu miliardu lidí po celém světě (Stensvold et al., 2020). Mnoho let byl považován za kvasinku (Brumpt, 1912), až s využitím molekulárních analýz byl zařazen mezi *Stramenopiles* (Silberman et al., 1996). Ačkoli je znám už přes 100 let (Alexeieff, 1911), o jeho roli ve střevním mikrobiomu se stále vedou spory (Stensvold a van der Giezen, 2018; Deng et al., 2021). Dříve byl nalézán především u lidí s gastrointestinálním onemocněním (Poirier et al., 2012), až s posunem molekulárních a fylogenetických diagnostik a zahrnutím studia střevního mikrobiomu u zdravé populace do epidemiologických studií dochází ke zjištění, že jde spíše o komenzální organismus (Krogsgaard et al., 2018; Tito et al., 2019; Lhotská et al., 2020). V současnosti se *Blastocystis* sp. začíná pokládat za střevní organismus (Lukeš et al., 2015), který by mohl svým působením ve střevě významně ovlivnit kompozici lidského střevního bakteriomu (Billy et al., 2021). Dodnes byl detekován zejména u obratlovců (Stensvold et al., 2009; Alfellani et al., 2013b, 2013c), nicméně v mnoha případech byl nalezen i u bezobratlých živočichů (Zaman et al., 1993; Cian et al., 2017). Častý výskyt blastocyst je zaznamenáván především v rozvojových zemích, kde jeho prevalence dosahuje až 100 % (El Safadi et al., 2014; Adao et al., 2016). V industrializovaných zemích se udává nižší prevalence blastocyst (Bart et al., 2013; Krogsgaard et al., 2015; Lhotská et al., 2020). Vysoké prevalence *Blastocystis* sp. jsou také nalézány u nehumánních primátů jak ve volné přírodě (Petrášová et al., 2011; Helenbrook et al., 2015; Zhao et al., 2017), tak u těch držených v zajetí (Alfellani et al., 2013a; Zanzani et al., 2016; Betts et al., 2020). U majitelů zvířat a u ošetřovatelů je zaznamenána častější kolonizace blastocystou oproti lidem, kteří nemají žádný kontakt se zvířaty (Stensvold et al., 2009; Parkar et al., 2010; Wang et al., 2014b; Lhotská et al., 2020). Studie provedené v zoologických zahradách ukázaly, že v důsledku blízkého kontaktu mezi primáty a ošetřovateli zřejmě dochází k zoonotickému přenosu blastocyst (Stensvold et al., 2009; Köster et al., 2021; Rudzińska et al., 2021). Ošetřovatelé se pravděpodobně mohou nakazit při čištění klecí, kontaminovanou vodu nebo přímým kontaktem s primátem (Leelayoova et al., 2004; Stensvold et al., 2009; Rudzińska et al., 2021). Přestože existuje vysoká pravděpodobnost výskytu přenosu blastocyst mezi lidmi a primáty v zoologických zahradách, v důsledku přísných sanitačních postupů bylo doposud objeveno pouze několik případů možného zoonotického přenosu (Stensvold et al., 2009; Ma et al., 2020; Köster et al., 2021; Rudzińska et al., 2021).

2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce je shrnout dostupné a aktuální informace o střevním prvoku *Blastocystis* sp. u primátů v zajetí s důrazem na zoonotický potenciál.

Pro splnění daného záměru byly vytyčeny následující dílčí cíle:

- shrnout obecné poznatky o prvoku *Blastocystis* sp.;
- shrnout dostupné informace o výskytu prvoka *Blastocystis* sp. a jeho subtypů u primátů v zajetí;
- shrnout faktory, které mohou ovlivňovat výskyt *Blastocystis* sp. a jeho subtypů u primátů a jejich ošetřovatelů (ve vztahu se zoonotickým potenciálem);

3. Biologie prvoka *Blastocystis* sp.

3.1. Taxonomické určení

Historie prvoka *Blastocystis* sp. sahá až na začátek 20. století, kdy byl objeven a následně pojmenován (Alexeieff, 1911). Kvůli absenci pohybu a panožek se mnoho let usuzovalo, že se jedná o kvasinku (Alexeieff, 1911; Brumpt, 1912), avšak později bylo toto stanovisko vyvráceno a dospělo se k přesvědčení, že jde o prvoka (Zierdt, 1983, 1991). S postupem času a využitím molekulárních fylogenetických metod byl na základě genu malé ribozomální podjednotky SSU rRNA zařazen mezi *Stramenopiles* (Silberman et al., 1996). Nicméně není typickým zástupcem této taxonomické skupiny, neboť postrádá bičíky a tubulární cílie, které ztratil sekundárně (Arisue et al., 2002; Clark et al., 2013). *Blastocystis* sp. je také příbuzný ke skupinám *Proteromonade* a *Slopalinida* (Kostka et al., 2007), jejichž předkové byly anaerobové obývající střevo (Stensvold a Clark, 2016a).

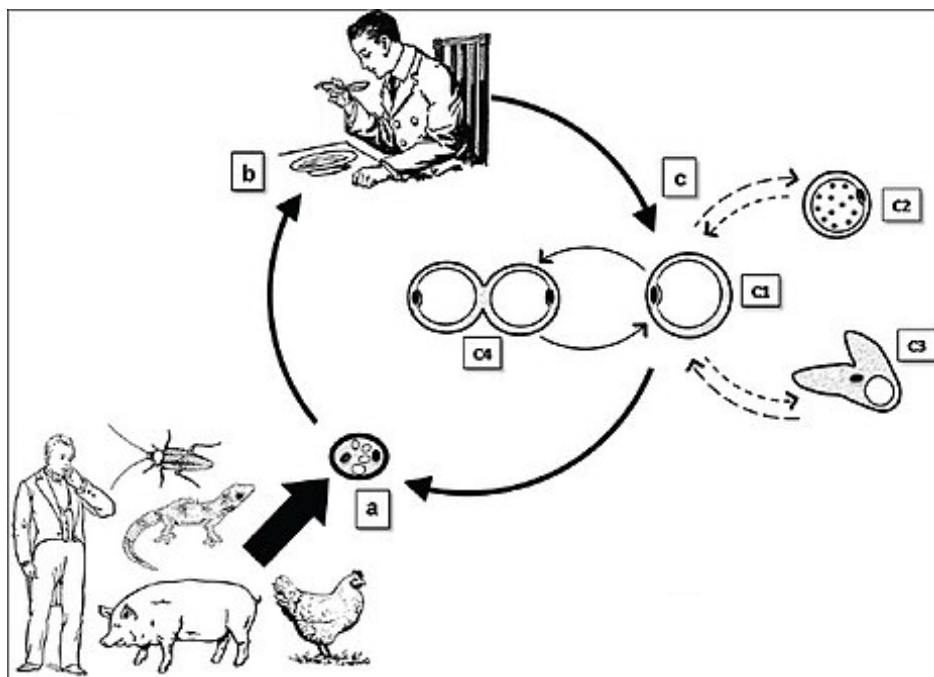
3.2. Životní cyklus

Informace o životním cyklu blastocyst a jejich rozmnožování jsou stále neúplné, a ne zcela jasné. Důvodem byla především absence vhodného experimentálního modelu (Ajampur a Tan, 2016). Důkazem může být několik studií vytvořených na toto téma (Stenzel a Boreham, 1991; Zierdt, 1991; Singh et al., 1995; Tan, 2004; Zhang et al., 2007). Nedávno bylo v několika laboratořích včetně naší zjištěno, že zřejmě nejvhodnějším experimentálním modelem je potkan (Li et al., 2013; Růžková et al., 2018). Obecně platí, že v životním cyklu *Blastocystis* sp. jsou stádia osídlující především tlusté a slepé střevo hostitele, tj. vakuolární, granulární, améboidní forma a cysta (Wang et al., 2014a).

Pro přenos *Blastocystis* sp. mezi hostiteli jsou do okolního prostředí vylučovány cysty v exkrementech. K přenosu dochází fekálně-orální cestou (Yoshikawa et al., 2004b) a při průchodu žaludkem do lumen tlustého střeva dochází excystaci cyst a uvolnění vakuolární formy. Vakuolární stádium se dále může přeměnit na granulární nebo améboidní formu, nicméně podmínky jejich vzniku stále nejsou přesně definované (Tan, 2008). Jedna z možností je změna podmínek ve střevním ekosystému, při které dojde k přeměně vakuolární buňky v granulární formu (Dunn et al., 1989). U blastocyst bylo také pozorováno mnoho typů rozmnožování, z nichž nejčastěji sledovaným bylo binární dělení u vakuolární formy (Zhang et al., 2007). Dalším možností je pučení, které se u blastocyst objevuje ve stresových *in-vitro*

podmínkách. Vyskytuje se i schizogonie a sporulace, nicméně stále není jisté, jaké faktory jsou potřeba pro spuštění jednotlivých reprodukčních mechanismů u *Blastocystis* sp. (Govind et al., 2002). Životní cyklus *Blastocystis* sp. je znázorněn na obrázku 1.

Díky vhodně navrhnutým experimentálním modelům bude snad brzo zaznamenán posun ve znalostech o životním cyklu *Blastocystis* sp.



Obr. 1: Životní cyklus *Blastocystis* sp.: a) stádium cysty; b) fekálně-orální přenos přes kontaminovanou vodu a potravu; c) možné formy *Blastocystis* sp. ve střevě; c₁) vakuolární forma; c₂) granulární forma; c₃) améboidní forma; c₄) binární dělení vakuolární formy (převzato z publikace Jeremiah a Parija, 2013).

3.3. Morfologická stádia *Blastocystis* sp.

Byly popsány čtyři hlavní morfologické formy, a to vakuolární, granulární, améboidní forma a stádium cysty (Clark et al., 2013).

3.3.1. Vakuolární forma

Vakuolární forma je nejčastěji pozorovatelným stádiem *Blastocystis* sp. a její velikost se udává mezi 2 – 200 μm (Stenzel a Boreham, 1996; Tan a Suresh, 2006). Tato forma může nabývat kulatého až oválného tvaru (Tan, 2008) s vakuolou uvnitř, která vyplňuje většinu prostoru a vytlačuje cytoplasmu spolu s ostatními organelami na okraj (MacPherson a MacQueen, 1994; Tan, 2008). Mezi tyto organely se řadí jádro, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a „*mitochondrion-like organelle*“ (MLO), což jsou organely funkčně podobné mitochondriím. Ačkoliv blastocysty mají MLO, tedy organely důležité pro respiraci, je tento prvek striktně anaerobní (Dunn et al., 1989; Tan, 2008; Jeremiah a Parija, 2013). Na základě analýz s využitím světelného a elektronového mikroskopu byly objeveny karbohydrátové inkluze nacházející se uvnitř centrální vakuoly. Proto je vakuola považována za organelu se zásobní funkcí (Yoshikawa et al., 1995). Dále jsou důkazy o tom, že by vakuola mohla hrát roli v apoptóze blastocyst (Nasirudeen et al., 2001). U vzorků získaných ze symptomatických pacientů byly pozorovány vakuolární formy s drsným povrchem, ke kterému často dokázaly adherovat bakterie (Tan et al., 2008).

3.3.2. Granulární forma

Tvar i velikost granulární formy blastocyst se podobá vakuolární formě, přičemž obecně se velikost udává v rozmezí 6-80 μm . Na rozdíl od vakuolární formy však obsahuje drobné heterogenní granule. Tyto granule se nacházejí jak uvnitř centrální vakuoly, tak ve vrstvách cytoplasmy obklopujících tuto vakuolu (Zhang et al., 2007; Scanlan, 2012). Pomocí elektronové mikroskopie byly detekovány tři funkčně odlišné typy granulí obecně nazvané jako metabolické, reprodukční a lipidové (Tan a Zierdt, 1973). Granulární typ blastocyst bývá pozorován v dlouhodobě udržovaných *in-vitro* kultivacích (Zhang et al., 2007), při axenizaci kultury nebo po přidání antibiotik (Stenzel a Boreham, 1996).

3.3.3. Améboidní forma

O améboidní formě se toho doposud moc neví. Zatím není jisté, jak přesně tato forma vypadá, ani kdy a při jakých podmínkách v těle hostitele vzniká (Tan, 2008). Podle jedné studie se jedná o buňku o velikosti od 2 do 8 μm , která má nepravidelný tvar těla a může být u ní přítomna pseudopodie (Scanlan, 2012). Uvnitř buňky se nachází centrální vakuola, na povrchu obklopena povrchovým pláštěm a v pseudopodiích může být přítomný Golgiho aparát a četné

mitochondrie (Tan et al., 2001). Autoři studie Tan a Suresh (2006) dokázali pomocí transmisní elektronové mikroskopie určit dva typy améboidní formy. První typ obsahoval centrální vakuolu, ve které se nacházely drobné granule. Druhý typ byl charakteristický několika menšími vakuolami, které zaplňovaly celý vnitřní prostor. Povrchový plášť améboidní formy vykazoval v některých částech buňky mnohem silnější vrstvu, než v jiných oblastech. V této studii autoři provedli kultivaci vzorků získaných ze symptomatických a asymptomatických pacientů. Zajímavým zjištěním bylo, že se améboidní formy vyskytovaly pouze u izolátů pocházejících ze symptomatických jedinců. Proto by mohla být améboidní forma zodpovědná za symptomy u lidí s *Blastocystis* sp. a její nález by mohl indikovat případnou patogenitu. Někteří se také domnívají, že je toto stádium mezistupněm ve vytvoření silnostěnné cysty (Singh et al., 1995).

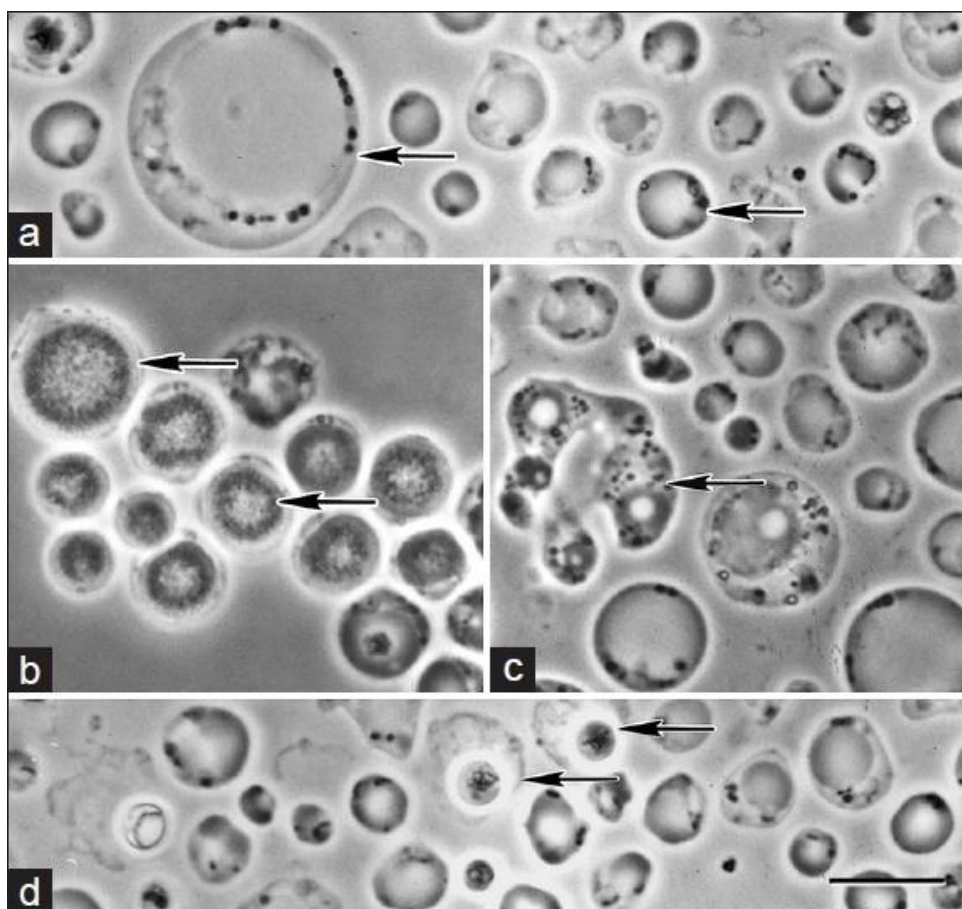
3.3.4. Cysta

Stádium cysty je zodpovědné za fekálně-orální přenos blastocyst mezi jedinci (Yoshikawa et al., 2004b). Jde o útvar malé velikosti obvykle v rozmezí od 3 do 10 μm a bez přítomnosti centrální vakuoly (Scanlan, 2012). Charakteristická je silná stěna s několika vrstvami. Tvar cysty může být kulatý až oválný, uvnitř se nacházejí viditelná vícečetná jádra (Tan, 2008; Jeremiah a Parija, 2013). Dále byla v cystě zjištěna přítomnost vnějšího fibrilárního pláště, který může být detekován v raných stádiích, nebo při odchodu cyst z trávicího traktu (Zaman et al., 1997). Jde o stádium adaptované na proměnlivé podmínky prostředí, které i po nepříznivých teplotních podmínkách bude stále schopno přenosu a excystace ve střevě hostitele (Moe et al., 1999). U životního cyklu blastocyst rozeznáváme tenkostěnné a silnostěnné cysty. Tenkostěnné cysty se pravděpodobně účastní autoinfekce ve střevě hostitele, zatímco silnostěnné cysty odcházejí z těla hostitele do vnějšího prostředí a mohou infikovat nového hostitele fekálně-orální cestou (Singh et al., 1995). Cysty jsou především detekovány ve slepém a tlustém střevě, v tenkém střevě se téměř neobjevují (Yoshikawa et al., 2004b).

Základní morfologické formy *Blastocystis* sp. jsou znázorněny na obrázku 2.

3.3.5. Další morfologické formy

K obecně přijímaným stádiím přibyly v průběhu let další formy, ke kterým patří avakuolární a multivakuolární forma. Multivakuolární forma obsahuje více menších vakuol, zatímco avakuolární forma je charakteristická absencí vakuoly. Velikost těchto buněk je menší než u vakuolárních a granulárních, udává se od 5 do 8 μm (Stenzel et al., 1991; Jeremiah a Parija, 2013). Ačkoliv již uběhla poměrně dlouhá doba, co byla tato stádia popsána (Stenzel et al., 1991), jejich detekce není tak častá. Přesto převládá názor, že jde o běžné morfologické formy v podmínkách *in-vivo* (Jeremiah a Parija, 2013). Podle jedné studie může dokonce jít o zbytky buněk, které se degenerovaly jejich vystavením kyslíku (Vdovenko, 2000).



Obr. 2: Životní formy *Blastocystis* sp. při měřítku 10 μm : a) vakuolární forma; b) granulární forma; c) améboidní forma; d) cysta (převzato z publikace Jeremiah a Parija, 2013).

3.4. Genetická diverzita a hostitelská specifita

3.4.1. Genetická diverzita

Na konci minulého století se usuzovalo, že je prvok *Blastocystis* sp. značně hostitelsky specifický. Proto se označoval jednotlivými druhovými názvy, jako například *Blastocystis hominis* u lidí (Alexeieff, 1911; Brumpt, 1912), nebo jako druhy *Blastocystis galli*, *Blastocystis anatis*, *Blastocystis anseri*, které byly nalezeny u domácí drůbeže a *Blastocystis lapemi* vyskytující se u mořských hadů (Stenzel a Boreham, 1996). Avšak s postupným využíváním molekulárních a fylogenetických technik byla u blastocyst zjištěna široká genetická diverzita, a proto se upustilo od používání druhových názvů (Clark, 1997). Nyní je tento prvok celosvětově znám jako *Blastocystis* sp. a na základě molekulárně-fylogenetických analýz malé ribozomální podjednotky genu 18S rRNA se určují jednotlivé subtypy (Stensvold et al., 2007b; Clark et al., 2013). Momentálně by měl být definován nový subtyp v případě, pokud je přítomna minimálně 4% divergence sekvence SSU rRNA od dnes již otypovaných sekvencí (Stensvold a Clark, 2020). Podle dosavadních dat je patrné, že v budoucnu budou popsány další nové subtypy blastocyst. V roce 2013 bylo potvrzených 17 rozdílných subtypů, z toho devět se vyskytovalo u člověka (Alfellani et al., 2013c; Stensvold a Clark, 2016a). Od té doby byly popsány další nové subtypy u různých živočichů. (Zhao et al., 2017; Maloney et al., 2018). Ve srovnávací studii (Stensvold a Clark, 2020) došlo k vyloučení několika subtypů, které byly označeny jako nově objevené. Šlo o subtypy ST18-ST20 a ST22, které se při bližším zkoumání vyhodnotili jako „molekulární chiméry“. Chiméry mohou vznikat při amplifikaci DNA. V průběhu PCR se může pozastavit extenze amplikonu a přerušený amplikon následně funguje jako primer během dalšího cyklu PCR. Tento primer chybně nasedá na templátové vlákno a syntetizuje sekvenci, která je nakonec přepsána z několika různých templátů. U takto vzniklé sekvence pravděpodobně nedojde ke shodě s žádnou známou sekvencí a daný organismus se vyhodnotí jako nově objevený (Haas et al., 2011). Momentálně tedy rozeznáváme 22 subtypů (Stensvold a Clark, 2020) a mimo to byla též objevena rozsáhlá intra-subtypová diverzita. Jde o variabilitu uvnitř určitého subtypu a obecně jsou tyto varianty označovány jako alely (Stensvold et al., 2012b).

3.4.2. Hostitelská specifita

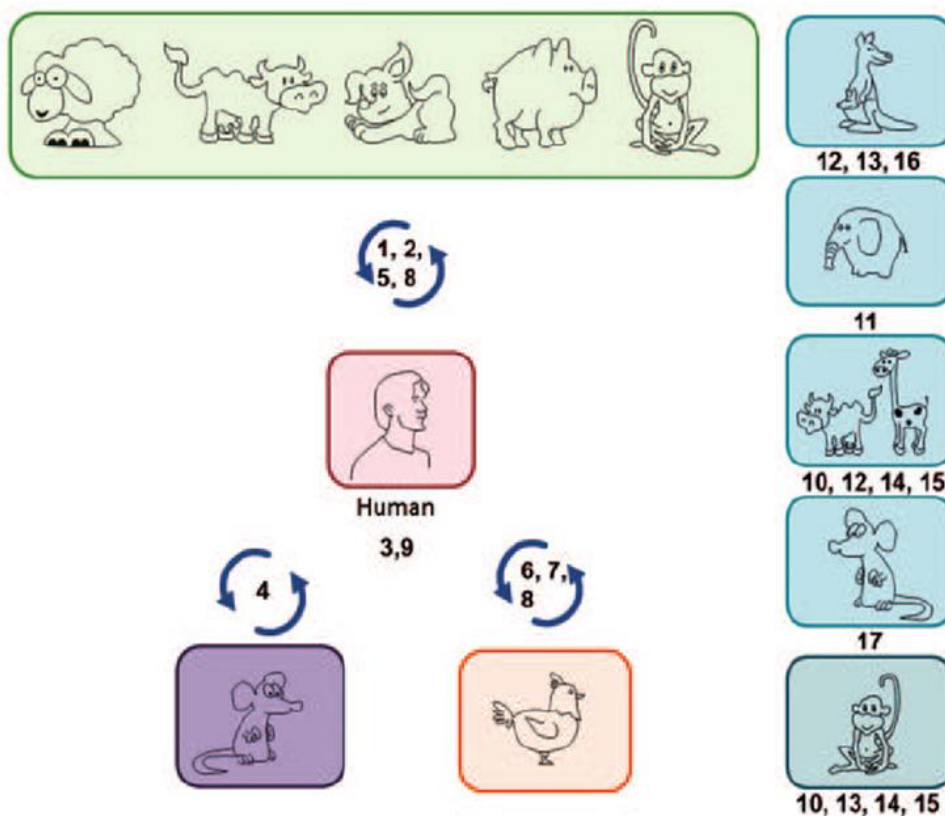
Blastocystis sp. kolonizuje střevo mnoha zvířat včetně savců, ptáků, plazů, obojživelníků, ryb, nebo hmyzu (Stensvold a Clark, 2016a). Obecně se subtypy vyznačují variabilní hostitelskou specifikou. Například subtyp ST3, který bývá detekován u širokého spektra hostitelů (Stensvold et al., 2012b), zatímco ST9 byl prozatím detekován pouze u člověka (Rauff-Adedotun et al., 2020). Další subtypy se převážně nacházejí u nějakého typického hostitele, jako jsou například ST6 a ST7 s typickým nálezem u ptáků, ale byly také výjimečně nalezeny u člověka (Alfellani et al., 2013c).

Rozlišujeme 22 známých subtypů, které se ve velké míře objevují u teplokrevných obratlovců. Z deseti subtypů nalezených u člověka jsou nejčastěji detekovány první čtyři subtypy - ST1 až ST4 (Alfellani et al., 2013b), zatímco ST5 až ST9 a ST12 se u něj objevují pouze sporadicky (Stensvold et al., 2009; Jiménez et al., 2019). Zajímavým subtypem je ST4, který se vyskytuje především v evropských zemích a je hojně detekován u lidí a hlodavců (Stensvold et al., 2009; Alfellani et al., 2013b). Po otypování sekvencí ST4 získaných z mitochondriálního genomu pomocí *multilocus sequence typing* (MLST) byla zjištěna poměrně nízká intra-subtypová diverzita. Tudíž se spekuluje, že se tento subtyp začal objevovat u člověka v poměrně nedávné době (Stensvold et al., 2012b). Subtyp ST5 je běžně pozorován u hospodářských zvířat. Přírodním hostitelem je nejspíš prase, kde je detekován nejčastěji (Alfellani et al., 2013c; Wang et al., 2014a). Uvádí se, že ST5 je potenciálně přenosný ze zvířete na člověka (Wang et al., 2014b). Subtypy ST6 a ST7 jsou považovány za ptačí subtypy s občasným nálezem u lidí. Debatuje se zde o možném zoonotickém přenosu z ptáků na lidi (Alfellani et al., 2013a; Cian et al., 2017). Hostitelská specifita *Blastocystis* sp. a výskyt jednotlivých subtypů u teplokrevných obratlovců je graficky znázorněn na obrázku 3.

Blastocystis sp. také běžně osidluje střevo studenokrevných obratlovců. Nicméně získaná data, která jsou založená na sekvenaci SSU rRNA, jsou prozatím limitována. Veřejná databáze *GenBank* obsahuje pouze několik osekvenovaných izolátů získaných ze studenokrevných živočichů. Autoři jedné studie Yoshikawa et al. (2016) zjistili, že by izoláty ze studenokrevných obratlovců mohly spadat do subtypů ST1-ST9 a ST11-ST16.

U bezobratlých živočichů byly blastocysty detekovány už v roce 1993, kdy byly zaznamenány u švábů (Zaman et al., 1993). V několika dalších studiích byl také vyšetřován i jiný hmyz, nicméně množství takových vzorků je značně omezené (Yoshikawa et al., 2016; Cian et al., 2017). Zajímavým zjištěním byla detekce alel nalezených u hmyzu, které

vykazovaly téměř úplnou homologii s již dříve získanými izoláty od lidí a zvířat. Zde autoři zmiňují možnost kontaminace hmyzu výkaly z prostředí (Cian et al., 2017).



Obr. 3: Hostitelská specifita *Blastocystis* sp. a výskyt jednotlivých subtypů u různých druhů zvířat s možností zoonotických přenosů (převzato z publikace Wawrzyniak et al., 2013).

4. Diagnostika *Blastocystis* sp.

4.1. Koproskopické metody

Z pohledu gastrointestinálních parazitů patří stolice k nejvhodnějšímu materiálu pro jejich diagnostiku, protože infekční stádia jsou vylučována v exkrementech. Navíc jednou z velkých výhod je, že se vzorky exkrementů získávají neinvazivním odběrem. Všeobecně se doporučuje také sběr vzorků exkrementů a jejich následné vyšetření několikrát zopakovat pro záchyt co největšího spektra parazitů (Modrý et al., 2018).

4.1.1. Koncentrační techniky

Koncentrační techniky, tj. flotace a sedimentace, jsou jednou z nejčastěji používaných metod a byly také používány pro detekci *Blastocystis* sp. Nicméně v současné době jejich význam v této souvislosti upadá. To především z toho důvodu, že cysty blastocyst jsou velmi malé a tudíž obtížně rozlišitelné, a navíc mohou být zaměněny s kvasinkami a dalšími morfologicky podobnými organismy (Zierdt, 1991; Petrášová et al., 2011). Dále je tento typ diagnostiky u blastocyst komplikován nedostatečnou schopností rozlišit genetickou diverzitu blastocyst (tj. určit subtypy), která se v poslední době ukazuje být nezbytnou pro zjišťování dalších informací v jejich epidemiologii (Stensvold a Clark, 2016a). Přesto jsou koproskopické metody stále důležitou součástí parazitologické diagnostiky v mnoha studiích (Abe et al., 2002; Petrášová et al., 2011; Mohammadpour et al., 2020). Těmito technikami se ve své bakalářské práci zabývám proto, že je využívám pro parazitologické vyšetření vzorků trusu od primátů v zajetí (více informací viz. kapitola 9.1.2.).

Flotace

Flotace patří mezi koncentrační techniky, jejichž podstatou je vztlínání parazitárních stádií s nižší hustotou k povrchu flotačního roztoku. Typů flotačních roztoků je poměrně velké množství, proto je vždy třeba zhodnotit účel parazitologického vyšetření, pro který je použit (Burrows, 1965). Ve flotaci dochází k oddělení cyst, oocyst a některých vajíček helmintů od zbytku exkrementu. Tato stádia jsou díky flotačnímu roztoku o vysoké hustotě vyplavena na povrch, kde jsou snadno odebrána mikrobiologickou kličkou, přenesena na mikroskopické sklíčko a následně vyšetřena světelnou mikroskopií. V rámci rutinního parazitologického vyšetření pro co nejširší záchyt parazitů se hojně užívá modifikovaný Sheatherův cukerný

roztok se známou měrnou hustotou 1,33 (Sheather, 1923). Nevýhodou této metody je velmi krátký časový prostor pro vyšetření, jinak dochází k deformaci parazitárních stádií v důsledku osmotického působení flotačního roztoku. Následně může docházet k jejich obtížnému rozlišení. Ačkoliv má tato metoda vysokou sensitivitu, u *Blastocystis* sp. nevykazuje tak přesné výsledky z důvodu malé velikosti cyst. V některých případech ale stále zůstává součástí diagnostických postupů pro zjištění prevalence *Blastocystis* sp. (Parker et al., 2010; Sá et al., 2013; Kalousová et al., 2014).

Sedimentace

Sedimentace spadá mezi koncentrační techniky a principem jde o metodu, kdy „těžká“ infekční stadia parazitů klesají na dno. Tento sediment je poté vyšetřován s využitím světelné mikroskopie. Exkrement se rozmíchá buď s vodou, nebo se specifickým roztokem – to závisí na typu sedimentace. Zpravidla se touto metodou detekují vajíčka motolic, vrtejšů, některých tasemnic a hlístic. Výhodou této metody oproti flotaci je, že u parazitárních stádií nedochází k deformaci sledovaného stadia (Burrows, 1965). Kombinace obou technik by ale měla být zachována a aplikována v rámci parazitologické diagnostiky pro záchyt co nejširšího spektra parazitů (gastrointestinálního a respiračního traktu). Jedna z hojně využívaných koncentračních metod je *Merthiolate-Iodine-Formaldehyde* (MIF) sedimentace (Sapero a Lawless, 1953). Detekce blastocyst pomocí MIF sedimentace a paralelně pomocí PCR analýzy byla provedena u vzorků nehumánních primátů a lidí z Tanzánie (Petrášová et al., 2011).

Diagnostika blastocyst pouze s využitím flotačních a sedimentačních technik má omezení kvůli nižší citlivosti detekce cyst a vakuolárních stádií ve světelném mikroskopu. Proto se spíše doporučuje využívat kultivační techniky, či barvené vzorky trusu (Clark a Diamond, 2002; Petrášová et al., 2011).

4.1.2. Barvené roztěry exkrementů

Pro lepší zobrazení některých parazitů se využívá barvených roztěrů vzorků trusu. Nejčastěji se využívá barvicí technika s využitím Gomoriho trichromu (Burrows, 1965). Další z možností je využití Wheatleyho trichromového barvení, které je výhodné aplikovat společně s dalšími diagnostickými metodami, protože není zdaleka tak citlivé (Mohammadpour et al., 2020). V případě *Blastocystis* sp. se využívá pro vizualizaci malých cyst, případně trofických

stádií (Stensvold et al., 2007a; Stensvold a Clark, 2016a). Tato metoda je široce používána a jednoduchá pro detekci dalších střevních prvoků jako například *Chilomastix mesnili*, *Entamoeba* spp., *Giardia intestinalis* a další. Další možností je využít barvení pomocí *Iron-Hematoxylin*, které se běžně využívá pro zafixování vzorků stolice a možnou detekci *Blastocystis* sp. (Zhang et al., 2012).

4.2. Kultivace

In-vitro kultivace jsou hojně používanou pomocnou metodou pro diagnostiku různých střevních prvoků. Její výhodou je vysoká sensitivita, protože dochází k množení trofických stádií prvoků v médiu a jsou tak snadněji detekovatelní (Termmathurapoj et al., 2004; Tan, 2008). Nevýhodou je časová a finanční náročnost. Pro rutinní detekci *Blastocystis* sp. se převážně uplatňuje xenická kultivační metoda. Tento způsob kultivace je charakteristický zachováním nedefinovaných populací bakterií z použitého vzorku exkrementu, které spoluvytváří anaerobní prostředí (Clark a Diamond, 2002). První xenická kultivace byla popsána už v roce 1921 (Barret, 1921), kdy autor použil jako živnou půdu lidské krevní sérum a 5 % roztok chloridu sodného (Barret, 1921). V současné době se pro xenické kultivace používá především modifikované Jonesovo (Leelayoova et al., 2002; Suresh a Smith, 2004) nebo Boeck-Drbohlavovo médium (Boeck a Drbohlav, 1925). Občas se také využívají další růstová média jako je Robinsonovo médium (Stensvold a Clark, 2016a).

Další možností kultivací *Blastocystis* sp. je také axenická kultivace, kde jsou další mikroorganismy (bakterie, houby apod.) eliminovány s využitím různých širokospektrálních antibiotik. Proto je možné získat z axenické kultivace čisté buňky blastocyst. Často se využívá *Locke-Egg* médium a později bylo modifikováno i další *Iscove's modified Dulbecco's medium* (IMDM) (Ho et al., 1993; Clark a Diamond, 2002). Nicméně axenická kultivace je kvůli své náročnosti využívána spíše pro experimentální účely (Lhotská, 2016).

4.3. Molekulární diagnostika

Ačkoli jsou koproskopické metody a kultivace stále důležitou součástí diagnostiky *Blastocystis* sp., pomocí molekulární diagnostiky je možné vyšetřit vzorky s mnohem vyšší citlivostí. Obecně patří konvenční PCR a *Real-Time* PCR mezi nejspolehlivější metody detekce blastocyst (Stensvold et al., 2006).

4.3.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

První PCR protokol pro detekci *Blastocystis* sp. byl uveden v roce 2006 (Stensvold et al., 2006), kdy ho autoři navrhli pro amplifikaci úseku genu pro malou ribozomální podjednotku SSU rRNA. Ačkoli je při tomto vyšetření odhalena přítomnost *Blastocystis* sp. ve vzorku, daný úsek DNA není dostatečně variabilní pro subtypovou analýzu. Proto byl následně vyvinut protokol pro amplifikaci variabilnějšího úseku SSU rRNA pro rozlišení širokého spektra subtypů blastocyst. Dále se využívala *sequence-tagged-site* (STS) PCR, díky které bylo možné detekovat přítomnost jednoho i více subtypů v jednom vzorku. Nevýhodou tohoto protokolu ovšem je schopnost omezeného rozlišení pouze na subtypy ST1 až ST7 (Stensvold, 2013). V dnešní době byl tento protokol překonán, protože bylo popsáno další množství nových subtypů a u některých byla odhalena navíc vysoká intra-subtypová diverzita (Stensvold a Clark, 2020).

V současné době se pro molekulární detekci blastocyst hojně používá protokol pro tzv. *barcoding* (Scicluna et al., 2006). DNA *barcoding* je technika pro identifikaci druhu daného organismu pomocí krátkého úseku DNA ze specifického genu. Vybraná sekvence DNA je připodobněna k tzv. čárkovanému kódu (*barcode*), který v biologickém pojetí je jedinečný pro daný druh (Hebert et al., 2003). U prvoků je pro *barcoding* nejčastěji využívána variabilní oblast genu 18S rRNA (Pawlowski et al., 2012).

Blastocystis sp. vykazuje značnou genetickou variabilitu, a to jak na úrovni subtypů, tak uvnitř jednotlivých subtypů (Stensvold a Clark, 2016a). Diverzita uvnitř subtypů je dána alelami a nazývá se intra-subtypová diverzita (Stensvold and Clark, 2016a). Bylo zjištěno, že právě „*barcode region*“ identifikovaný pro *Blastocystis* sp. je úsek SSU rRNA, který poskytuje značnou genetickou variabilitu blastocyst včetně subtypové i intra-subtypové variability (Stensvold et al., 2012b). Na základě této sekvence vznikl protokol pro konvenční PCR, kde se uplatňují primery zvané RD5 a BhRDr, které se navážou na daný úsek SSU rRNA o velikosti přibližně 600 párů bazí (bp) (Scicluna et al., 2006). Po vyšetření pomocí konvenční PCR se pozitivní izoláty odešlou na Sangerovo sekvenování a získané sekvence se následně přiřadí k subtypu s využitím barkódovací platformy určené pro *Blastocystis* sp. Ta je dostupná online (<http://pubmlst.org/blastocystis/>). Program vyhodnotí hledaný izolát a tím je určen subtyp a jeho přesná alela (Stensvold a Clark, 2016b), jak je znázorněno na obrázcích 4 a 5.

Přestože se tento postup stále využívá v mnoha laboratořích, debatuje se o specifitě primerů. Časem se ukázalo, že používané primery amplifikují i DNA jiných, fylogeneticky

vzdálených organismů (např. jednobuněčných hub), což může komplikovat detekci *Blastocystis* sp. (Stensvold a Clark, 2016b).

Ačkoliv je konvenční PCR stále používanou diagnostickou metodou, nyní je často nahrazena kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qPCR), která dosahuje ještě přesnějších výsledků (pokud jde o citlivost) (Stensvold et al., 2012a). Pro další rozvoj pochopení epidemiologie blastocyst by mohl přispět fakt, že v současnosti je osekvenován jaderný genom několika subtypů, a to ST1 (Gentekaki et al., 2017), ST4 (Wawrzyniak et al., 2015) a ST7 (Denoeud et al., 2011).

Sequence query

Please paste in your sequence to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or a matches will be identified if an exact match is not found. You can query using either DNA or peptide sequences. ⓘ

Please select locus/scheme — Order results by —

All loci — locus —

Enter query sequence (single or multiple contigs up to whole genome in size)

Alternatively upload FASTA file

Select FASTA file: ⓘ

Click to select or drag and drop...

```
CCAAATTCTTCGTTACCCGTTACTGCCATGGTAGTCCAATACACTACCATCGAAAGCTGATAGGCGAGAA
ACTTGAAAGGAACATCGCTACTAACAAGCATGCGATACCTAACACAATTATTACTCACCACAAATG
CTGGTTTACACCTAATAAGTACTTCTTCATGGTTACCCACGAAACGAAACACATGTATTAGCCCTAGA
ATTACTACGGTTATCCATATACTACTATTCCAAATAAATACTAATGATATAATGAGCCATTGCGAGTT
TCACACTAAACCTATTTAGACTTACACATGCATGGCTTAATCTTTGAGACGAGCGTATGACTACTGGCAG
GATCAA
```

Obr.4: Zadání sekvence do barkódovací platformy.

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

Allele information - 18S_rRNA_barcode: 112

Provenance/meta data

locus: 18S_rRNA_barcode

allele: 112

sequence: TATAGTTTAT TTGGAATAGT AGTTATATGG ATAACCGTAG TAATTCTAGG GCTAATACAT GTGTTTTCTG TCGTGGGTAA CCATGAAGGA
CCAGCATTTG TTGGTGAGTA ATAATAATTG TGTTAGGTAT CGCATGCTTG TTAGTAGCGA TGTTCTTTTC AAGTTTCTGC CCTATCAGCT
CTACCATGGC AGTAACGGGT AACGAAGAAT TTGGGTTCTGA TTTTCGGAGAG GGAGCCTGAG AGATGGCTAC CACATCCAAG GAAGGCAGCA
CTGACACAGG GAGGTAGTGA CAATAAA

length: 357

status: Sanger trace checked

date entered: 2011-10-19

datestamp: 2011-10-19

sender: Rune Stensvold

curator: Rune Stensvold, Laboratory of Mycology and Parasitology, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark

subtype: ST7

Obr. 5: Vyhodnocení subtypu a dané alely v barkódovací platformě.

(https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_blastocystis_seqdef&page=alleleInfo&locus=18S_rRNA_barcode&allele_id=112).

4.3.2. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

V současné době byl *Real-Time* PCR (qPCR) začleněn do rutinní diagnostiky blastocyst v mnoha laboratořích (Šloufová et al., in prep.; Poulsen et al., 2016; Cian et al., 2017; Cinek et al., 2021). Ke kvantitativní PCR se váže mnoho výhod, především vysoká specifita a citlivost této metody (Stensvold et al., 2012a). Dodnes bylo uvedeno několik protokolů pro qPCR detekci blastocyst (Saffold et al., 2008; Poirier et al., 2011; Stensvold et al., 2012a). Často používaný protokol pro detekci blastocyst byl optimalizován ve studii Stensvoldem et al. (2012a), který využívá specifických primerů pro amplifikaci úseku SSU rRNA, o velikosti 118 bp, a pro vizualizaci *Taqman* sondu. Další výhodou qPCR je získávání informací o míře infekce *Blastocystis* sp. u jednotlivých hostitelů na základě hodnot z *threshold cycle* (C_T) a jejich srovnání s kvantifikační křivkou (Šloufová et al., in prep.; Stensvold a Clark, 2016a). V naší laboratoři jsme připravili kvantifikační křivku na základě ředící řady buněk blastocyst z xenické kultury (Šloufová et al., in prep.)

Výhodné by mohlo být využití qPCR pro tzv. *prescreening*, kdy by se vyšetřila pozitivita (resp. negativita) vzorků na přítomnost blastocyst (Stensvold, 2013). Následně by pozitivní vzorky byly otestovány konvenční PCR a na základě získaných sekvencí by byly určeny subtypy pomocí barkódovací platformy (Stensvold a Clark, 2016a). Pro určení subtypů a jejich směsných infekcí se ukazuje být vhodným přístupem i *next-generation sequencing*, při kterém je možné současně osekvenovat větší množství vzorků (Cinek et al., 2021). Tato metoda však není schopna odlišit jednotlivé alely, jejichž určení je důležité pro případný zoonotický přenos.

5. *Blastocystis* sp. versus patogenita

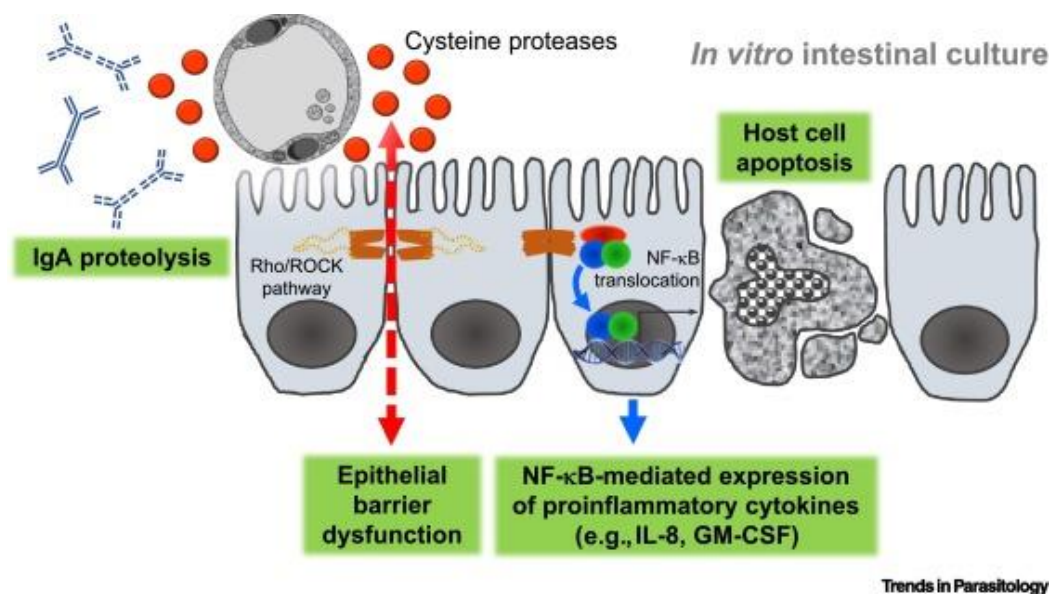
Blastocystis sp. byl dříve považován za patogenní organismus, který svým vlivem ve střevě hostitele dokázal způsobit gastrointestinální potíže (Zierdt, 1983; Moe et al., 1997). Mezi typické symptomy se řadí bolest břicha, průjem a nadýmání (Tan et al., 2010). Existují také studie, které považují kopřivku za jeden ze symptomů blastocyst (Casero et al., 2015). Nicméně role *Blastocystis* sp. ve zdraví a nemoci dosud nebyla uspokojivě zodpovězena. Hlavním důvodem je zjištění, že se *Blastocystis* sp. poměrně často vyskytuje také u zdravé populace, s prevalencí mezi 7 % až 50 % (Bart et al., 2013; Scanlan et al., 2014; El Safadi et al., 2016; Seyer et al., 2017; Krogsgaard et al., 2018; Tito et al., 2019; Lhotská et al., 2020). V rozvojových zemích je pozorován velmi vysoký výskyt blastocyst (Adao et al., 2016; Poulsen et al., 2016; Rebolla et al., 2016), který v některých případech dosahuje až 100 % (El Safadi et al., 2014). Důvodem mohou být špatné hygienické podmínky, které se v těchto zemích vyskytují. Ty pak zvyšují možnost fekálně-orálního přenosu například pomocí kontaminované vody (Leelayoova et al., 2008).

Mechanismus případného patogenního působení *Blastocystis* sp. na hostitelský organismus dosud také nebyl zcela objasněn. Předpokládá se, že svoji roli zde hrají hydrolázy, které působí na střevní stěnu hostitele, a tak mohou narušovat mukózní povrch střeva (Denoeud et al., 2011). V nedávném pokusu bylo zjištěno, že v *in-vitro* kultuře jsou blastocysty schopny adherovat k intestinálnímu mucinu a sekretovat zde cysteinové proteázy, které svým vlivem způsobí apoptózu epitelových buněk střeva. Nicméně tento experiment nebyl dokázán v *in-vivo* modelu (Stensvold et al., 2020). Dále by mohly mít svůj podíl také cysteinové a serinové proteázy, které mohou mít vliv na imunitní systém hostitele (Denoeud et al., 2011). Jedna studie dokonce uvedla, že vakuolární formy *Blastocystis* sp. mohou být schopné fagocytózy bakterií ve střevě, díky které se vyvine zánětlivá odpověď organismu (Dunn et al., 1989). Tato práce ovšem zůstala ojedinělá. Ačkoli existuje mnoho domněnek možného patogenního působení, kromě hydroláz se nepovedlo nalézt žádné glykoproteiny nebo lektiny, které by mohly stát za případnou patogenitou. (Stensvold a Clark, 2016a). Možné negativní působení tohoto prvoka na střevní stěnu je graficky znázorněno na obrázku 6.

Negativní vliv blastocyst byl donedávna velmi úzce spojován se syndromem dráždivého tračníku (IBS – *Inflammatory Bowel Syndrome*) (Yakoob et al., 2010; Jimenez-Gonzalez et al., 2012; Poirier et al., 2012; Krogsgaard et al., 2015; Mattiucci et al., 2016) nebo se zánětlivými onemocněními střev, jako jsou ulcerativní kolitida nebo Crohnova choroba (IBD – *Inflammatory Bowel Disease*) (Peña et al., 2020; Shirvani et al., 2020). IBS je funkční

gastrointestinální onemocnění, které se projevuje bolestí břicha a změnou ve fungování střev. S těmito změnami jsou spojené příznaky jako jsou například bolest břicha, zvracení, průjem nebo nadýmání (Longstreth et al., 2006). *Blastocystis* sp. a jeho role v IBS zůstává stále nejasná. Ačkoliv je s vysokou prevalencí velmi často nalézán u zdravé populace bez gastrointestinálních příznaků (Poulsen et al., 2016), jeho detekce je poměrně vysoká i u pacientů s IBS (Yakoob et al., 2010; Mattiucci et al., 2016). V současné době přibývají studie, ve kterých je výskyt *Blastocystis* sp. vyšší u zdravé populace oproti pacientům s IBS (Krogsgaard et al., 2015, 2018; Nagel et al., 2016). Protože může nabývat různých prevalencí napříč populacemi, je zde vysoká možnost, že jde nejspíše o komenzálního prvoka (Popruk et al., 2021). Nicméně bude třeba dalších studií, které by vyšetřily jeho možné patogenní působení v *in-vitro* a *in-vivo* podmínkách. Přestože může být spojován i s IBD, dodnes nebyl nalezen průkazný vliv na tyto zánětlivá onemocnění. Ve studii Andersen et al. (2015) byly vyšetřovány vzorky stolice u pacientů s Crohnovou chorobou a bylo zjištěno, že u žádného pacienta se tento prvok nevyskytoval. I několik dalších studií prokázalo, že se blastocysty téměř nevyskytují u IBD pacientů (Petersen et al., 2013; Rossen et al., 2015; Tito et al., 2019).

V současné době jsou blastocysty hojně diskutovány v souvislosti s komenzalismem a možným pozitivním působením na střevní mikrobiom (Lukeš et al., 2015). K tomuto zjištění dopomohla i experimentální studie naší laboratoře Billy et al. (2021), kde byl zjištěn pozitivní vliv blastocyst na mikrobiom při jejich dlouhodobé kolonizaci v potkaním modelu. S touto kolonizací byla spojena vyšší bakteriální diverzita a změna kompozice ve střevním mikrobiomu. Následně bylo prokázáno rychlejší zmírnění kolitidy u potkanů s *Blastocystis* sp. ST3, než u negativních jedinců. Dnes je *Blastocystis* sp. primárně přijímán jako neinvazivní prvok, který se především vyskytuje u zdravé populace (Stensvold et al., 2020).



Obr. 6: Možné negativní působení *Blastocystis* sp. na střevní stěnu v *in-vitro* kultuře (převzato z publikace Stensvold et al., 2020).

6. Role *Blastocystis* sp. ve střevním mikrobiomu

6.1. Základní poznatky

Deset střevních mikrobů na každou lidskou buňku v těle. Takové množství různorodých organismů obývá střevní mikroflóru (Gilbert et al., 2018; Inkpen, 2019). K těmto organismům jsou řazeny bakterie, viry, prvoci, helminti a různé druhy jednobuněčných hub. Diverzita mikrobiomu je v každém jedinci unikátní a vztahuje se k několika faktorům - například k věku, pohlaví, stravování nebo zeměpisné poloze (Yatsunenko et al., 2012; Rook et al., 2014). Dlouhou dobu byla pozornost zaměřena pouze na bakteriální mikroflóru, až nyní se začíná vědecká komunita zaměřovat i na ostatní komponenty střevního mikrobiomu jako je například eukaryom (Lukeš et al., 2015; Chabé et al., 2017). Ten se skládá z prvoků a helmintů a začíná se na něj nahlížet jako na důležitou součást mikrobiomu, o které se zatím mnoho neví. (Lukeš et al., 2015; Sobotková et al., 2019).

Vysoká diverzita všech komponentů ve střevním ekosystému je spojena se zdravými jedinci a často bývá spojována s nižším výskytem zánětlivých onemocnění střev (Clemente et al., 2018; Ogunrinola et al., 2020). Bylo prokázáno, že lidé z rozvojových zemí mají více diverzifikovanou střevní mikroflóru, než lidé v moderní společnosti (Stamper et al., 2016). Důvodem mohou být zvýšené požadavky na hygienu, nebo odlišné návyky stravování – například nízký obsah vlákniny (Stamper et al., 2016; De Filippo et al., 2017; You et al., 2021).

V případě střevních prvoků hraje zřejmě často roli délka kolonizace hostitelského střeva. Při dlouhodobém vystavení daného organismu imunitnímu systému hostitele by se už měla modifikovat případná imunitní odpověď. To znamená, že při dlouhodobé kolonizaci by hostitel neměl vykazovat žádné gastrointestinální potíže (Scanlan a Stensvold, 2013). Stejně vlastnosti má i „*Old friends*“ hypotéza, která popisuje evoluční vztah mezi imunitním systémem a mikroorganismy. Pokud by došlo k vymizení některých organismů, imunitní systém by nefungoval správně (Rook, 2012).

6.2. Vliv *Blastocystis* sp. na střevní mikroflóru.

V současnosti se výzkum na prvku *Blastocystis* sp. zaměřuje na jeho vliv na střevní mikrobiom a případné působení při experimentálním vyvolání střevního zánětu (Stensvold a van der Giezen, 2018; Billy et al., 2021).

Vzhledem k tomu, že je jeho výskyt často spojen se zdravými jedinci bez gastrointestinálních potíží (Krogsgaard et al., 2018; Lhotská et al., 2020), je *Blastocystis* sp. v současnosti považován spíše za komenzálního prvka, který je schopen dlouhodobé kolonizace v lidském střevě (Scanlan et al., 2014; Audebert et al., 2016).

Bylo také zjištěno, že složení bakteriálního mikrobiomu se mezi pacienty s IBD a zdravou populací liší (Ni et al., 2017). U pacientů s IBD dochází k poklesu striktně anaerobních bakterií a přesmyku k fakultativním anaerobům, a tato částečná přítomnost kyslíku je spojována s nerovnováhou střevního mikrobiomu, tzv. dysbiózou (Rigottier-Gois, 2013; Rivera-Chávez et al., 2017). Ve zdravém střevě totiž dochází k produkci butyrátu (Vital et al., 2014), který je střevními epiteliálními buňkami využit pro β -oxidaci a dochází k redukci koncentrace kyslíku ve střevě, jak je znázorněno na obrázku 7. Tento mechanismus následně vede k redukci proliferace fakultativních anaerobů (Byndloss et al., 2017). Tímto by mohlo být částečně vysvětleno, proč je *Blastocystis* sp. (jako striktně anaerobní prvek) jen poměrně vzácně detekován u onemocnění spojených s dysbiózou (Stensvold a van der Giezen, 2018).

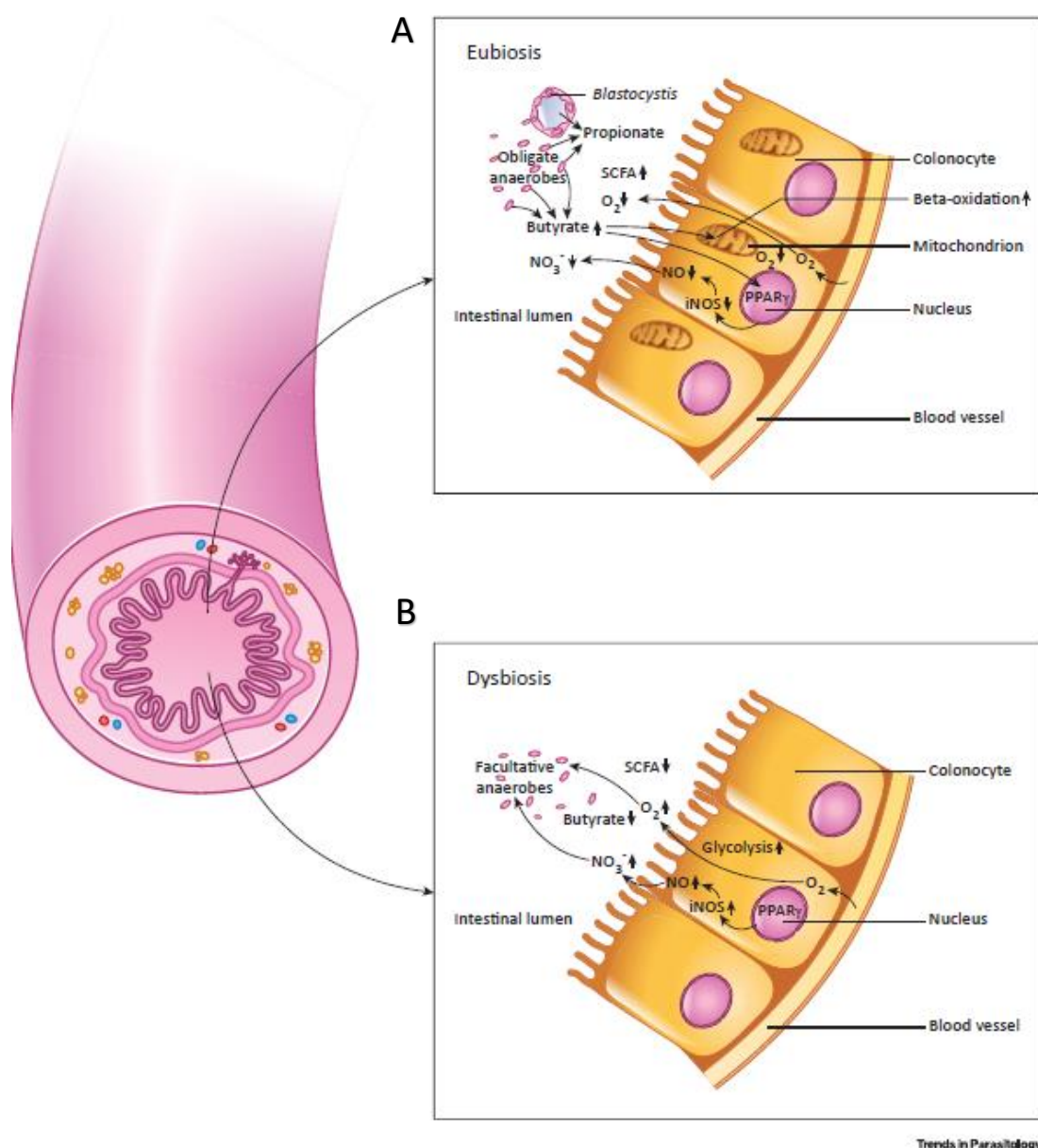
Obecně můžeme lidský mikrobiom rozdělit do tří kategorií, tzv. enterotypů, které jsou charakterizovány převládající „skupinou“ bakterií: *Bacteroides*, *Prevotella* a *Ruminococcus* (Arumugam et al., 2011). Zatímco enterotyp *Bacteroides* je primárně spojován s nižší bakteriální diverzitou (Costea et al., 2018) a také například obezitou a záněty střevního traktu (Vieira-Silva et al., 2016), zbylé dva enterotypy (*Prevotella* a *Ruminococcus*) se naopak většinou pojí s vyšší bakteriální diverzitou a zdravým střevním mikrobiomem (Andersen et al., 2015). Díky metagenomické studii bylo zjištěno, že přítomnost *Blastocystis* sp. je asociována právě s enterotypy *Prevotella* a *Ruminococcus*, zatímco u *Bacteroides* se vyskytuje zřídka (Andersen et al., 2015; Tito et al., 2019), což naznačuje, že by tyto prvoci mohli být stabilní součástí zdravého střevního mikrobiomu.

Některé studie dokonce uvádějí, že přítomnost *Blastocystis* sp. ve střevě má přímou spojitost s vyšší bakteriální diverzitou střevního mikrobiomu (Andersen et al., 2015; Audebert et al., 2016; Krogsgaard et al., 2018; Nieves-Ramirez et al., 2018). Kromě epidemiologických korelačních studií se začínají objevovat experimentální studie zaměřené na testování vlivu kolonizace *Blastocystis* sp. na bakteriální mikroflóru a střevní zánět. Například naše laboratoř

provedla takové testování *Blastocystis* sp. na *specific-pathogen-free* (SPF) outbredních potkanech (Billy et al., 2021). Zde sledovali vliv dlouhodobé a krátkodobé kolonizace *Blastocystis* ST3 na bakteriom a zároveň na intenzitu střevního zánětu. Bylo zjištěno, že dlouhodobá kolonizace ovlivňuje kompozici střevního bakteriomu a zároveň zmírňuje kolitidu. *Blastocystis* sp. by také mohl ve střevě působit jako ekosystémový inženýr, který případnou predací na bakteriích nepřímo zvyšuje bakteriální diverzitu a ovlivňuje tak strukturu mikrobiomu (Laforest-Lapointe a Arrieta, 2018).

Nicméně existují i studie, kde byl naopak zjištěn negativní vliv *Blastocystis* sp. na střevní mikrobiom (Defaye et al., 2020; Vega et al., 2020), přestože se takových studií objevuje mnohem méně. Například v nedávné studii byl na myším modelu zjištěn i negativní vliv subtypu ST7 na bakterie *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, které jsou přirozenými obyvateli lidského trávicího traktu a jsou zde velice prospěšné (Yason et al., 2019). Jistou roli by zde mohl hrát nevhodně zvolený experimentální model, protože myši nejsou vhodné z hlediska jejich zesílené imunitní odpovědi (Růžková et al., 2018). Proto by následující studie měly brát zřetel na jednotlivé subtypy a jejich míru patogenity. Jistou roli by zde mohla hrát i skutečnost, jestli vzorek blastocysty pochází od člověka s gastrointestinálními problémy, nebo od zdravého jedince. Zpravidla totiž izolát pocházející od symptomatického jedince navodí ve svém hostiteli podobné střevní potíže (Hussein et al., 2008). Proto by bylo přínosné se na tento trend zaměřit z důvodu možného přenosu mezi jedinci.

Nedávno také došlo k první transplantaci stolice, která obsahovala blastocysty patřící do subtypů ST1 a ST3. Vzorky stolice byly získány z asymptomatických dárců a ani v jednom příjemci nevyvolaly gastrointestinální potíže (Terveer et al., 2019). Ačkoli u lidí s IBD je výskyt tohoto prvoka pouze sporadický, dodnes stále zůstává kontroverzním organismem v tématu zdravého lidského mikrobiomu (Stensvold et al., 2020). Některé informace o patogenním vlivu blastocyst mohou být také chybné z důvodu problematické metodiky, kdy autoři vyšetřovali pouze vzorky pacientů s IBS a nezahrnuli do studie zdravou populaci. Dalším důvodem může být i to, že ani po eradikaci *Blastocystis* sp. nebyly nalezeny důkazy o zlepšení symptomů nemocných (Andersen a Stensvold, 2016). Proto se v současné době předpokládá, že je *Blastocystis* sp. komenzálním prvokem s hojným výskytem u zdravé populace. Jako stabilní člen zdravého střevního mikrobiomu pomáhá upravovat kompozici mikroflóry bez vedlejších patologických vlivů (Scanlan et al., 2014; Andersen a Stensvold, 2016; Stensvold a van der Giezen, 2018; Billy et al., 2021).



Obr. 7: Vliv přítomnosti/absence *Blastocystis* sp. na střevo hostitele: A - eubiotický stav je charakterizován anaerobním prostředím a přítomností pozitivních mikroorganismů ve střevě včetně *Blastocystis* sp., které se uplatňují v produkci butyrátu; B - dysbiotický stav je charakterizován porušením rovnováhy střevního mikrobiomu a zvýšením koncentrace O_2 ve střevním prostředí (převzato z publikace Stensvold and van der Giezen, 2018).

7. Výskyt *Blastocystis* sp. u nehumánních primátů

Podobně jako u lidí, studií zabývajících se výskytem a diverzitou střevních prvků u nehumánních primátů (NHP) je relativně málo. Přesto jsou takové práce důležité pro pochopení evoluce lidského střevního mikrobiomu a také pro sledování případných zoonotických přenosů. Protože je dnes *Blastocystis* sp. považován spíše za komenzálního prvoka (Lukeš et al., 2015), informace o jeho působení na střevní mikrobiom primátů jsou velice důležité. Přesto zůstává výzkum u NHP zaměřený na *Blastocystis* sp. sporadický.

Lidé a nehumánní primáti jsou evolučně velmi blízcí, a tudíž je možné předpokládat, že budou sdílet některé subtypy tohoto prvoka, nebo že bude docházet k zoonotickým přenosům oběma směry. Na základě některých epidemiologických studií, lidé a primáti spolu nejčastěji sdílí subtypy ST1, ST2 a ST3 (Petrášová et al., 2011; Stensvold and Clark, 2016a; Betts et al., 2020; Hublin et al., 2021). Subtypy ST1 a ST3 nevykazují velkou intra-subtypovou diverzitu (Stensvold et al., 2012b; Alfellani et al., 2013a), zatímco u subtypu ST2 byla popsána značná genetická variabilita (Alfellani et al., 2013a; Ramírez et al., 2017; Lhotská et al., 2020). U lidí a nehumánních primátů se dále vyskytují i méně obvyklé subtypy, jako jsou ST4, ST5 a ST8, kdy subtyp ST4 se vyskytuje především u lidí, zatímco u NHP má pouze sporadický výskyt (Alfellani et al., 2013a; Ramírez et al., 2017). Oproti tomu subtypy ST5 a ST8 jsou naopak častěji detekovány u primátů, ale jen ojediněle jsou zachyceny u lidí (Stensvold et al., 2009; Alfellani et al., 2013a; Oliveira-Arbex et al., 2020).

7.1. Výskyt *Blastocystis* sp. u nehumánních primátů ve volné přírodě

Ve volné přírodě byl střevní prvek *Blastocystis* sp. nalezen v populacích goril nížinných západních (*Gorilla gorilla gorilla*) (Vlčková et al., 2018), šimpanzů hornoguinejských (*Pan troglodytes verus*) (Sá et al., 2013; Renelies-Hamilton et al., 2019), šimpanzů východních (*Pan troglodytes schweinfurthii*) (Kalousová et al., 2014), makaků rhesus, jávských a indočínských (*Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, *Macaca leonina*) (Yoshikawa et al., 2009; Zhao et al., 2017; Li et al., 2020), vřešťanů pláštíkových a mono (*Alouatta palliata*, *Alouatta pigra*) (Villanueva-Garcia et al., 2017), šimpanzů učenlivých, gueréz pláštíkových a kočkodanů červenozelených (*Pan troglodytes*, *Colobus guereza*, *Chlorocebus aethiops pygerythrus*) (Petrášová et al., 2011). Míra prevalence u volně žijících primátů se pohybuje v rozmezí 10 až 100 procent (Ramírez et al., 2014; Vlčková et al., 2018). Nejčastěji popisované subtypy u

volně žijících primátů jsou ST1 až ST3, přičemž ST2 je nejfrekventovanější (Hublin et al., 2021).

U goril nížinných v chráněné oblasti Dzanga-Sangha ve Středoafričské republice byla zjištěna celková prevalence blastocyst 9,3 %, přičemž pozitivní byly pouze dvě skupiny zvířat ze čtyř sledovaných (Vlčková et al., 2018). V této studii nebylo ale sledováno zastoupení jednotlivých subtypů. Další prevalence studii u goril nížinných uvádí Pafčo et al. (2018) ze stejné oblasti a zčásti se týkala i stejných jedinců. Prevalence *Blastocystis* sp. byla zjištěna 16 %.

Autoři další práce na šimpanzích hornoguinejských (*Pan troglodytes verus*) v Senegalu uvádí prevalenci blastocyst 40,7 % (Renelies-Hamilton et al., 2019). Kromě toho zjistili, že nejčastější subtypy jsou ST1, ST2 a ST3, ale v části vzorků nebylo možné subtyp zjistit. Obě výše uvedené studie se zabývaly také vztahy mezi výskytem prvoků a diverzitou střevních bakteriálních populací. Zatímco u volně žijících goril byla pozornost zaměřena především na korelace mezi bakteriálním mikrobiomem a prvoky *Entamoeba* spp., studie na šimpanzích se věnovala přímo vztahu mikrobiomu s prvokem *Blastocystis* sp. V druhém případě byly zjištěny asociace blastocyst s nižší diverzitou bakteriální mikrobioty, což je v rozporu s některými studiemi u lidí (Andersen et al., 2015; Audebert et al., 2016; Forsell et al., 2017; Nash et al., 2017; Tito et al., 2019).

Vzorky od šimpanze hornoguinejského byly také získány z Národního parku Cantanhez v Guineji-Bissau. Tito lidoopi byli primárně vyšetřeni na přítomnost různých střevních symbiontů včetně *Blastocystis* sp. Ten zde byl nalezen s prevalencí 49 % (Sá et al., 2013). Ačkoliv se jedná o relativně vysokou prevalenci, autoři při analýze vzorků využili pouze koproskopické metody, tj. flotaci a sedimentaci. Je tedy možné, že výsledná prevalence *Blastocystis* sp. by mohla být vyšší při využití citlivější molekulární diagnostiky.

Studie Petrášové a kol. (2011) se zaměřila na území Národního parku Rubondo Island v Tanzánii, který obývají dva uměle zavlečené druhy NHP, šimpanz učenlivý (*Pan troglodytes*) a gueréza plástíková (*Colobus guereza*). Společně s nimi se zde vyskytuje i jeden druh primáta původní pro tento ostrov, kterým je kočkodan červenozelený (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*). Celkově bylo získáno 206 vzorků trusu od *P. troglodytes*, 111 vzorků od *C. guereza* a 49 vzorků od původního druhu *C. aethiops pygerythrus*. Prevalence *Blastocystis* sp. u jednotlivých druhů NHP dosahovala 71,4 % (*P. troglodytes*), 84,7 % (*C. guereza*) a 83,7 % (*C. aethiops pygerythrus*). Izoláty blastocyst spadaly do subtypů ST1, ST2, ST3 a ST5 s nejčastějším zastoupením subtypu ST1, který byl zároveň také jediným nalezeným u místních šimpanzů. Autoři studie se proto domnívají, že je tento subtyp schopen

kolovat mezi šimpanzi ve skupině a přednostně je kolonizovat oproti ostatním NHP. V této studii nebyly nalezeny žádné známky zoonotického přenosu.

Další studie Kalousová et al. (2014) provedená v Tanzánii se týkala oblasti Issa Valley v Ugalle. U šimpanze východního (*Pan troglodytes schweinfurthii*) byla zjištěna prevalence *Blastocystis* sp. 51,3 % z celkových 119 vzorků a k detekci byly použity pouze koproskopické metody. Obdobně ve studii Sá et al. (2013), kde se blastocysty objevily s velmi podobnou prevalencí u šimpanze hornoguinejského.

Nízká prevalence *Blastocystis* sp. byla pozorována u volně žijících šimpanzů čego (*Pan troglodytes troglodytes*) v jihovýchodním Kamerunu (Drakulovski et al., 2014), a to 2,9 % (25/114). Slabší výskyt blastocyst může být v této studii zkreslen podhodnocením z důvodu nevhodně zvolené metody detekce. Autoři zde využili koproskopické metody pro stanovení různých střevních parazitů, ale tato technika není vhodná pro diagnostikování blastocyst z důvodu velikosti cyst (Stensvold and Clark, 2016a).

Další práce na volně žijící populaci NHP v souvislosti s *Blastocystis* sp. byla prováděna u dvou druhů vřešťanů (*A. palliata*, *A. pigra*) z oblasti deštných pralesů jihovýchodního Mexika (Villanueva-Garcia et al., 2017). Vzorky byly především odebírány od sylvatických populací vřešťanů a celkem bylo získáno 255 vzorků trusu, a to 59 od *A. palliata* a 166 od *A. pigra*. Prevalence *Blastocystis* sp. byla zjištěna 39 % pro *A. palliata* a 38 % pro *A. pigra*. Nejfrekventovanějším subtypem byl ST2, zatímco subtypy ST1 a ST8 se vyskytovaly pouze ojediněle.

Také další studie (Helenbrook et al., 2015) se zaměřila na vřešťany pláštíkové (*Alouatta palliata*) z Biologické rezervace Bilsa v Ekvádoru, u kterých byl *Blastocystis* sp. identifikován s prevalencí 60,4 % (58/96). Analýze bylo podrobeno i několik lidí, kteří žili v blízkosti výskytu těchto opic. U všech pozitivních vzorků od NHP byl nalezen subtyp ST8, ale u sledovaných lidských dobrovolníků se tento subtyp nevyskytoval.

Velmi vysoký výskyt blastocyst byl popsán u makaků rhesus (*Macaca mulatta*) obývajících horské pásmo Qinling v Číně (Zhao et al., 2017). Jejich prevalence byla stanovena na 96,6 % (28/29). Do této studie byly zahrnuty i další vzorky od volně žijících NHP – malpa hnědá, hulman uzdičkový, mandril rýholící, langur čínský, kočkodan Brazzův, pavián pláštíkový, šimpanz učenlivý (*Cebus apella*, *Presbytis francoisi*, *Mandrillus sphinx*, *Hinopithecus roxellana*, *Cercopithecus neglectus*, *Papio hamadryas*, *Pan troglodytes*) a celková prevalence těchto NHP byla určena 75,6 %. Zajímavé je, že ve zmiňované studii byl nejčastěji nalezeným subtypem ST13, který byl jediným pozorovaným subtypem u langura čínského (37/46). K tomuto zjištění ovšem autoři nedodali žádné podrobnější informace.

V Nepálu byla provedena studie na makacích rhesus (*Macaca mulatta*), kteří přebývali u chrámu Svájambhú, tedy místě, kde docházelo k častému kontaktu s lidmi. Všechny analyzované vzorky byly pozitivní na *Blastocystis* sp. (10/10) s nejvyšším výskytem subtypu ST2. V této studii bylo také detekováno několik případů se směsnými infekcemi subtypů, s nejvyšším zastoupením ST1 a ST2. Výsledky poukázaly na možnost, že by makakové rhesus mohli být rezervoárem *Blastocystis* sp. ST2 pro obyvatele v Káthmándú (Yoshikawa et al., 2009). Vysoká prevalence tohoto prvoka u volně žijících makaků byla zaznamenána i v několika dalších studiích (Yoshikawa et al., 2009; Zhao et al., 2017). Proto je pravděpodobné, že je tento druh NHP nejspíše přirozeným hostitelem *Blastocystis* sp.

Výsledné prevalence *Blastocystis* sp. u volně žijících NHP mají poměrně rozsáhlé rozpětí. Tyto výsledky by mohly být ovlivněny různými faktory, jako je zeměpisná poloha, zvířecí druh, věk, období sběru vzorků, působení imunitního systému zvířete (Ma et al., 2020) a také použitá diagnostická metoda (Petrášová et al., 2011; Rudzińska et al., 2021).

7.2. Výskyt *Blastocystis* sp. u nehumánních primátů v zajetí

Průzkum výskytu *Blastocystis* sp. u NHP držených v zajetí je mnohem intenzivnější, než u volně žijících populací (shrnutí v Hublin et al., 2021). Prevalence *Blastocystis* sp. u primátů držených v zajetí se pohybuje od nuly do sta procent (Betts et al., 2020; Ma et al., 2020).

Dodnes byl *Blastocystis* sp. nalezen u více než 75 druhů nehumánních primátů (starosvětští a novosvětští) a poloopici držených v zajetí (shrnutí v Hublin et al., 2021). Průzkum výskytu blastocyst u NHP byl prováděn napříč 13 zeměmi a všemi kontinenty kromě Antarktidy (Abe et al., 2002; Yoshikawa et al., 2004a; Scicluna et al., 2006; Parkar et al., 2007, 2010; Rivera, 2008; Stensvold et al., 2009; Santín et al., 2011; Roberts et al., 2013; Zanzani et al., 2016; Cian et al., 2017; Valença-Barbosa et al., 2019; Li et al., 2019, 2020; Betts et al., 2020; Zhu et al., 2020; Ma et al., 2020; Oliveira-Arbex et al., 2020; Rudzińska et al., 2021; Köster et al., 2021). Pokud jde o genetickou diverzitu, bylo u NHP v zajetí nalezeno 13 různých subtypů (ST1-ST5, ST7-ST11, ST13, ST15, ST19) (shrnutí v Hublin et al., 2021) a podobně jako je to u lidí, nejčastěji vyskytovanými subtypy jsou ST1 až ST3 (Stensvold and Clark, 2016a; Cian et al., 2017; Betts et al., 2020). Udává se, že vyšší diverzita jednotlivých subtypů je častěji pozorována u primátů v zajetí, oproti volně žijícím. Důvodem by mohl být přenos od ošetřovatelů nebo jiných zvířat žijících v těsné blízkosti (Hublin et al., 2021). Podobně jako u lidí byly u NHP popsány směsné infekce více subtypů u jednoho nositele (Alfellani et al.,

2013a; Zanzani et al., 2016; Li et al., 2019; Valença-Barbosa et al., 2019). V současné době získávaná data naznačují, že infekce více subtypy u jednoho jedince zvířecího druhu je poměrně běžná (Cian et al., 2017; Betts et al., 2020). Kvůli přísným sanitačním postupům jsou podmínky přenosu blastocyst u primátů v zajetí poněkud komplikovanější, než jak je tomu ve volné přírodě (Li et al., 2020).

Jedna z prvních studií (Abe et al., 2002) zaměřených na detekci *Blastocystis* sp. u různých druhů zvířat v zajetí byla provedena v Tennoji zoo v Ósace. Zde bylo zahrnuto 13 druhů NHP (*Pongo pygmaeus*, *Pan troglodytes*, *Macaca* sp., *Cercopithecus* sp., *Mandrillus* sp., *Presbytis francoisi*, *Hylobates syndactylus*, *Varecia variegata*, *Cebus apella*), u kterých se podařilo určit prevalenci blastocyst 85 % (29/34). Několik izolátů bylo určeno jako subtyp ST1, ale většinu izolátů se nepovedlo zařadit do subtypů (Abe et al., 2003). Ve studii Yoshikawa et al. (2004a) se pokusili pomocí *sequence-tagged-site* (STS) PCR vyšetřit zbývající izoláty a některé se povedlo zařadit do subtypů ST1 a ST5. I přesto se tři izoláty od NHP nepodařilo určit. Důvodem může být špatně zvolená STS PCR, která není dostatečně citlivá a nedokáže rozlišit všechny známé subtypy (Stensvold, 2013).

Ve studii Parkar et al. (2007) byly vyšetřeny vzorky od devíti druhů NHP (*Papio hamdrys hamdrys*, *Varecia variegatus*, *Macaca nigra nigra*, *Colobus guereza*, *Pongo pygmaeus abelii*, *Lemur catta*, *Ateles geoffroyi*, *Cercopithecus aethiops*, *Nomascus leucogenys*) a jejich ošetřovatelů z Perth zoo v Austrálii. Přítomnost *Blastocystis* sp. byla zjištěna v 15 ze 17 vzorků (88 %) a ve všech přítomných druzích NHP. Nalezené izoláty byly dále zařazeny do subtypů ST1 a ST5. Ve stejné zoo proběhla následující studie (Parkar et al., 2010), kde bylo shromážděno 40 vzorků od 14 druhů NHP, z nichž se 50 % ukázalo být pozitivních pro *Blastocystis* sp. Zařazení vzorků se týkalo subtypů ST1 a ST2.

V Austrálii byla provedena další studie, ve které bylo ze dvou zařízení (*Sydney area veterinary practice*, *western New South Wales bush area*) odebráno několik vzorků trusu od pěti druhů NHP. *Blastocystis* sp. byl nalezen u všech druhů NHP, mezi kterými byl makak, šimpanz učenlivý, orangutan sumaterský, gorila západní a hulman uzdičkový (*Macaca* sp., *Pan troglodytes*, *Pongo abelii*, *Gorilla gorilla*, *Trachypithecus francoisi*), s prevalencí 86 % (32/37). Po subtypovém vyhodnocení byl v největším počtu vzorků zastoupen subtyp ST1, dále se podařilo detekovat i ST2, ST3 a ST11. Ve čtyřech vzorcích byly přítomné i směsné infekce subtypů, konkrétně ST1 a ST11 (Roberts et al., 2013).

K další detekci blastocyst došlo po obdržení vzorků od NHP z výzkumných zařízení v Dánsku (*National Veterinary Institut, Technical University*) a Velké Británii (*Diagnostic Parasitology Laboratory, London School of Hygiene and Tropical Medicine*) (Stensvold et al.,

2009). Analýze bylo podrobeno 70 vzorků od NHP a *Blastocystis* sp. byl nalezen s nejvyšší prevalencí subtypu ST3 (33 %). Po tomto subtypu byly nalezeny i subtypy ST8, ST2, ST5, ST1, ST4 a ST10 s již poněkud nižšími prevalencemi.

K rozsáhlejší analýze vzorků od 30 druhů NHP došlo ve studii Alfellani et al. (2013a), kde bylo získáno 317 vzorků trusu z několika institucí ve Velké Británii, Francie, Nizozemska, Německa a Itálie. Do analýzy bylo započteno i několik vzorků od volně žijících primátů z Maroka a ostrova Svatého Kryštofa, které ovšem autoři neoddělili od NHP v zajetí. *Blastocystis* sp. byl nalezen u 260 vzorků a nejvyšší prevalence opět dosahoval subtyp ST3 (34 %). Po něm následovaly další nejčastěji detekované subtypy ST1 (27 %), ST2 (22 %) a dále už subtypy s nižším výskytem – ST4, ST5, ST8, ST13 a ST15. V této studii se u 20 izolátů vyskytoval více než jeden subtyp. Tyto směsné infekce byly reprezentovány zastoupením subtypů ST1, ST2 a ST3. Udává se, že výskyt směsných infekcí subtypů je značně podceněn (Scanlan et al., 2015). Ačkoliv by právě detekce těchto směsných infekcí mohla prokázat možný zoonotický přenos (Skotarczak, 2018).

Studie z Velké Británie se zaměřila na výskyt střevních prvoků (*Blastocystis* sp., *Eimeria* sp., *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* sp., *Entamoeba* sp.) u různých druhů zvířat ze zoo v Canterbury (Howletts Wild Animal park). *Blastocystis* sp. byl u NHP detekován s prevalencí 63 % (27/43) a s nejčastějším výskytem subtypů ST1 a ST2. U deseti vzorků představujících dva druhy NHP – gorila nížinná západní a gibbon stříbrný (*Gorilla gorilla gorilla*, *Hylobates moloch*) byl zaznamenán výskyt *Blastocystis* sp. někdy společně i s dalšími střevními prvoky (*Eimeria* sp., *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* sp., *Entamoeba* sp.). Ačkoliv tito primáti byli kolonizováni i více střevními prvoky, nebyly u nich zaznamenány žádné gastrointestinální symptomy. Tyto výsledky tedy naznačují, že výskyt střevních prvoků je poměrně běžný u populací NHP držených v zajetí (Betts et al., 2020).

Ve Francii byly ve studii Cian et al. (2017) zahrnuty dvě zoologické zahrady (*La Palmyre Zoo*, *The Lille Zoo*), které dodaly 73 vzorků trusu od 39 druhů NHP zahrnující úzkonosé, ploskonosé opice a poloopice. *Blastocystis* sp. byl detekován s prevalencí 60,3 % a byl nalezen u 23 druhů NHP. Subtyp ST1 byl zaznamenán u nejvyššího počtu vzorků (31,2 %). S již nižšími prevalencemi následovaly subtypy ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST8 a ST15. V práci je zmíněna možnost, že vysoký výskyt blastocyst u NHP může indikovat primáty jako hlavní rezervoár pro lidské infekce. Zde se jednalo především o subtypy ST1, ST2 a ST3.

Ve Španělsku proběhla studie Santín et al. (2011), kde u několika druhů NHP (*Haplemur aureus*, *Cercopithecus hamlyni*, *Lemur catta*, *Mandrillus leucophaeus*, *Gorilla*

gorilla, *Cercocebus* sp.) byl nalezen *Blastocystis* sp. s nejčastěji rozšířenými subtypy ST1-ST4, s nejvyšším zastoupením ST3.

Další studie Köster et al. (2021) ze Španělska získala vzorky od deseti druhů NHP (*Cebuella pygmaea*, *Cercocebus lunulatus*, *Cercopithecus neglectus*, *Eulemur fulvus*, *Hylobates leucogenys*, *Lemur catta*, *Macaca sylvanus*, *Mandrillus leucophaeus*, *Saimiri sciureus*, *Varecia variegata variegata*) a jejich ošetřovatelů z Córdoba zoo. Prevalence *Blastocystis* sp. u NHP byla určena 45,1 % (23/51) a všechny pozitivní izoláty byly přiřazeny k subtypům ST1, ST3 a ST8. Autoři zde zmínili také vysokou možnost přenosu subtypu ST1 mezi NHP a jejich ošetřovateli.

Vyšetření na *Blastocystis* sp. v polské Gdaňsk zoo se týkalo 11 druhů NHP, včetně dvou lidoopů (*Pongo pygmaeus*, *Pan troglodytes*). Celková prevalence blastocyst u NHP dosahovala 58,97 % a subtyp ST2 byl nalezen u největšího počtu vzorků (7/23). Následovaly subtypy ST3 (6/23), ST13 (6/23) a ST1 (4/23). V této studii byla také naznačena možnost zoonotického přenosu mezi NHP a jejich ošetřovateli (Rudzińska et al., 2021).

Z čínských záchranných stanic bylo shromážděno 443 vzorků od makaků jávských (*Macaca fascicularis*), které byly vyšetřeny na různé střevní parazity. *Blastocystis* sp. byl zde stanoven s prevalencí 87,63 % a bylo zaznamenáno několik subtypů (ST1, ST2, ST3, ST5 a ST7), s nejvyšší prevalencí ST2 (77,5 %) a ST1 (63,5 %) (Zanzani et al., 2016).

V čínské provincii Che-pej bylo ze Shijiazhuang zoo získáno 185 vzorků od 12 druhů NHP. Pomocí molekulární diagnostiky bylo možné detekovat *Blastocystis* sp. u 61 vzorků s celkovou prevalencí 32,97 %. Izoláty byly nejčastěji zařazeny do subtypů ST1 a ST2, zatímco subtypy ST3, ST5 a ST9 byly identifikovány pouze sporadicky (Ma et al., 2020).

Autoři studie Li et al. (2020) zaměřené na studium *Blastocystis* sp. u tří druhů makaků (*M. mulatta*, *M. fascicularis*, *M. leonina*) v čínské provincii Jün-nan zjistili prevalenci 46,5 % (235/505) a na základě sekvencí určili tři nejčastěji se vyskytující subtypy, a to ST1, ST3 a ST5, které mají zoonotický potenciál. Nejvyšší prevalence dosahoval subtyp ST3. Autoři zdůrazňují možnost, že makakové mohou být považováni za rezervoáry infekce *Blastocystis* sp. s možností zoonotického přenosu.

Další studie provedená v Asii se týkala sběru vzorků trusu z Národní bangladéšské zoo v Dháce (Li et al., 2019). Od různých druhů NHP – makak rhesus, kočkodan červenozelený, hulman nilgířský, pavián pláštík, hulman šedý nepálský, makak indočínský (*Macaca mulatta*, *Chlorocebus pygerythrus*, *Trachypithecus johnii*, *Papio hamadryas*, *Semnopithecus schistaceus*, *Macaca leonina*) bylo získáno 85 vzorků trusu a celková prevalence *Blastocystis* sp. dosahovala 31,8 %. Blastocysty byly nalezeny u čtyř druhů NHP s prevalencemi 32,3 %

(*Macaca mulatta*), 42,9 % (*Chlorocebus pygerythrus*), 60 % (*Trachypithecus johnii*), 50 % (*Semnopithecus schistaceus*). Subtyp ST3 byl nalezen v nejvyšším počtu vzorků NHP s prevalencí 48,15 % (13/27). Další subtypy byly určeny jako ST1, ST2 a ST13. V této studii byla prokázána vysoká míra infekce *Blastocystis* sp. u NHP, což naznačuje běžný výskyt tohoto prvoka u primátů v zajetí.

Analýza vzorků trusu od NHP byla provedena také v Brazílii (Valença-Barbosa et al., 2019). Ze dvou institucí (Rio Zoo, Institute of Biomedical Science and Technology) nacházejících se v Rio de Janeiro bylo získáno 89 vzorků od 15 druhů NHP zahrnující lidoopy, ploskonosé a úzkonosé opice. Z toho se ukázalo být 33 vzorků pozitivních s prevalencí 37 % a tyto izoláty byly zařazeny do subtypů ST1-ST3 a ST8, s dominancí subtypu ST2.

Jiná brazilská studie (Oliveira-Arbex et al., 2020) se zaměřila opět na detekci *Blastocystis* sp. u různých druhů zvířat držených v zajetí. Vzorky trusu byly obdrženy ze dvou zařízení (The Bauru City Zoological Park, The Center for the Conservation of Wild Fauna), kde nejvíce vzorků bylo sesbíráno od NHP (*Alouatta* sp., *Ateles* sp., *Callicebus nigrifrons*, *Callithrix* sp., *Cebus apella*, *Lagothrix lagotricha*, *Leontopithecus* sp., *Mandrillus sphinx*, *Papio* sp., *Saguinus* sp.). Celkem 29 vzorků od NHP bylo podrobeno molekulární a fylogenetické analýze a byla zde nalezena poměrně nízká prevalence – 10,3 %. Nejvyšší prevalence dosahovaly subtypy ST3 a ST8, ST2 se vyskytoval méně.

Možný negativní dopad *Blastocystis* sp. byl zmíněn v některých studiích na primátech držených v zajetí, konkrétně u makaků jávských a vepřích (*Macaca fascicularis*, *Macaca nemestrina*). U těchto primátů byly popsány symptomy jako je bolest břicha a chronický průjem (McClure et al., 1980; Zanzani et al., 2014). Ani v jedné studii se nepodařilo určit subtypy, nicméně je zde jistá možnost, že byli tyto NHP kolonizováni potenciálně patogenním subtypem. Například v nedávné studii byl odhalen negativní efekt subtypu ST7 (Yason et al., 2019). Ve studii Zanzani et al. (2014) se také přiklání k názoru, že se symptomy u NHP mohly projevit kvůli stresu z přesunu zvířat ve výzkumném centru.

7.3. Zoonotický potenciál *Blastocystis* sp.

Přenos střevního prvoka *Blastocystis* sp. mezi jedinci se děje pravděpodobně fekálně-orální cestou (Yoshikawa et al., 2004b). K přenosu může docházet také kontaminovanou vodou, nebo potravou (Leelayoova et al., 2004, 2008; Lee et al., 2012). V případě blastocyst zřejmě často dochází k mezidruhovým přenosům včetně zoonotického, dle výsledků epidemiologických studií (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016a). Vyhodnocení

přenosu blastocyst mezi lidmi a zvířaty je možné na základě sledování diverzity subtypů s využitím molekulárních metod v rámci dané studie (Petrášová et al., 2011; Lhotská et al., 2020; Köster et al., 2021).

Subtypy *Blastocystis* sp. vykazují většinou určitou hostitelskou specifitu, která je ovšem u jednotlivých subtypů značně variabilní (Stensvold et al., 2020). U některých subtypů byla nalezena nízká hostitelská specifita, například ST1-ST8, ST11-ST13 (Stensvold et al., 2009; Alfellani et al., 2013c, 2013a; Roberts et al., 2013). Subtypy, které se objevují u člověka pouze sporadicky - ST5-ST8, ST12 (Stensvold and Clark, 2016a; Jiménez et al., 2019), by mohly být výsledkem zoonotického přenosu (Stensvold and Clark, 2016a). Proto jsou některé zvířecí druhy označovány jako hlavní možné zdroje pro přenos *Blastocystis* sp. mezi lidmi a zvířaty (Wang et al., 2014b; Li et al., 2020; Mohammadpour et al., 2020). Pro zhodnocení zoonotického přenosu je důležité vyhodnotit nejen zastoupení jednotlivých subtypů, ale vyšetřit i intra-subtypovou diverzitu na základě alel (Alfellani et al., 2013c).

Zoonotický přenos mezi lidmi a NHP zůstává stále otevřenou otázkou, neboť žádná ze studií o něm doposud nenašla jednoznačný důkaz (Parker et al., 2007, 2010; Stensvold et al., 2009; Yoshikawa et al., 2009; Helenbrook et al., 2015; Ma et al., 2020). V jedné z prvních studií na výskyt *Blastocystis* sp. u různých druhů zvířat nedokázali autoři (Abe et al., 2003) nalézt dostatečný důkaz o zoonotickém přenosu mezi NHP a lidmi. V následující roce (Abe, 2004) byla provedena nová analýza vzorků z předchozí studie ještě s dalšími nově získanými vzorky od dobrovolníků z Japonska a částečně se podařil stanovit zoonotický potenciál mezi NHP a člověkem.

Při detekci blastocyst v provincii Rizal na Filipínách byl nalezen subtyp ST1 u jednoho ošetřovatele a zároveň u NHP, o které se tento ošetřovatel staral. Izolát od ošetřovatele vykazoval 99 % shodu s izoláty od NHP. Po zadání sekvence do BLAST domény byl tento izolát shledán homologním s již dříve nalezeným izolátem ze studie Abe (2004). Toto zjištění posiluje domněnku, že blízký kontakt mezi lidmi a NHP může usnadnit přenos *Blastocystis* sp. (Rivera, 2008).

První domněnka o zoonotickém přenosu v zoologické zahradě se objevila již v roce 2007 (Parker et al., 2007). Autoři této studie stanovili výskyt *Blastocystis* sp. u devíti druhů NHP a jejich ošetřovatelů z Perth zoo v Austrálii. Nejčastěji diagnostikovaný subtyp byl ST1 a zhodnocením sekvence byla zjištěna vysoká podobnost u primátů i ošetřovatelů. Autoři se domnívají, že zde mohlo dojít k přenosu mezi NHP a ošetřovatelem. Tuto myšlenku podpořila i vysoká prevalence (100 %) *Blastocystis* sp. u ošetřovatelů. O několik let později došlo k navazující studii Parker et al. (2010), ve které byl u ošetřovatelů a primátů nalezen stejný

subtyp ST1. Dokonce zde byla stanovena podobnost mezi jejich alelami subtypu ST1, která indikuje možnou zoonózu.

Autoři další studie Stensvold et al. (2009) objevili neobvyklý subtyp ST8 u ošetřovatelů z Velké Británie a tento subtyp byl u nich druhým nejčastěji zastoupeným s prevalencí 25 %. Tento případ je zajímavý z toho důvodu, že se tento subtyp u lidí nachází jen sporadicky, ačkoliv u NHP je relativně běžný. Přesto je výskyt tohoto subtypu poměrně rozšířený u ošetřovatelů ze zoologických zahrad a spekuluje se o možnosti zoonotického přenosu z primáta na člověka.

U volně žijících makaků rhesus a dětí z Nepálu byl nalezen stejný subtyp ST2. Autoři se domnívají, že by na společný výskyt *Blastocystis* sp. mohl mít vliv zoonotický přenos mezi lidmi a NHP (Yoshikawa et al., 2009), vezmou-li se v potaz nižší hygienické standardy v dané oblasti a v dané skupině lidí (=děti).

Během shromažďování dat ve studii Alfellani et al. (2013a) byly objeveny alely č. 2 a 6 subtypu ST1 u ošetřovatelů, které se u lidí vyskytují pouze ojediněle. Autoři se přiklání k názoru, že jde opět o výsledek zoonotického přenosu z NHP na ošetřovatele.

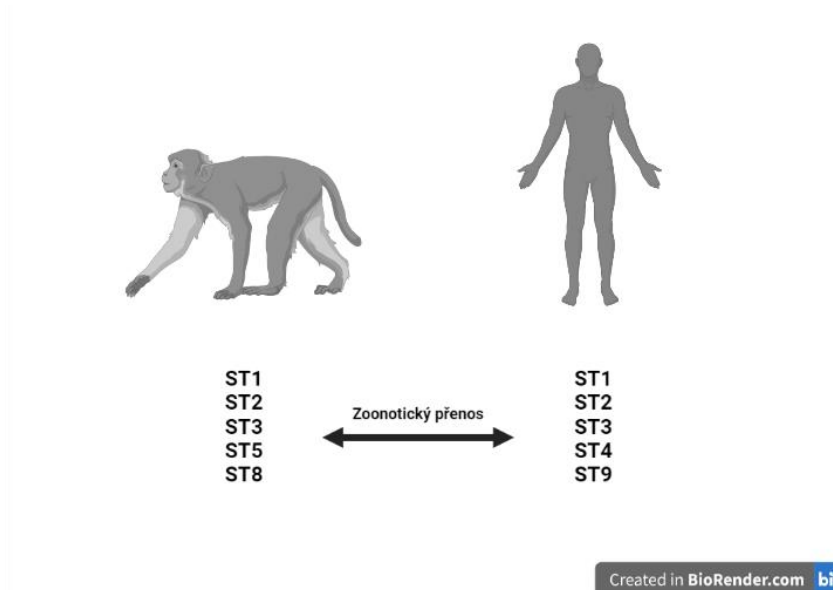
V Brazílii proběhlo vyšetření na *Blastocystis* sp. u několika druhů NHP – vřešťan rezavý, pavián plástíkový, pavián guinejský (*Alouatta seniculus*, *Papio hamadryas*, *Papio papio*). U tří primátů a jednoho ošetřovatele se podařily zachytit identické izoláty. Navzdory tomu, že ošetřovatel a primáti přebývali v odlišných zařízeních, záchyt identických izolátů zvyšuje možnost zoonotického přenosu (Oliveira-Arbex et al., 2020).

Ve studii provedené ve španělské Cordóba zoo je popsán nález alely č. 1 a 2 subtypu ST1 u několika druhů NHP (*Cercocebus lunulatus*, *Mandrillus leucophaeus*, *Hylobates leucogenys*, *Cercopithecus neglects*) a jejich ošetřovatele. Tento ošetřovatel se o zmíněné primáty staral a byl s nimi v blízkém kontaktu. Protože detekce dvou různých alel v jednom vzorku je velmi neobvyklá, autoři usuzují na první signifikantní důkaz o zoonotickém přenosu z primáta na člověka (Köster et al., 2021).

K detekci identických izolátů subtypu ST1 došlo u dvou mandrilů rýholících, jednoho kočkodana husarského (*Mandrillus sphinx*, *Erythrocebus patas*) a jejich ošetřovatele v polské Gdaňsk zoo. Zajímavým zjištěním bylo, že výběhy těchto NHP spolu nesousedily a ani mezi nimi neproběhl žádný kontakt. Z toho důvodu autoři usuzují, že k přenosu *Blastocystis* sp. došlo prostřednictvím ošetřovatele, který měl oba druhy NHP v péči (Rudzińska et al., 2021).

Ačkoli lidé a nehumánní primáti spolu sdílí devět subtypů, otázka zoonotického přenosu zůstává stále otevřená. Vyšší prevalence *Blastocystis* sp. jsou zpravidla nalézány u majitelů

zvířat (Stensvold et al., 2009; Wang et al., 2014b; Lhotská et al., 2020). Pokud jsou člověk a primát v kontaktu (např. zoologická zahrada) nebo žijí v bezprostřední blízkosti a jsou u nich detekovány identické subtypy, je zde jistá možnost zoonotického přenosu (Stensvold et al., 2009; Yoshikawa et al., 2009; Ma et al., 2020; Köster et al., 2021). Ačkoliv v některých studiích byly nalezeny stejné subtypy u lidí a nehumánních primátů, pozdější vyšetření je určilo jako geneticky odlišné (Petrášová et al., 2011). Z toho důvodu by se následující studie měly zaměřit na detailnější vyhodnocení zoonotického potenciálu pomocí identických alel určitého subtypu. Přehled subtypů *Blastocystis* sp., které spolu mohou lidé a primáti sdílet, je shrnut na obrázku 8.



Obr. 8: Typický výskyt jednotlivých subtypů u NHP a lidí, které mohou hrát roli v zoonotickém přenosu *Blastocystis* sp.

8. Experimentální část

Současně s vypracováním mé rešeršní bakalářské práce probíhá experimentální část v laboratoři Parazitární terapie na Parazitologickém ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích. Moje laboratorní praxe se týká zjištění výskytu *Blastocystis* sp. u primátů v zajetí včetně jejich ošetřovatelů. Pomocí koproskopických a molekulárně-diagnostických postupů se pokusím v mé navazující magisterské práci vyhodnotit prevalenci *Blastocystis* sp. u primátů a jejich ošetřovatelů z českých zoologických zahrad. Následně zhodnotím možný zoonotický přenos mezi primáty v zajetí a jejich ošetřovateli.

8.1. Materiál a metodika

8.1.1. Získávání vzorků

Vzorky byly, a ještě budou získány ze zoologických zahrad, a to od nehumánních primátů a jejich ošetřovatelů – Zoopark Na Hrádečku, Zoo Hodonín, Zoo Děčín, Zoo Olomouc, Zoo Brno. Ošetřovatelé vyplnili dotazník, který obsahoval otázky ohledně cestování, věku, užívání léků, specializace ošetřovatele a druhů primátů v péči. Všechna data jsou striktně anonymizována a zpracována dle zákona č. 101/2000 Sb. O ochraně osobních údajů. Naše studie byla také posouzena jako eticky přípustná a odpovídající rozsahu Etické komise Biologického centra AV ČR v. v. i. v Českých Budějovicích.

8.1.2. Diagnostické metody

Ze zoologických zahrad jsme obdrželi čerstvé vzorky trusu a stolice. Následující den byly všechny vzorky vyšetřeny pomocí koproskopických koncentračních technik, tzn. flotací a *Merthiolate-Iodine-Formaldehyde* (MIF) sedimentací. Zbytek všech vzorků exkrementů je uchováván při teplotě -20°C. V současné chvíli probíhá izolace celkové DNA ze vzorků.

Flotace

Exkrement byl rozmíchán v třetí misce společně s kohoutkovou vodou a homogenát byl následně přefiltrován do zkumavek jak pro flotaci, tak pro MIF sedimentaci. V případě flotace, nejdříve proběhlo odstředění při 3 min./2000 ot. Poté byl odstraněn supernatant tak, že v každé zkumavce zůstal na dně sediment. Zbýlý pelet byl rozmíchán v Sheatherově cukerném roztoku

(1, 33). Zkumavky byly znovu odstředěny při 3 min./2000 ot. Pomocí světelné mikroskopie byl každý vzorek vyhodnocen na přítomnost střevních parazitů (více viz. kapitola 5.1.1.1.).

Sedimentace

Vzorky byly také vyšetřeny pomocí MIF sedimentace. Do 15ml zkumavky bylo ke homogenátu přidáno 5 ml etheru a 5 ml MIF roztoku. Vše bylo odstředěno při 3 min./2000 ot. Nakonec byl odstraněn supernatant a zbylý sediment byl následně přenesen na podložní sklíčko pomocí plastové Pasteurovy pipety. Vzorek byl nabarven využitím Lugolova roztoku a poté mikroskopicky vyšetřen (více viz. kapitola 5.1.1.2.).

8.2. Průběžné výsledky

Dosud bylo celkem získáno 167 vzorků. Z toho 147 od 31 druhů NHP a 17 vzorků od ošetřovatelů z pěti zoologických zahrad – Zoopark Na Hrádečku, Zoo Hodonín, Zoo Děčín, Zoo Olomouc, Zoo Brno. Tyto vzorky byly vyšetřeny pomocí flotace a MIF sedimentace. Obdržené vzorky pocházejí od následujících druhů NHP: dželada (*Theropithecus gelada*), gibbon (*Hylobates* sp.), gueréza angolská (*Colobus angolensis*), chápan středoamerický mexický (*Ateles geoffroyi vellerosus*), kalimiko (*Callimico goeldii*), kočkodan (*Cercopithecus* sp.), kosman (*Callithrix* sp.), kotul veverovitý (*Saimiri sciureus*), lemur (*Lemur* sp.), lvíček zlatý (*Leontopithecus rosalia*), makak (*Macaca* sp.), mangabej černý (*Lophocebus aterrimus*), pavián anubi (*Papio anubis*), siamang (*Symphalangus syndactylus*), šimpanz učenlivý (*Pan troglodytes*), tamarín (*Saguinus* sp.), vari (*Varecia* sp.).

Momentálně očekáváme další vzorky ze Safari parku Dvůr Králové a pracuji na izolaci celkové DNA z dosavadních vzorků.

Všechny vzorky DNA budou následně analyzovány pomocí *Real-Time* PCR pro zjištění přítomnosti *Blastocystis* sp. dle publikovaného protokolu (Stensvold et al., 2012a). Pozitivní vzorky budou dále vyšetřeny pomocí konvenčního PCR (Scicluna et al., 2006). Na základě získaných sekvencí ze Sangerova sekvenování bude možné zhodnotit zastoupení jednotlivých subtypů a také možnost zoonotického potenciálu. Tyto výsledky budou kompletně shrnuty v mé magisterské práci.

9. Závěr

V současné době je *Blastocystis* sp. a jeho kolonizace spjata především se zdravou populací a v mnoha studiích se hojně debatuje o jeho prospěšném působení na střevní mikrobiom. Tato myšlenka je podpořena také z důvodu, že se jedná o striktně anaerobního prvoka. Nicméně stále se objevují studie, které blastocystu spojují s gastrointestinálním onemocněním. Některé subtypy *Blastocystis* sp. byly uvedeny jako potenciálně patogenní. Možnost zoonotického přenosu byla zaznamenána v zoologických zahradách, kde se blastocysty mohou přenášet mezi zvířaty a jejich ošetřovateli. U nehumánních primátů byl výskyt *Blastocystis* sp. odhalen častěji, a právě primáti jsou považováni za rezervoár blastocyst pro člověka.

Co se týče diagnostiky *Blastocystis* sp., v současné době se jako nejvhodnější jeví *Real-Time* PCR. Touto metodou je vyšetřováno velké množství vzorků a obecně se doporučuje ji zařadit do rutinní diagnostiky *Blastocystis* sp.

V rámci dílčího cíle zaměřeného na rešerši o výskytu *Blastocystis* sp. u primátů v zajetí jsem zjistila, že blastocysty jsou častěji detekovány u mnoha druhů NHP držených v zajetí oproti volně žijícím primátům. Nejvyšší prevalence dosahovaly subtypy ST1, ST2 a ST3. Další často detekované subtypy spadaly do ST8 a ST5. Subtypy ST4, ST7, ST9, ST10, ST11, ST13, ST15 a ST19 se vyskytovaly u NHP v zajetí většinou zřídka. V některých studiích také zaznamenali směsné infekce subtypů u NHP.

V dalším dílím cíli mojí bakalářské práce byly shrnuty poznatky o zoonotickém přenosu mezi NHP a ošetřovateli v zajetí. Zároveň byly stanoveny faktory, za kterých by mohl zoonotický přenos *Blastocystis* sp. probíhat. Mezi tyto faktory se řadí sdílení společných lokalit, kontaminace vody a potravy, čištění klecí a výběhů a také blízký vztah ošetřovatele s NHP. Právě u NHP v zajetí a jejich ošetřovateli byla odhalena nejvyšší možnost zoonotického přenosu. Nejčastější subtypy spojené se zoonotickým přenosem byly určeny jako ST1, ST2 a ST3. Zoonotický přenos *Blastocystis* sp. se zdá být možný také u neobvyklých subtypů ST8 a ST5, které byly detekovány u ošetřovatelů.

10. Seznam citované literatury

- Abe, N. (2004). Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet. Parasitol.* 120: 235–242.
- Abe, N., Nagoshi, M., Takami, K., Sawano, Y., and Yoshikawa, H. (2002). A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet. Parasitol.* 106: 203–212.
- Abe, N., Wu, Z., and Yoshikawa, H. (2003). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. *Vet. Parasitol.* 113: 321–325.
- Adao, D. E. V., Dela Serna, A. O., Belleza, M. L. B., Bolo, N. R., and Rivera, W. L. (2016). Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from asymptomatic individuals in an urban community in the Philippines. *Ann. Parasitol.* 62: 193–200.
- Ajjampur, S. S. R., and Tan, K. S. W. (2016). Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol. Int.* 65: 772–779.
- Alexeieff, A. (1911). “Sur la nature des formations dites ‘kystes de *Trichomonas intestinalis*’”. *CR Soc Biol.* 71: 296–298.
- Alfellani, M. A., Jacob, A. S., Perea, N. O., Krecek, R. C., Taner-Mulla, D., Verweij, J. J., et al. (2013a). Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology* 140: 966–971.
- Alfellani, M. A., Stensvold, C. R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E. S. U., Fagbenro-Beyioku, A. F., and Clark, C. G. (2013b). Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 126: 11–18.
- Alfellani, M. A., Taner-Mulla, D., Jacob, A. S., Imeede, C. A., Yoshikawa, H., Stensvold, C. R., et al. (2013c). Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 164: 497–509.
- Andersen, L. O. B., Bonde, I., Nielsen, H. B. H. B., and Stensvold, C. R. (2015). A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91: 1–9.

- Andersen, L. O. brie., and Stensvold, C. R. (2016). *Blastocystis* in health and disease: Are we moving from a clinical to a public health perspective? *J. Clin. Microbiol.* 54: 524–528.
- Arisue, N., Hashimoto, T., Yoshikawa, H., Nakamura, Y., Nakamura, G., Nakamura, F., et al. (2002). Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of *Stramenopiles* inferred from multiple molecular sequence data. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 42–53.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Yamada, T., Mende, D. R., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174–180.
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., Blastocystis Investigation Group, Loywick, A., Merlin, S., et al. (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci. Rep.* 6: 25255.
- Barret, H. P. (1921). A method for the cultivation of *Blastocystis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 15: 113–116.
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E. M. S., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C. J. A., van Vugt, M., et al. (2013). Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect. Dis.* 13: 2–7.
- Betts, E. L., Gentekaki, E., and Tsaousis, A. D. (2020). Exploring micro-eukaryotic diversity in the gut: Co-occurrence of *Blastocystis* subtypes and other protists in zoo animals. *Front. Microbiol.* 11: 288.
- Billy, V., Lhotská, Z., Jirků, M., Kadlecová, O., Frgelecová, L., Parfrey, L. W., et al. (2021). *Blastocystis* colonization alters the gut microbiome and, in some cases, promotes faster recovery from induced colitis. *Front. Microbiol.* 12: 641483.
- Boeck, W. C., and Drbohlav, J. (1925). The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.* 5: 371–407.
- Brumpt, E. (1912). “*Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines”. *Bull. Exot. Pathol. Soc.* 5: 725–730.
- Burrows, R. B. (1965). Microscopic diagnosis of the parasites of man. USA. Hartford: Connecticut Printers, Inc., 328 p.

- Byndloss, M. X., Olsan, E. E., Rivera-Chávez, F., Tiffany, C. R., Cevallos, S. A., Lokken, K. L., et al. (2017). Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic *Enterobacteriaceae* expansion. *Science* (80-.). 357: 570–575.
- Casero, R. D., Mongi, F., Sánchez, A., and Ramírez, J. D. (2015). *Blastocystis* and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta Trop.* 148: 156–161.
- Chabé, M., Lokmer, A., and Ségurel, L. (2017). Gut protozoa: Friends or foes of the human gut microbiota? *Trends Parasitol.* 33: 925–934.
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., et al. (2017). Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS One* 12: e0169659.
- Cinek, O., Polackova, K., Odeh, R., Alassaf, A., Kramná, L., Ibekwe, M. A. U., et al. (2021). *Blastocystis* in the faeces of children from six distant countries: prevalence, quantity, subtypes and the relation to the gut bacteriome. *Parasites and Vectors* 14: 399.
- Clark, C. G. (1997). Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87: 79–83.
- Clark, C. G., and Diamond, L. S. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 329–341.
- Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A., and Stensvold, C. R. (2013). Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in Parasitology.* 82: 1-32.
- Clemente, J. C., Manasson, J., and Scher, J. U. (2018). The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ* 360: j5145.
- Costea, P. I., Hildebrand, F., Manimozhiyan, A., Bäckhed, F., Blaser, M. J., Bushman, F. D., et al. (2018). Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* 3: 8–16.
- De Filippo, C., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Albanese, D., Pieraccini, G., Banci, E., et al. (2017). Diet, environments, and gut microbiota. A preliminary investigation in children living in rural and Urban Burkina Faso and Italy. *Front. Microbiol.* 8: 1979.

- Defaye, M., Nourrisson, C., Baudu, E., Lashermes, A., Meynier, M., Meleine, M., et al. (2020). Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically *Blastocystis*-infected rats. *Sci. Rep.* 10: 9146.
- Deng, L., Wojciech, L., Gascoigne, N. R. J., Peng, G., and Tan, K. S. W. (2021). New insights into the interactions between *Blastocystis*, the gut microbiota, and host immunity. *PLoS Pathog.* 17: e1009253.
- Denoeud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., et al. (2011). Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 12: R29.
- Drakulovski, P., Bertout, S., Locatelli, S., Butel, C., Pion, S., Mpoudi-Ngole, E., et al. (2014). Assessment of gastrointestinal parasites in wild chimpanzees (*Pan troglodytes troglodytes*) in southeast Cameroon. *Parasitol. Res.* 113: 2541–2550.
- Dunn, L. A., Boreham, P. F. L., and Stenzel, D. J. (1989). Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *Int. J. Parasitol.* 19: 43–56.
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., et al. (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 Infect. Dis.* 16: 451.
- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., et al. (2014). Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis.* 14: 164.
- Forsell, J., Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Johansson, A., Evengård, B., and Granlund, M. (2017). The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC Microbiol.* 17: 231.
- Gentekaki, E., Curtis, B. A., Stairs, C. W., Klimeš, V., Eliáš, M., Salas-Leiva, D. E., et al. (2017). Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Pathog.* 15: e2003769.
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., and Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nat. Med.* 24: 392–400.

- Govind, S. K., Khairul, A. A., and Smith, H. V. (2002). Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. *Trends Parasitol.* 18: 528.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., et al. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 21: 494–504.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., and DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270: 313–321.
- Helenbrook, W. D., Shields, W. M., and Whipps, C. M. (2015). Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*, living in close proximity to one another. *Parasitol. Res.* 114: 2517–2525.
- Ho, L. C., Singh, M., Suresh, G., Ng, G. C., and Yap, E. H. (1993). Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol Res* 79: 614–616.
- Hublin, J. S. Y., Maloney, J. G., and Santin, M. (2021). *Blastocystis* in domesticated and wild mammals and birds. *Res. Vet. Sci.* 135: 260–282.
- Hussein, E. M., Hussein, A. M., Eida, M. M., and Atwa, M. M. (2008). Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol. Res.* 102: 853–860.
- Inkpen, S. A. (2019). Health, ecology and the microbiome. *Elife* 8: 8–11.
- Jeremiah, S., and Parija, S. (2013). *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop. Parasitol.* 3: 17.
- Jimenez-Gonzalez, D. E., Martinez-Flores, W. A., Reyes-Gordillo, J., Ramirez-Miranda, M. E., Sara Arroyo-Escalante, Romero-Valdovinos, M., et al. (2012). *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol. Res.* 110: 1269–1275.
- Jiménez, P. A., Jaimes, J. E., and Ramírez, J. D. (2019). A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. *Parasit. Vectors* 12: 376.

- Kalousová, B., Piel, A. K., Pomajbíková, K., Modrý, D., Stewart, F. A., and Petrželková, K. J. (2014). Gastrointestinal Parasites of Savanna Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Ugalla, Tanzania. *Int. J. Primatol.* 35: 463–475.
- Köster, P. C., Dashti, A., Bailo, B., Muadica, A. S., Maloney, J. G., Chicharro, C., et al. (2021). Occurrence and genetic diversity of protist parasites in captive. *Animals* 11: 700.
- Kostka, M., Cepicka, I., Hampl, V., and Flegel, J. (2007). Phylogenetic position of *Karotomorpha* and paraphyly of *Proteromonadidae*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43: 1167–1170.
- Krogsgaard, L. R., Andersen, L. O. B., Johannesen, T. B., Engsbø, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V., et al. (2018). Characteristics of the bacterial microbiome in association with common intestinal parasites in irritable bowel syndrome. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 9:161.
- Krogsgaard, L. R., Engsbø, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V., and Bytzer, P. (2015). The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: A population-based case-control study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 507–513.
- Laforest-Lapointe, I., and Arrieta, M.-C. (2018). Microbial eukaryotes: a missing link in gut microbiome studies. *mSystems* 3: e00201.
- Lee, L. I., Chye, T. T., Karmacharya, B. M., and Govind, S. K. (2012). *Blastocystis* sp.: Waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasites and Vectors* 5: 130.
- Leelayoova, S., Taamasri, P., Rangsin, R., Naaglor, T., Thathaisong, U., Mungthin, M. (2002). *In-vitro* cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 96: 803–807.
- Leelayoova, S., Rangsin, R., Taamasri, P., Naaglor, T., Thathaisong, U., and Mungthin, M. (2004). Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70: 658–662.

- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj, P., et al. (2008). Drinking water: A possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79: 401–406.
- Lhotská, Z. (2016). Axenizace buně k střevního prvoka rodu *Blastocystis*. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice.
- Lhotská, Z., Jirků, M., Hložková, O., Brožová, K., Jirsová, D., Stensvold, C. R., et al. (2020). A study on the prevalence and subtype diversity of the intestinal protist *Blastocystis* sp. in a gut-healthy human population in the Czech Republic. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10: 544335.
- Li, J., Deng, T., Li, X., Cao, G., Li, X., and Yan, Y. (2013). A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitol. Res.* 112: 3537–3541.
- Li, J., Karim, M. R., Li, D., Rahaman Sumon, S. M. M., Siddiki, S. H. M. F., Rume, F. I., et al. (2019). Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wildlife in Bangladesh National Zoo: Non-human primates with high prevalence and zoonotic significance. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 10: 314–320.
- Li, T. C., Li, Z., Zhang, Y. L., Chen, W. J., Dong, X. L., Yang, J. F., et al. (2020). Assessment of the subtypes and the zoonotic risk of *Blastocystis* sp. of experimental macaques in Yunnan province, southwestern China. *Parasitol. Res.* 119: 741–748.
- Longstreth, G. F., Thompson, W. G., Chey, W. D., Houghton, L. A., Mearin, F., and Spiller, R. C. (2006). Functional Bowel Disorders. *Gastroenterology* 130: 1480–1491.
- Lukeš, J., Stensvold, C. R., Jirků-Pomajbíková, K., and Wegener Parfrey, L. (2015). Are human intestinal eukaryotes beneficial or commensals? *PLoS Pathog.* 11: 7–12.
- Ma, L., Qiao, H., Wang, H., Li, S., Zhai, P., Huang, J., et al. (2020). Molecular prevalence and subtypes of *Blastocystis* sp. in primates in northern China. *Transbound. Emerg. Dis.* 67: 2789–2796.
- MacPherson, D. W., and MacQueen, W. M. (1994). Morphological diversity of *Blastocystis hominis* in sodium acetate-acetic acid-formalin-preserved stool samples stained with iron hematoxylin. *J. Clin. Microbiol.* 32: 267–268.

- Maloney, J. G., Lombard, J. E., Urie, N. J., Shivley, C. B., and Santin, M. (2018). Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitol. Res.* 118: 575–582.
- Mattiucci, S., Crisafi, B., Gabrielli, S., Paoletti, M., and Cancrini, G. (2016). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiol. Infect.* 144: 635–646.
- McClure, H. M., Strobert, E. A., and Healy, G. R. (1980). *Blastocystis hominis* in a pig-tailed macaque: a potential enteric pathogen for nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci.* 30: 890–894.
- Modrý, D., Pafčo, B., Petrželková, K. J., and Hasegawa, H. (2018). Parasites of apes, an atlas of coproscopic diagnostics. *Frankfurt Contrib. To Nat. Hist.* 78.
- Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W., Chen, X. Q., et al. (1997). Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol. Res.* 83: 319–325.
- Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W., Chen, X. Q., et al. (1999). Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitol. Res.* 85: 103–108.
- Mohammadpour, I., Bozorg-Ghalati, F., Gazzonis, A. L., Manfredi, M. T., Motazedian, M. H., and Mohammadpour, N. (2020). First molecular subtyping and phylogeny of *Blastocystis* sp. isolated from domestic and synanthropic animals (dogs, cats and brown rats) in southern Iran. *Parasites and Vectors* 14: 11.
- Nagel, R., Traub, R. J., Allcock, R. J. N., Kwan, M. M. S., and Bielefeldt-Ohmann, H. (2016). Comparison of faecal microbiota in *Blastocystis*-positive and *Blastocystis*-negative irritable bowel syndrome patients. *Microbiome* 4: 47.
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., et al. (2017). The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. *Microbiome* 5: 153.
- Nasirudeen, A. M. A., Tan, K. S. W., Singh, M., and Yap, E. H. (2001). Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology* 123: 235–246.

- Ni, J., Wu, G. D., Albenberg, L., and Tomov, V. T. (2017). Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14: 573–584.
- Nieves-Ramirez, M. E., Partida-Rodriguez, O., Laforest-Lapointe, L. A., Reynolds, L. A., Brown, E. M., Morien, E., et al. (2018). Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis* is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. *Host-Microbe Biol.* 3: e00007–18.
- Ogunrinola, G. A., Oyewale, J. O., Oshamika, O. O., and Olasehinde, G. I. (2020). The human microbiome and its impacts on health. *Int. J. Microbiol.* 2020: 1–7.
- Oliveira-Arbex, A. P., David, É. B., Tenório, M. da S., Cicchi, P. J. P., Patti, M., Coradi, S. T., et al. (2020). Diversity of *Blastocystis* subtypes in wild mammals from a zoo and two conservation units in southeastern Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 78: 104053.
- Pafčo, B., Benavides, J. A., Pšenková-Profousová, I., Modrý, D., Červená, B., Shutt, K. A., et al. (2018). Correction to: Do habituation, host traits and seasonality have an impact on protist and helminth infections of wild western lowland gorillas? *Parasitology Research.* 9: 1202.
- Parkar, U., Traub, R. J., Kumar, S., Mungthin, M., Vitali, S., Leelayoova, S., et al. (2007). Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology* 134: 359–367.
- Parkar, U., Traub, R. J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., et al. (2010). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet. Parasitol.* 169: 8–17.
- Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., et al. (2012). CBOL protist working group: Barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS Biol.* 10: e1001419.
- Peña, S., Carrasco, G., Rojas, P., Castillo, D., Ozaki, L. S., and Mercado, R. (2020). Determination of subtypes of *Blastocystis* sp. in Chilean patients with and without inflammatory bowel syndrome, A preliminary report. *Parasite Epidemiol. Control* 8: e00125.

- Petersen, A. M., Stensvold, C. R., Mirsepasi, H., Engberg, J., Friis-Møller, A., Porsbo, L. J., et al. (2013). Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* 48: 638–639.
- Petrášová, J., Uzlíková, M., Kostka, M., Petrželková, K. J., Huffman, M. A., and Modrý, D. (2011). Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. *Int. J. Parasitol.* 41: 1113–1120.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., and Alaoui, H. El (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples : Prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 49: 975–983.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C. P., Delbac, F., and El Alaoui, H. (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 8: e1002545.
- Popruk, S., Adao, D. E. V., and Rivera, W. L. (2021). Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: A review. *Infect. Genet. Evol.* 95: 105085.
- Poulsen, C. S., Efunshile, A. M., Nelson, J. A., and Stensvold, C. R. (2016). Epidemiological aspects of *Blastocystis* colonization in children in Ilero, Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95: 175–179.
- Ramírez, J. D., Flórez, C., Olivera, M., Bernal, M. C., and Giraldo, J. C. (2017). *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS One* 12: e0172586.
- Ramírez, J. D., Sánchez, L. V., Bautista, D. C., Corredor, A. F., Flórez, A. C., and Stensvold, C. R. (2014). *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect. Genet. Evol.* 22: 223–228.
- Rauff-Adedotun, A. A., Mohd Zain, S. N., and Farah Haziqah, M. T. (2020). Current status of *Blastocystis* sp. in animals from Southeast Asia: a review. *Parasitol. Res.* 119: 3559–3570.

- Rebolla, M. F., Silva, E. M., Gomes, J. F., Falcão, A. X., Rebolla, M. V. F., and Franco, R. M. B. (2016). High prevalence of *Blastocystis* spp. infection in children and staff members attending public urban schools in São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 58: 31.
- Renelies-Hamilton, J., Noguera-Julian, M., Parera, M., Paredes, R., Pacheco, L., Dacal, E., et al. (2019). Exploring interactions between *Blastocystis* sp., *Strongyloides* spp. and the gut microbiomes of wild chimpanzees in Senegal. *Infect. Genet. Evol.* 74: 104010.
- Rigottier-Gois, L. (2013). Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: The oxygen hypothesis. *ISME J.* 7: 1256–1261.
- Rivera-Chávez, F., Lopez, C. A., and Bäumlér, A. J. (2017). Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radic. Biol. Med.* 105: 93–101.
- Rivera, W. L. (2008). Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Vet. Parasitol.* 156: 178–182.
- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., and Ellis, J. (2013). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Vet. Parasitol.* 196: 85–89.
- Rook, G. A. W. (2012). Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 42: 5–15.
- Rook, G. A. W., Raison, C. L., and Lowry, C. A. (2014). Microbial “old friends”, immunoregulation and socioeconomic status. *Clin. Exp. Immunol.* 177: 1–12.
- Rossen, N. G., Bart, A., Verhaar, N., van Nood, E., Kootte, R., de Groot, P. F., et al. (2015). Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 1039–1044.
- Rudzińska, M., Kowalewska, B., Waleron, M., Kalicki, M., Sikorska, K., and Szostakowska, B. (2021). Molecular characterization of *Blastocystis* from animals and their caregivers at the Gdańsk zoo (Poland) and the assessment of zoonotic transmission. *Biology.* 10: 984.
- Růžková, J., Květoňová, D., Jirků, M., Lhotská, Z., Stensvold, C. R., Parfrey, L. W., et al. (2018). Evaluating rodent experimental models for studies of *Blastocystis* ST1. *Exp. Parasitol.* 191: 55–61.

- Sá, R. M., Petrášová, J., Pomajbíková, K., Profousová, I., Petrželková, K. J., Sousa, C., et al. (2013). Gastrointestinal symbionts of chimpanzees in Cantanhez National Park, Guinea-Bissau with respect to habitat fragmentation. *Am. J. Primatol.* 75: 1032–1041.
- Saffold, M., Ii, J., Ganac, R. D., Hiser, G., Hudson, N. R., Le, A., et al. (2008). Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitol. Res.* 103: 551–557.
- Santín, M., Gómez-Muñoz, M. T., Solano-Aguilar, G., and Fayer, R. (2011). Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol. Res.* 109: 205–212.
- Sapero, J.J. and Lawless, D.K. (1953) The MIF stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2: 613–619.
- Scanlan, P. D. (2012). *Blastocystis*: Past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol.* 28: 327–334.
- Scanlan, P. D., and Stensvold, C. R. (2013). *Blastocystis*: Getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol.* 29: 523–529.
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., and Cotter, P. D. (2015). Development and application of a *Blastocystis* subtype-specific PCR assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 4071–4076.
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G. H. J., De Vos, W. M., O'Toole, P. W., et al. (2014). The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90: 326–330.
- Scicluna, S. M., Tawari, B., and Clark, C. G. (2006). DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 157: 77–85.
- Seyer, A., Karasartova, D., Ruh, E., Güreser, A. S., Turgal, E., Imir, T., et al. (2017). Epidemiology and prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96: 1164–1170.
- Sheather, A. L. (1923). The detection of intestinal protozoa and manage parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 36: 266–275.

- Shirvani, G., Fasihi-Harandi, M., Raiesi, O., Bazargan, N., Zahedi, M. J., Sharifi, I., et al. (2020). Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from patients with irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and chronic urticaria in Iran. *Acta Parasitol.* 65: 90–96.
- Silberman, J. D., Sogin, M. L., Leipe, D. D., and Clark, C. G. (1996). Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 380: 398.
- Singh, M., Suresh, K., Ho, L. C., Ng, G. C., and Yap, E. H. (1995). Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* 81: 446–450.
- Skotarczak, B. (2018). Genetic diversity and pathogenicity of *Blastocystis*. *Ann. Agric. Environ. Med.* 25: 411–416.
- Šloufová, M., Hurych, J., Lhotská, Z., Jirků-Pomajbíková, K., Jirků, M., Stensvold, C. R., et al. (*In prep.*) Consensus for the sensitive diagnostics of the intestinal protist, *Blastocystis* sp., and for accurate identification of its subtypes.
- Sobotková, K., Parker, W., Levá, J., Růžková, J., Lukeš, J., and Jirků Pomajbíková, K. (2019). Helminth therapy – from the parasite perspective. *Trends Parasitol.* 35: 501–515.
- Stamper, C. E., Hoisington, A. J., Gomez, O. M., Halweg-Edwards, A. L., Smith, D. G., Bates, K. L., et al. (2016). The microbiome of the built environment and human behavior: Implications for emotional health and well-being in postmodern western societies. *International Review of Neurobiology.* 131: 289–323.
- Stensvold, C. R. (2013). Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *J. Clin. Microbiol.* 51: 190–194.
- Stensvold, C. R., Ahmed, U. N., Andersen, L. O. B., and Nielsen, H. V. (2012a). Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *J. Clin. Microbiol.* 50: 1847–1851.
- Stensvold, C. R., Alfellani, M. A., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E. L., Maddox, C., et al. (2009). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int. J. Parasitol.* 39: 473–479.

- Stensvold, C. R., Alfellani, M., and Clark, C. G. (2012b). Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect. Genet. Evol.* 12: 263–273.
- Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Jespersgaard, C., Mølbak, K., and Nielsen, H. V (2007a). Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods : a comparative study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59: 303–307.
- Stensvold, C. R., and Clark, C. G. (2016a). Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol. Int.* 65: 763–771.
- Stensvold, C. R., and Clark, C. G. (2016b). Molecular identification and subtype analysis of *Blastocystis*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 43: 1–10.
- Stensvold, C. R., and Clark, C. G. (2020). Pre-empting Pandora's box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends Parasitol.* 36: 229–232.
- Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S. W., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., Viscogliosi, E., et al. (2007b). Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends Parasitol.* 23: 93–96.
- Stensvold, C. R., Tan, K. S. W., and Clark, C. G. (2020). *Blastocystis*. *Trends Parasitol.* 36: 315–316.
- Stensvold, C. R., and van der Giezen, M. (2018). Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends Parasitol.* 34: 369–377.
- Stensvold, R., Brillowska-dabrowska, A., Nielsen, H. V., and Arendrup, M. C. (2006). Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J. Parasitol.* 92: 1081–1087.
- Stenzel, D. J., and Boreham, P. F. L. (1991). A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *Int. J. Parasitol.* 21: 613–615.
- Stenzel, D. J., and Boreham, P. F. L. (1996). *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 563–584.
- Stenzel, D. J., Boreham, P. F. L., and McDougall, R. (1991). Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *Int. J. Parasitol.* 21: 807–812.
- Suresh, K., Smith, H. (2004). Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23: 509–511.

- Tan, H. K., and Zierdt, C. H. (1973). Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. *Zeitschrift Parasitenkd.* 42: 315–324.
- Tan, K. S. W. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: New insights using modern methodologies. *Vet. Parasitol.* 126: 121–144.
- Tan, K. S. W. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 639–665.
- Tan, K. S. W., Howe, J., Yap, E. H., and Singh, M. (2001). Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death? *Parasitol. Res.* 87: 362–367.
- Tan, K. S. W., Mirza, H., Teo, J. D. W., Wu, B., and MacAry, P. A. (2010). Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12: 28–35.
- Tan, T. C., and Suresh, K. G. (2006). Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol. Res.* 98: 189–193.
- Tan, T. C., Suresh, K. G., and Smith, H. V. (2008). Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. *Parasitol. Res.* 104: 85–93.
- Termmathurapoj, S., Leelayoova, S., Pote, A., Thathaisong, U., Thirayost, N., Taamasri, P., et al. (2004). The usefulness of short-term *in vitro* cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol. Res.* 93: 445–447.
- Terveer, E. M., van Gool, T., Ooijevaar, R. E., Sanders, I. M. J. G., Boeijs-Koppenol, E., Keller, J. J., et al. (2019). Human transmission of *Blastocystis* by fecal microbiota transplantation without development of gastrointestinal symptoms in recipients. *Clin. Infect. Dis.* 71: 2630–2636.
- Tito, R. Y., Chaffron, S., Caenepeel, C., Lima-Mendez, G., Wang, J., Vieira-Silva, S., et al. (2019). Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut* 68: 1180–1189.
- Valença-Barbosa, C., Do Bomfim, T. C. B., Teixeira, B. R., Gentile, R., Da Costa Neto, S. F., Magalhães, B. S. N., et al. (2019). Molecular epidemiology of *Blastocystis* isolated from animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One* 14: e0210740.

- Vdovenko, A. A. (2000). *Blastocystis hominis*: Origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitol. Res.* 86: 8–10.
- Vega, L., Herrera, G., Muñoz, M., Patarroyo, M. A., and Ramírez, J. D. (2020). Occurrence of *Blastocystis* in patients with clostridioides difficile infection. *Pathogens* 9: 4–11.
- Vieira-Silva, S., Falony, G., Darzi, Y., Lima-Mendez, G., Garcia Yunta, R., Okuda, S., et al. (2016). Species-function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. *Nat. Microbiol.* 1: 16088.
- Villanueva-Garcia, C., Gordillo-Chavez, E. J., Lopez-Escamilla, E., Rendon-Franco, E., Muñoz-Garcia, C. I., Gama, L., et al. (2017). Clarifying the cryptic host specificity of *Blastocystis* spp. isolates from *Alouatta palliata* and *A. Pigra* howler monkeys. *PLoS One* 12: e0169637.
- Vital, M., Howe, A. C., and Tiedje, J. M. (2014). Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *MBio* 5: e00889.
- Vlčková, K., Pafčo, B., Petrželková, K. J., Modrý, D., Todd, A., Yeoman, C. J., et al. (2018). Relationships between gastrointestinal parasite infections and the fecal microbiome in free-ranging western lowland gorillas. *Front. Microbiol.* 9: 1202.
- Wang, W., Bielefeldt-Ohmann, H., Traub, R. J., Cuttall, L., and Owen, H. (2014a). Location and pathogenic potential of *Blastocystis* in the porcine intestine. *PLoS One* 9: e103962.
- Wang, W., Owen, H., Traub, R. J., Cuttall, L., Inpankaew, T., and Bielefeldt-Ohmann, H. (2014b). Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet. Parasitol.* 203: 264–269.
- Wawrzyniak, I., Courtine, D., Osman, M., Hubans-Pierlot, C., Cian, A., Nourrisson, C., et al. (2015). Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genomics Data* 4: 22–23.
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., and Alaoui, H. El (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite : an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 1: 167–178.
- Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M. A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., et al. (2010). Irritable bowel syndrome: Is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* 106: 1033–1038.

- Yason, J. A., Liang, Y. R., Png, C. W., Zhang, Y., and Tan, K. S. W. (2019). Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: *In vitro* and *in vivo* studies. *Microbiome* 7: 30.
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222–227.
- Yoshikawa, H., Abe, N., and Wu, Z. (2004a). PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology* 150: 1147–1151.
- Yoshikawa, H., Koyama, Y., Tsuchiya, E., and Takami, K. (2016). *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol. Int.* 60: 750–759.
- Yoshikawa, H., Kuwayama, N., and Enose, Y. (1995). Histochemical detection of carbohydrates of *Blastocystis hominis*. *J. Euk. Microbiol.* 42: 70–74.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Pandey, K., Pandey, B. D., Sherchand, J. B., Yanagi, T., et al. (2009). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet. Parasitol.* 160: 295–300.
- Yoshikawa, H., Yoshida, K., Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S., and Kimata, I. (2004b). Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol. Res.* 94: 391–396.
- You, C., Jirků, M., Corcoran, D. L., Parker, W., and Jirků-Pomajbíková, K. (2021). Altered gut ecosystems plus the microbiota's potential for rapid evolution: A recipe for inevitable change with unknown consequences. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19: 5969–5978.
- Zaman, V., Howe, J., and Ng, M. (1997). Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* 83: 306–308.
- Zaman, V., Ng, G. C., Suresh, K., Yap, E. H., and Singh, M. (1993). Isolation of *Blastocystis* from the cockroach (*Dictyoptera: Blattidae*). *Parasitol. Res.* 79: 73–74.
- Zanzani, S. A., Gazzonis, A. L., Epis, S., and Manfredi, M. T. (2016). Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitol. Res.* 115: 307–312.

- Zanzani, S., Epis, S., Bandi, C., and Manfredi, M. T. (2014). What is your diagnosis? Fecal smear stained with Lugol's solution and Giemsa from a cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) presenting with liquid diarrhea. *Vet. Clin. Pathol.* 43: 293–294.
- Zhang, X., Qiao, J. Y., Wu, X. M., Da, R., Zhao, L. M., and Wei, Z. C. (2012). *In vitro* culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *Int. J. Infect. Dis.* 16: e23–e28.
- Zhang, X., Qiao, J. Y., Zhou, X. J., Yao, F. R., and Wei, Z. C. (2007). Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and *in vitro*. *Parasitol. Res.* 101: 43–51.
- Zhao, G. H., Hu, X. F., Liu, T. L., Hu, R. S., Yu, Z. Q., Yang, W. B., et al. (2017). Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qinling Mountains. *Parasitol Res* 116: 2327–2333.
- Zhu, W., Wei, Z., Li, Q., Lin, Y., Yang, H., and Li, W. (2020). Prevalence and subtype diversity of *Blastocystis* in human and nonhuman primates in North China. *Parasitol. Res.* 119: 2719–2725.
- Zierdt, C. H. (1983). *Blastocystis hominis*, a protozoan parasite and intestinal pathogen of human beings. *Clin. Microbiol. Newsl.* 5: 57–59.
- Zierdt, C. H. (1991). *Blastocystis hominis*-Past and future. *American Society for Microbiology.* 4: 61–79.