

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Výskyt střevního prvoka, *Dientamoeba fragilis*, u primátů
v zajetí**

Bakalářská práce

Monika Koutenská

Školitelka: MVDr. Kateřina Jirků, PhD.

Školitel-specialista: RNDr. Milan Jirků

Konzultant: RNDr. Zuzana Lhotská

České Budějovice

2022

Koutenská, M., 2022: Výskyt střevního prvoka, *Dientamoeba fragilis*, u primátů v zajetí [The occurrence of intestinal protist *Dientamoeba fragilis* in captive primates. Bc. Thesis, in Czech.]- 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main aim of this thesis is to summarize all available information on the occurrence of intestinal protist *Dientamoeba fragilis* in non-human primates kept in captivity. The partial objectives were to describe all available facts about the biology of *D. fragilis*, such as about its life cycle, host specificity, genetic diversity and the role of *D. fragilis* in the intestinal microbiome. In addition, I also addressed the issue of diagnosis of *D. fragilis*, which until recently was relatively difficult, and I summarized the available diagnostic molecular approaches and their benefits.

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: 12. 4. 2022

Podpis.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Kateřině a Milanovi Jirků za veškerou pomoc, kterou mi při psaní této bakalářské práce věnovali. Dále bych ráda poděkovala ostatním kolegům z Laboratoře parazitární terapie za poskytnutí rad a motivace, kdykoliv bylo potřeba.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle práce	3
3. Biologické aspekty prvoka <i>Dientamoeba fragilis</i>	4
3.1. Taxonomické zařazení	4
3.2. Životní cyklus	5
3.3. Morfologie životních stadií	7
3.4. Genetická diverzita	10
3.5. Hostitelská specifita	11
4. Diagnostika <i>Dientamoeba fragilis</i>	13
4.1. Tradiční diagnostické metody	13
4.1.1. Barvení roztěru stolice	13
4.1.2. Kultivace	15
4.2. Molekulární diagnostika	17
4.2.1. Konvenční PCR	18
4.2.2. Real-Time - PCR	18
4.3. Diagnostika založená na imunologii	19
5. Střevní mikrobiom a <i>Dientamoeba fragilis</i>	20
6. Výskyt <i>Dientamoeba fragilis</i> u primátů	22
6.1. <i>Dientamoeba fragilis</i> u člověka	22
6.2. Výskyt <i>Dientamoeba fragilis</i> u nehumánních primátů	25
6.2.1. Výskyt <i>Dientamoeba fragilis</i> u nehumánních primátů ve volné přírodě	26
6.2.2. Výskyt <i>Dientamoeba fragilis</i> u nehumánních primátů v zajetí	27
6.3. Zoonotický potenciál <i>Dientamoeba fragilis</i>	29
7. Experimentální část	31
7.1. Materiál a metodika	31
7.1.1. Vzorky	31
7.1.2. Diagnostické metody	31

7.2. Průběžné výsledky	32
8. Závěr.....	34
9. Seznam citované literatury	35

1. Úvod

Někteří střevní prvoci se zdají být běžnou součástí střevního mikrobiomu, jak ukazuje výzkum posledních let (Lukeš et al., 2015; Chabé et al., 2017; Lhotská et al., 2020). Přesto je studium jejich role u primátů včetně člověka stále na samém začátku. Tato bakalářská práce je zaměřena na shrnutí informací o výskytu střevního prvoka *D. fragilis* u nehumánních primátů chovaných v lidské péči a konfrontována s informacemi o výskytu u volně žijících primátů a člověka.

O existenci střevního prvoka *D. fragilis* víme již přes 100 let a stále v mnohých ohledech není zcela pochopen (Jepps a Dobell, 1918). Například jeho role v lidském zdraví a nemoci není úplně objasněná. Podobně jako u mnoha jiných střevních prvoků, se detekce *D. fragilis* a výzkum souvislostí mezi jeho přítomností a symptomy (bolest břicha, nadýmání, průjem, zvracení) v minulosti omezoval zejména na pacienty trpícími různými střevními onemocněními, případně střevními zánětlivými onemocněními. Tudíž informace o výskytu *D. fragilis* ve zdravé populaci lidí, případně zvířat, jsou sporadické.

Dříve byl prvek *D. fragilis* detekován především u pacientů a byl popisován jako příčina gastrointestinálních onemocnění (Stark et al., 2005b, 2010a; Ögren et al., 2015). Mezi tyto onemocnění spadají i idiopatické střevní záněty (Inflammatory Bowel Diseases - IBD) a gastroenteritida (Yakoob et al., 2010). V současné době je jeho častější výskyt zaznamenáván u zdravých jedinců v kontrolních skupinách oproti primárně sledovaných pacientů (Krogsgaard et al., 2015; Holtman et al., 2017; Jokelainen et al., 2017; Brands et al., 2019).

Se zavedením molekulárních metod pro diagnostiku *D. fragilis* se zvyšuje zájem o její výzkum z pohledu epidemiologie, a to především u zdravé populace lidí (Kašparová, nepublikovaná data). Dosud není zcela objasněna také hostitelská specifita *D. fragilis*, a tak jsou informace o zoonotických přenosech sporadické. V současnosti je zřejmé, že prvek *D. fragilis* je kromě člověka schopný kolonizovat deset druhů zvířat zahrnující, několik druhů nehumánních primátů, prasata (*Sus scrofa domestica*), krysy (*Rattus rattus*), ovce (*Ovis gmelini f. aries*), a také sporadicky kočky (*Felis catus*) a psy (*Canis lupus familiaris*) (Hegner a Chu, 1930; Knowles a Das Gupta, 1936; Noble a Noble, 1952; Stark et al., 2008; Lankester et al., 2010; Cacciò et al., 2012; Ogunniyi et al., 2014; Menu et al., 2021).

V mé bakalářské práci se zabývám shrnutím informací o *D. fragilis* u nehumánních primátů, a kromě toho i u člověka, protože studie s takovým zaměřením stále chybí. Donedávna byl prvok *D. fragilis* popsán u několika druhů nehumánních primátů, jak bylo zmíněno výše. Ve volné přírodě byl popsán u makaků jávských (*Macaca fascicularis philippensis*; Hegner a Chu, 1930) a šimpanzů hornoguinejských (*Pan troglodytes verus*; Menu et al., 2021). V zajetí byl tento prvok popsán také u makaků (*Macaca* spp.; Knowles a Das Gupta, 1936), paviánů (*Papio* spp.; Myers, 1968), vřešťanů pláštíkových (*Alouatta palliata aequatorialis*; Helenbrook et al., 2015) a gorily nížinné západní (*Gorilla gorilla gorilla*; Stark et al., 2008).

2. Cíle práce

Hlavním cílem této bakalářské práce je shrnout dostupné a aktuální informace o střevním prvoku *Dientamoeba fragilis* u primátů v zajetí.

Pro dosažení hlavního záměru byly určeny následující dílčí cíle:

- shrnout obecné poznatky o prvoku *D. fragilis*;
- shrnout dostupné informace o výskytu *D. fragilis* u primátů v zajetí a volné přírodě;
- shrnout informace o možném zoonotickém potenciálu *D. fragilis*.

3. Biologické aspekty prvoka *Dientamoeba fragilis*

3.1. Taxonomické zařazení

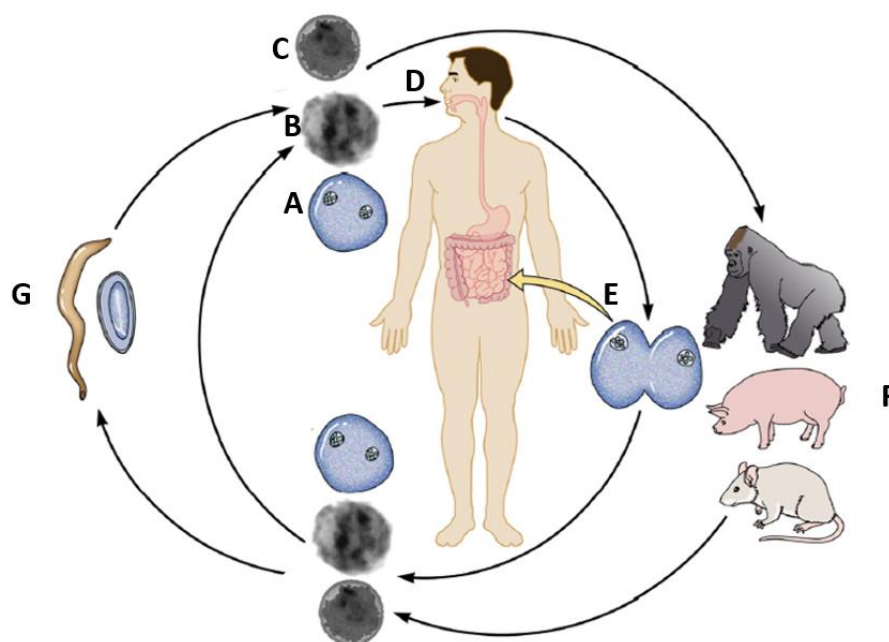
Objev prvoka *Dientamoeba fragilis* se sice připisuje Charlesovi Wenyonu, ale až dvojice Margaret Jeppsová a Clifford Dobell jej poprvé popsala ve vědecké literatuře a přiřadila taxonomickou pozici (Jepps a Dobell, 1918). Toto první zařazení bylo mezi améby, a to na základě morfologie trofozoita a absence cysty. Po zvážení detailnější morfologie následně dospěl Clifford Dobell k závěru, že se nejedná o amébu, ale že prvok *D. fragilis* patří mezi bičíkovce a během evoluce ztratil bičík (Dobell, 1940). Později s vývojem elektronové mikroskopie byl tento předpoklad podpořen nálezem parabazálního aparátu, který je typický pro kmen Parabasala (Camp et al., 1974). Následně tuto taxonomickou pozici potvrdily i výsledky získané molekulárně-fylogenetickými metodami na základě genu SSU rRNA. Tyto analýzy demonstrovaly příbuznost *D. fragilis* s trichomonádami a společný původ s dalším prvokem nacházejícím se u drůbeže *Histomonas meleagridis* (Silberman et al., 1996; Gerbod et al., 2001). Na základě jak morfologie, tak molekulárních metod je tedy prvok *D. fragilis* v současné době umístěn do řádu Trichomonadida (Tab. 1) (Čepicka et al., 2010).

Tab. 1: Současné taxonomické zařazení prvoka *Dientamoeba fragilis* (adaptováno dle publikace Stark et al. 2016).

Taxonomické kategorie	Klasifikace
Říše	Excavata
Kmen	Parabasalia
Třída	Tritrichomonadidae
Řád	Trichomonadida
Čeleď	Dientamoebidae
Rod	<i>Dientamoeba</i>
Druh	<i>Dientamoeba fragilis</i> (Jepp a Dobell, 1918)

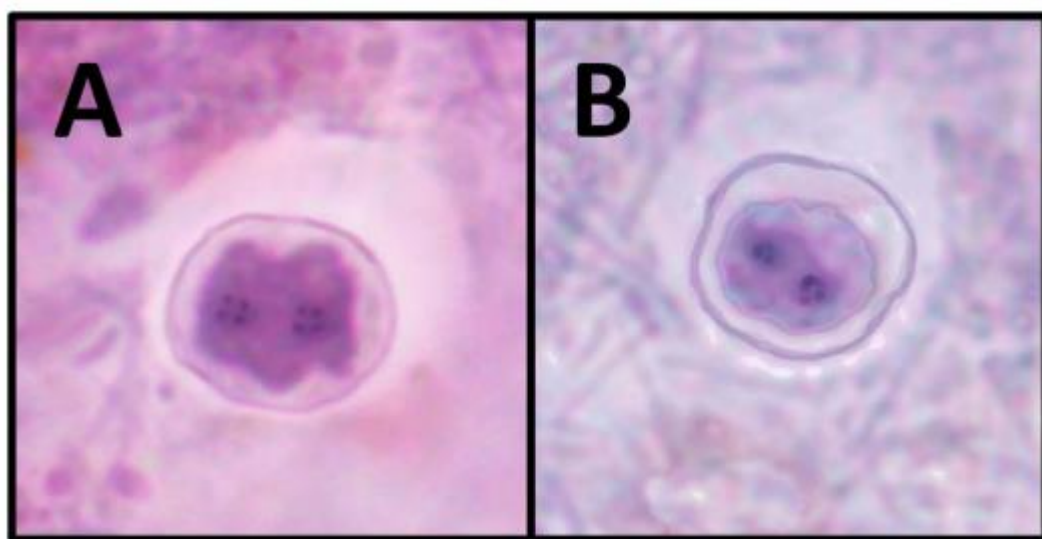
3.2. Životní cyklus

Přestože víme o existenci střevního prvoka *D. fragilis* už více než 100 let, stále máme v porozumění jeho biologie velké mezery. Jednou neznámou byl donedávna samotný životní cyklus tohoto prvoka, protože bylo popsáno pouze stádium trofozoita (Obr. 1A) (Jepps a Dobell, 1918; Dobell, 1940). Dnes je již životní cyklus zcela objasněn díky nedávnému objevu dalších stadií, a to precysty (Obr. 1B) a cysty (Obr. 1C), které mohou přežívat nějaký čas ve vnějším prostředí (Stark et al., 2014). Budoucí hostitel se infikuje požitím cysty *D. fragilis* perorálně (Obr. 1D). Následně cysta *D. fragilis* prochází žaludkem a dostává se do tenkého a tlustého střeva. Při průchodu trávicím traktem dochází k excystaci a trofozoit je uvolněn z cysty do lumen střeva, kde dochází k binárnímu dělení (Obr. 1E). Aby došlo k uzavření životního cyklu a následně přenosu mezi jedinci, dochází k encystaci trofozoitů, s největší pravděpodobností v tlustém střevě. Cysta je opět vyloučena prostřednictvím exkrementů do vnějšího prostředí. Další hostitel se poté infikuje kontaminovanou vodou, potravou nebo přímým kontaktem (Obr. 1D,F) (Munasinghe et al., 2013; Stark et al., 2014, 2016; Garcia, 2016).



Obr. 1: Životní cyklus prvoka *Dientamoeba fragilis*; (A) trofozoit; (B) precysta; (C) cysta; (D) perorální infekce člověka; (F) perorální infekce jiných hostitelů; (G) střevní červ jako vektor pro trofozoity *Dientamoeba fragilis* (adaptováno dle publikace Stark et al. 2016).

Donedávna nebylo u *D. fragilis* známé stádium cysty, které bylo popsáno u člověka teprve roku 2014 (Stark et al., 2014). Do té doby se proto přenos křehkých trofozoitů *D. fragilis* mezi jedinci vysvětloval na základě přenosu těchto stadií prostřednictvím vajíček helmintů (Obr. 1G) (Girginkardeşler et al., 2008; Stark et al., 2009, 2010a; Ögren et al., 2013; Röser et al., 2013a; Boga et al., 2016). Poprvé bylo stádium cysty popsáno v experimentální studii při optimalizování myššího modelu pro výzkum přenosu *D. fragilis* (Munasinghe et al., 2013). Myši byly perorálně inokulovány podáním infekční dávky získané z kultury (Barratt et al., 2010). Nejen, že byl potvrzen fekálně-orální přenos mezi jedinci, ale také byla objevena cysta. Všechny myši kolonizované *D. fragilis* vylučovaly přerušovaně cysty po dobu šesti měsíců, než byl experiment ukončen. O rok později dvě nezávislé laboratoře vyšetřily uložené trvalé preparáty roztěrů stolice pozitivních pacientů na *D. fragilis* a oběma laboratořím se nezávisle na sobě podařilo objevit morfologické stádium cysty a precysty (Stark et al., 2014). Jednalo se o laboratoř mikrobiologického oddělení nemocnice St. Vincent v Sydney a zároveň o laboratoř klinické mikrobiologie Santa Monica v USA. V rámci této práce autorů Stark et al. (2014) došlo k porovnání nalezených cyst u člověka a u myši. Podle autorů jsou oba nálezy cyst (jak u myši, tak u člověka) morfologicky totožné (Obr. 2).



Obr. 2: Cysta prvoka *Dientamoeba fragilis* objevena ve studii Munasinghe et al. (2013) v experimentálním myším modelu (**A**) a z lidského vzorku (**B**) (adaptováno dle publikace Stark et al., 2014).

Teorie o některých střevních helmintech jako vektorech pro přenos trofozoitů *D. fragilis* vznikla na základě informací o fylogeneticky příbuzném prvoku *Histomonas meleagridis* u drůbeže, jehož vektorem je střevní červ *Heterakis gallinarum* (Gerbod et al. 2001; Volf a Horák, 2007). Důležitým faktem, který podporuje tuto hypotézu o přenosu ve vajíčcích střevních červů, je častý nález ko-infekce *D. fragilis* a roupa dětského (*Enterobius vermicularis*) u člověka, zejména dětí (Yang a Scholten, 1977; Johnson et al., 2004; Girginkardeşler et al., 2008). Autoři studie Girginkardeşler et al. (2008) vyšetřovali vzorky dvou skupin u kterých věděli o přítomnosti *D. fragilis* nebo *E. vermicularis* z předchozích vyšetření. A v rámci své studie zjišťovali prevalenci druhého organismu. Zaznamenaná prevalence ko-infekcí dosahovala 25,4 % *E. vermicularis* u skupiny, u níž byl předem potvrzen výskyt *D. fragilis*. U druhé skupiny, u níž byl nejdříve potvrzen výskyt *E. vermicularis*, prevalence *D. fragilis* dosahovala 9,6 %. Autor studie Ockert (1990) úspěšně inokuloval dobrovolníky s *D. fragilis* s využitím vajíček *E. vermicularis*, která pocházela od pacienta s ko-infekcí obou organismů. Oproti tomu Damien Stark z „St. Vincent’s hospital“ v Sydney, ani v jednom případě neobjevil souvislost mezi výskytem *D. fragilis* a *E. vermicularis* (Stark et al., 2009, 2010a). Kromě *E. vermicularis* se uvažovalo o přenosu *D. fragilis* také prostřednictvím vajíček tenkohlavce lidského (*Trichuris trichiura*) nebo škrkavky dětské (*Acaris lumbricoides*) (sumarizováno v Barratt et al. 2011b). Dalším faktem podporujícím hypotézu helmintů jako vektora bylo zjištění DNA prvoka *D. fragilis* uvnitř vajíčka *E. vermicularis* s využitím PCR (Ögren et al., 2013; Röser et al., 2013a). Zde je ovšem důležité zmínit, že se oba způsoby přenosu *D. fragilis*, tzn. pomocí cyst nebo vajíčky helmintů, nemusí navzájem vylučovat. To znamená, že tento prvok může využít obě možnosti (Stark et al., 2016).

3.3. Morfologie životních stadií

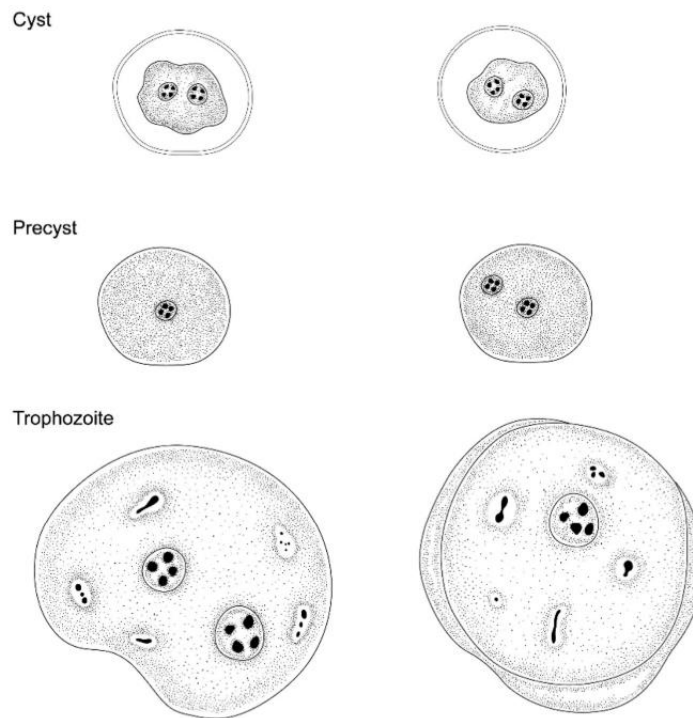
Životní cyklus *D. fragilis* zahrnuje několik stadií, a to trofozoita, precystu a cystu (Obr. 3) (Jepps a Dobell, 1918; Dobell, 1940; Munasinghe et al., 2013; Stark et al., 2014). Stadium trofozoita má nejčastěji kulatý až oválný tvar s rozměry mezi 5 až 15 µm (Jepps a Dobell, 1918; Dobell, 1940). Autoři studie Sawangjaroen et al. (1993) v kultuře odhalili větší rozmezí velikostí trofozoitů, a to 11 až 29 µm. Obecně trofozoit má převážně dvě jádra, která obsahují podle barvení DAPI stejné množství DNA (Obr. 4) (Dobell, 1940; Johnson et al., 2004; Banik et al., 2012). Občas byli nalezeni trofozoiti se třemi jádry (Banik et al., 2012). Jaderná

membrána se v obarvených roztěrech jeví jako velmi jemná bez přítomnosti periferního chromatinu (Stark et al., 2005a). Jádru bývá fragmentované, obsahuje několik chromatinových tělísek, nejčastěji mezi dvěma a deseti kusy (Stark et al., 2006b; Banik et al., 2012). Autoři studie Banik et al. (2012) popsali vnitřní strukturu trofozoitů, pomocí transmisní elektronové mikroskopie (Transmission Electron Microscopy - TEM), která zahrnuje velmi dobře vyvinutý Golgiho aparát společně s hladkým i drsným endoplazmatickým retikulem. Kromě toho byly v této studii poprvé popsány hydrogenosomy, organely typické pro trichomonády. Autoři v této studii použili také rastrovací elektronovou mikroskopii (Scanning Electron Microscopy - SEM) a odhalili dva odlišné typy povrchů *D. fragilis*. Na základě této analýzy rozlišili trofozoity na tzv. hladké a zvlněné buňky. Častěji byl detekován zvlněný typ trofozoitů ale počet hladkých buněk se zvyšoval v průběhu času sledování (Banik et al., 2012). Pomocí TEM byl také zkoumán encystovaný trofozoit, u něhož byly nalezeny pozůstatky komponentů bičíku (Munasinghe et al., 2013). Nicméně u excystovaného stadia trofozoita taková struktura objevena nebyla (Banik et al., 2012).

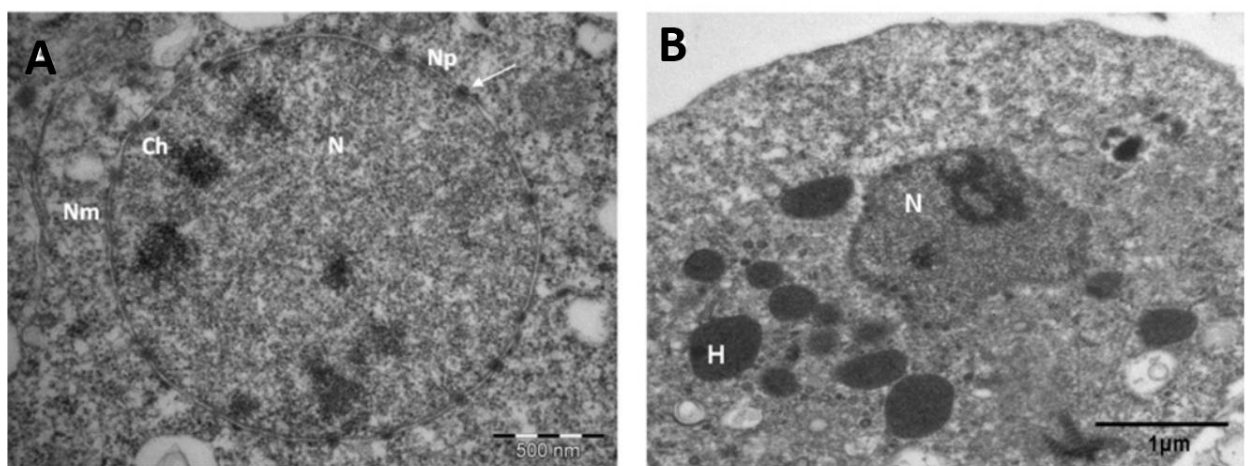
Stadium trofozoita je obecně velmi křehké a ve vnějším prostředí se pod vlivem kyslíku a teploty rychle rozpadá, a to v řádu hodin. V experimentálních podmínkách trofozoit přežil ve stolici při pokojové teplotě 24 h, zatímco při 4°C, tak přežil pouze 10 h (Sawangjaroen et al., 1993).

Cysta *D. fragilis* je tvořena silnou stěnou a obsahuje trofozoita s jádry (Munasinghe et al., 2013; Stark et al., 2014). Průměr cysty se pohybuje okolo 5 μm. Mezi uzavřeným prvokem a stěnou je zřetelný volný prostor s vezikuly. Stadium cysty obsahuje dvě jádra a hydrogenosomy.

Stadium precysty má kompaktní kulatý tvar a dosahuje poloviční velikosti trofozoita (Stark et al., 2014). Velikost precysty se pohybuje mezi 4 a 5 μm. Cytoplazma se jeví jako homogenní s malým množstvím inkluzí. Precysta se vyskytuje jak v jednojaderné, tak i dvojjaderné formě.



Obr. 3: Morfologická stadia *Dientamoeba fragilis* (adaptováno dle publikace Stark *et al.* 2014).



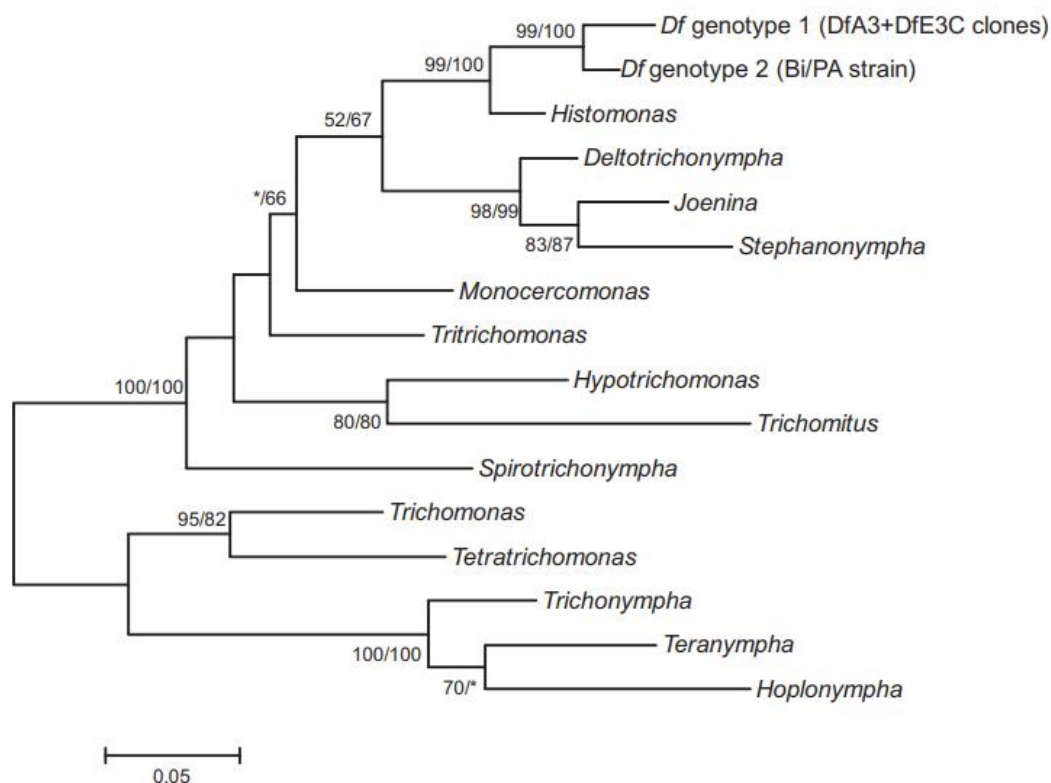
Obr. 4: Vnitřní struktury *Dientamoeba fragilis* zobrazené pomocí transmisní elektronové mikroskopie. **(A)** jaderné struktury: N-jádro, Nm-jaderná membrána, Np-jaderný por, Ch-chromatin. **(B)** hydrogenosomy v cytoplasmě: N-jádro, H-hydrogenosomy (adaptováno dle publikace Banik *et al.* 2012).

3.4. Genetická diverzita

Stejně jako ostatní střevní prvoci také *D. fragilis* vykazuje vnitrodruhovou genetickou diverzitu, která je ovšem poměrně úzká (Stensvold et al., 2013). Oproti tomu u mnohem více studovaných prvoků *Blastocystis* sp. a *Giardia intestinalis* byla odhalena široká genetická diverzita. Zatímco u *Blastocystis* bylo popsáno dosud 22 subtypů u savců, u *G. intestinalis* bylo popsáno osm asambláží (Stensvold et al., 2013; Stensvold a Clark, 2020; Zahedi et al., 2017; Ryan a Zahedi, 2019). Obecně řečeno genetická variabilita v rámci druhu daného prvoka umožňuje posoudit možnost zoonotických přenosů. Například zhodnocení výskytu asambláží *G. intestinalis* nebo subtypů *Blastocystis* sp. u zvířat a lidí v rámci epidemiologických studií umožňuje takové přenosy zhodnotit (Wawrzyniak et al., 2013; Heyworth, 2016).

V případě *D. fragilis* se v současnosti rozlišují dva hlavní genotypy. Genotypy nesou označení Genotyp 1 a Genotyp 2 (Johnson a Clark 2000; Windsor et al. 2004). Genotyp 2 bývá označován také jako kmen Bi/PA. Tento kmen je ve formě kultury uložen ve sbírce *American Type Culture Collection* (ATCC) v USA a sekvenačně se shoduje s Genotypem 2 (Camp et al., 1974; Johnson a Clark, 2000). Rozdíl v nukleotidových sekvencích pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) mezi oběma genotypy *D. fragilis* je přibližně 2% (Johnson a Clark, 2000). K tomuto rozdílu mezi sekvencemi genotypů dospěly i další studie (např. Peek et al., 2004; Stensvold et al., 2013). Kromě toho byla genetická diverzita *D. fragilis* posuzována na základě dalších dvou genů, a to genu pro elongační faktor 1 α (EF1 α) a pro aktin (Stensvold et al., 2013). Nicméně i v těchto případech rozdíly v nukleotidových sekvencích mezi dvěma genotypy *D. fragilis* nepřesáhly 3 % (Obr. 5).

Autoři studie Hussein et al. (2009) zjišťovali prevalenci *D. fragilis* u pacientů se syndromem dráždivého tračníku (Irritable Bowel Syndrome – IBS) pomocí Real-time PCR (qPCR) na základě SSU rRNA. Po proběhnutí qPCR cyklu, se pokusili o další možnost rozlišení genotypů *D. fragilis* s pomocí vyhodnocení křivek tání (High Resolution Melting curves, HRM). Z výsledných analýz byly zjištěny čtyři profily. Profil 1 byl dominantní (50 %), následně profil 2 (20 %) a nakonec společně profil 3 (16,7 %) s profilem 4 (13,3 %). Nicméně tato studie nekonfrontovala tyto profily se sekvencemi genotypů *D. fragilis* a tak není možné nic vyvodit ohledně genetické diverzity.



Obr. 5: Fylogenetický strom *Dientamoeba fragilis*, vytvořen na základě analýzy sekvencí genů aktinu a elongačního faktoru 1 α (EF-1 α) (adaptováno dle publikace Stensvold et al. 2013).

3.5. Hostitelská specifita

Hostitelská specifita prvoka *D. fragilis* není dosud zcela objasněna, a zdá se být poměrně úzká (Stark et al., 2008, 2016). Tento fakt byl zřejmě donedávna zapříčiněn obtížnou diagnostikou (Dobell, 1940; Stark et al., 2016), nicméně se současným rozvojem molekulárních diagnostických technik pro *D. fragilis* se dá předpokládat, že hostitelské spektrum se může rozšířit.

Dientamoeba fragilis byla původně objevena a popsána u člověka, a ten je doposud považován za primárního hostitele (Jepps a Dobell, 1918). V případě nehumánních primátů byla přítomnost *D. fragilis* zjištěna u makaků (*Macaca fascicularis philippensis*) na Filipínách, o šest let později byl nález tohoto prvoka popsán u druhově nedefinovaných makaků (*Macaca*

spp.) (Hegner a Chu, 1930; Knowles a Das Gupta, 1936). Dále byl tento prvok objeven u paviánů (*Papio* spp.) v Keni (Myers, 1968). Autoři studie Helenbrook et al. (2015) našli *D. fragilis* u vřešťanů plástíkových (*Alouatta palliata aequatorialis*). V případě lidoopů byl prvok *D. fragilis* zjištěn u gorily nížinné západní (*Gorilla gorilla gorilla*) a šimpanze hornoguinejského (*Pan troglodytes verus*) (Stark et al., 2008; Lankester et al., 2010; Menu et al., 2021)

V případě dalších hostitelů byla *D. fragilis* potvrzena u několika živočišných druhů. Jedním z prvních objevů byl výskyt tohoto prvoka u ovce domácí (*Ovis gmelini f. aries*) (Noble a Noble 1952). Autoři studie Cacciò et al. (2012) objevili *D. fragilis* u domácích prasat (*Sus scrofa domestica*) a zjištěná prevalence byla 46,7 %. Ovšem nejčastěji se vyskytovala u selat, kde byl odhalen Genotyp 1. Také další italská studie Crotti et al. (2007) detekovala *D. fragilis* u prasat domácích (*Sus scrofa domestica*) se 43,8% prevalencí, ale genotyp nebyl zjišťován. Naopak autoři australské studie Stark et al. (2008) nezjistili *D. fragilis* ani u jednoho prasete domácího (*Sus scrofa domestica*). Autoři studie Chan et al. (2016) našli prvoka *D. fragilis* u kočky (*Felis catus*) a psa (*Canis lupus familiaris*). Studie Ogunniyi et al. (2014) zabývající se endoparazity u krys obecných (*Rattus rattus*) našla spolu s mnoha parazity také *D. fragilis*. Z celkového množství 50-ti krys byly pozitivní dvě, tj. prevalence 4 %.

Kromě zjištění přirozených kolonizací *D. fragilis* byla zjištěna hostitelská specifita u některých zvířecích druhů experimentálně. Nedávno jedním z takových úspěšně kolonizovaných hostitelů byly myši, a to ve studii zaměřené na zkoumání životního cyklu *D. fragilis* (Munasinghe et al., 2013) a dále ve studii s cílem zjistit patogenní potenciál tohoto prvoka (El-Gayar et al., 2016). Autoři těchto studií úspěšně myši kolonizovali, a tudíž je podle autorů možné použít myší model pro budoucí výzkum *D. fragilis*. Nicméně o zavedení experimentálního zvířecího modelu pro studium *D. fragilis* se pokoušel již v první polovině minulého století Clifford Dobell (1940). Ten se snažil nakazit makaky (*Macacus sinicus*, *Macacus rhesus*) a kuřata prostřednictvím rektální inokulace *D. fragilis* získané z kultury. Všechny tyto pokusy byly ovšem neúspěšné. Autoři Knoll a Howell (1946) se pokoušeli o experimentální kolonizaci koťat, ale opět bez úspěchu.

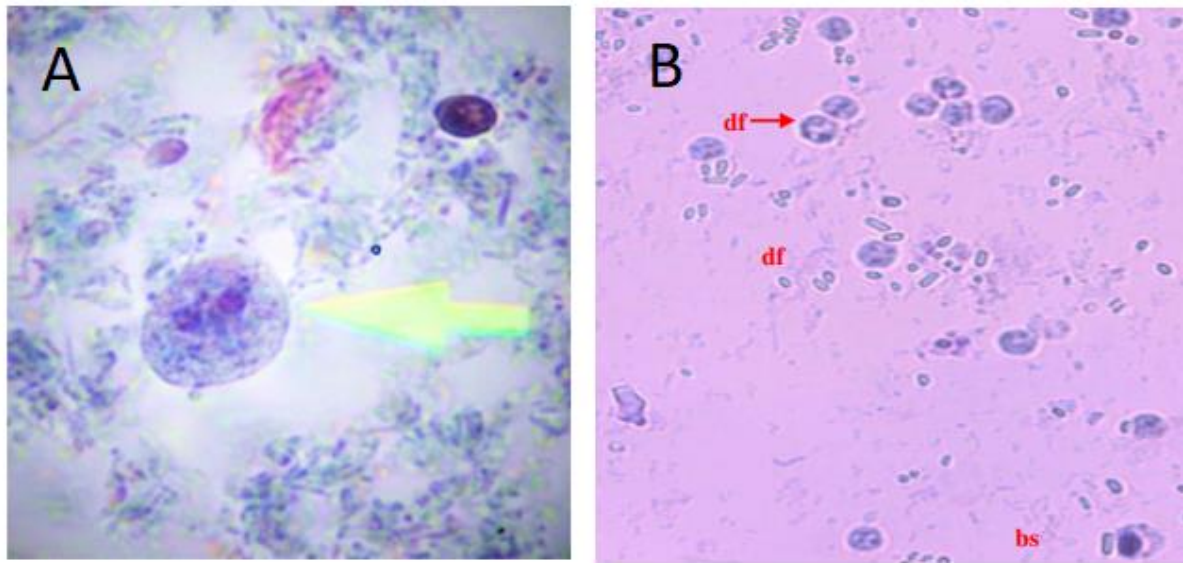
4. Diagnostika *Dientamoeba fragilis*

Diagnostika *D. fragilis* bez využití molekulárních metod je poměrně složitá. Komplikací je křehká struktura trofozoita. Morfologické stádium trofozoita se ve vnějším prostředí za přítomnosti vzduchu rozpadá do několika hodin (Jepps a Dobell, 1918; Sawangjaroen et al., 1993), a právě proto dostal tento prvok svůj druhový název „fragilis“ (křehký, lomivý) (Jepps a Dobell, 1918). Je třeba doplnit, že ani po odhalení stádia cysty se diagnostika nezjednodušila, protože cysta dosahuje velmi malé velikosti, a to 3-5 μ m (Munasinghe et al., 2013; Stark et al., 2014), což je komplikací zejména pro tradiční parazitologickou diagnostiku využívající kombinaci koncentračních metod nebo barvených roztěrů a světelné mikroskopie (Garcia, 2007). Proto se v současnosti přistupuje k molekulárním metodám pro detekci *D. fragilis*.

4.1. Tradiční diagnostické metody

4.1.1. Barvení roztěru stolice

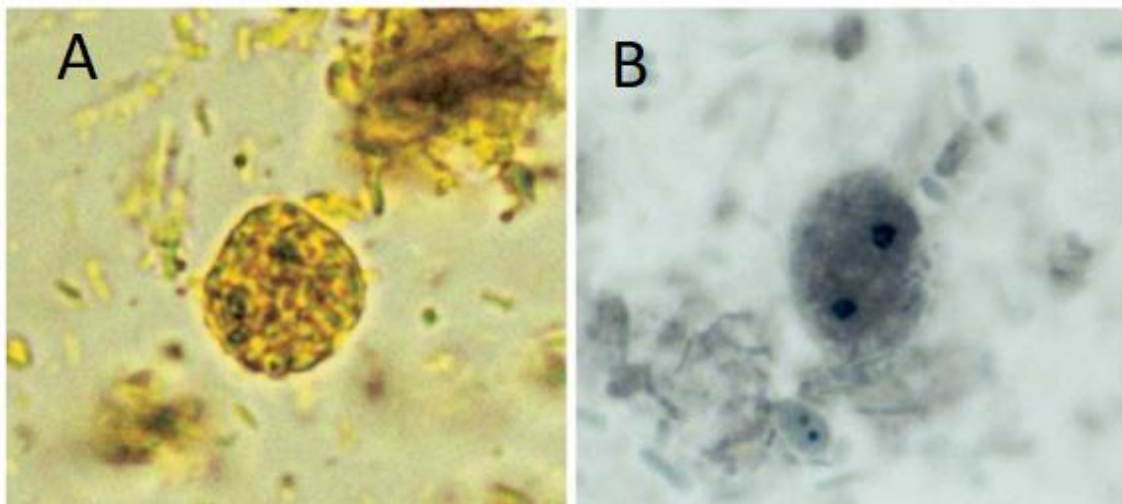
Z důvodu fragilního trofozoita *D. fragilis* je při barvení roztěrů stolice vhodné použít fixační činidlo pro zachování jeho celistvosti před vyšetřením (Stark et al., 2016). Pro barvení trvalých roztěrů stolice v případě detekce *D. fragilis* se nejčastěji využívá Gomoriho trichrom (Obr. 6A) nebo železitý hematoxylin (Johnson et al., 2004; Stark et al., 2005a, 2010a; Kurt et al., 2019; Mathison et al., 2020). Dále se pro barvení takových preparátů používá Celestinské modré barvení (Yang a Scholten, 1976), modifikované Fieldovo barvení (Obr. 6B) (Ragavan a Govind, 2015) nebo černé chlorazalové barvení (Obr. 7) (Van Gool et al., 2003). Podle studie Dobell (1940) je nejlepší variantou pro rozpoznání *D. fragilis* barvení železitým hematoxylinem a 76 let od Dobellovo studie (1940) Damien Stark a jeho tým stále hodnotí barvení modifikovaným železitým hematoxylinem jako nejlepší variantu pro diagnostiku *D. fragilis* společně s SAF fixací (octan sodný - kyselina octová - formalín) (Yang a Scholten, 1977; Stark et al., 2016). K dalším možným fixačním činidlům pro *D. fragilis*, ale i jiné střevní prvoky, jsou například fenol-alkohol-formalin (Burrows, 1967) a sloučeniny na bázi rtuti (Taliaferro a Becker, 1924).



Obr. 6: Životní stadia *Dientamoeba fragilis* v roztěrech stolice s použitím různých barvicích metod - **(A)** Stádium trofozoita v roztěru stolice barvené Gomoriho trichromem (adaptováno dle publikace Kurt et al. 2019); **(B)** *Dientamoeba fragilis* (df) a *Blastocystis* sp. (bs) ve vzorku stolice pacienta barvené s použitím modifikovaného Fieldova barvení (adaptováno dle publikace Ragavan and Govind 2015).

Podle parazitologických příruček a laboratorních protokolů je doporučováno použít pro diagnostiku různých prvoků více vzorků od jednoho subjektu, a to ideálně tři vzorky odebrané ve třech po sobě jdoucích dnech (Garcia, 2007). Autoři studie van Gool et al. (2003) se zabývali rozdílem v úspěšnosti detekce parazitů mezi vyšetřením pouze jednoho a poté tří vzorků od jednoho subjektu. Vzorky byly odebrány od celkem 544 pacientů při preventivní parazitologické prohlídce. Jako trvalé barvení roztěrů trusu bylo použito chlorazolové černé barvivo spolu se SAF fixací (Obr. 7). Tato studie se zaměřila na 11 druhů prvoků (tj., *G. lamblia*, *E. histolytica/dispar*, *D. fragilis*, *C. cayetanensis*, *E. bienersi*, *B. hominis*, *I. bütschlii*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *C. mesnili*, *E. nana*) a tři helminty (tj. *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *H. nana*). Z celkově 544 subjektů bylo identifikováno jako pozitivních pro parazity 209 v případě použití tří vzorků od jednoho subjektu a pouze 106 v případě vyšetření jednoho vzorku. Konkrétně *D. fragilis* byla zjištěna u 45 pacientů. Z toho ve 30 případech byl prvek detekován v prvním a třetím vzorku a v 15 případech pouze v jednom vzorku. Závěrem autoři této studie doporučují pro diagnostiku *D. fragilis* použít více vzorků

od jednoho pacienta, a to i po ukončení léčby. Studií zabývajících se vyšetřováním více vzorků od jednoho subjektu u *D. fragilis* bylo již provedeno více (Hiatt et al., 1995; Cartwright, 1999). Ve studii Hiatt et al. (1995) se autorům podařilo zachytit o 31,1 % více pozitivních případů v případě opakovaného vyšetření jednoho subjektu.



Obr. 7: Trofozoit *Dientamoeba fragilis* detekovaný ve vzorku stolice fixované octanem sodným – kyselina octová – formalín a následně barveno pomocí (A) Lugolova roztoku a (B) chlorazolové černé barvy, (adaptováno dle publikace van Gool et al., 2003).

Pro diagnostiku *D. fragilis* je také důležité mít dostatečnou zkušenost pro odlišení jejich trofozoitů od trofozoitů *Blastocystis* sp. Tito dva prvoci mohou být snadno zaměněny z důvodu podobného vzhledu i velikosti trofozoita a cysty pod mikroskopem. Například autoři studie Ragavan a Govind (2015) použili pro snadnější odlišení těchto dvou prvků modifikované Fieldovo barvení. Toto barvení jasně zvýraznilo dvě jádra v životních stadiích prvoka *D. fragilis*, což je jeho typickým znakem (Dobell, 1940; Stark et al., 2014).

4.1.2. Kultivace

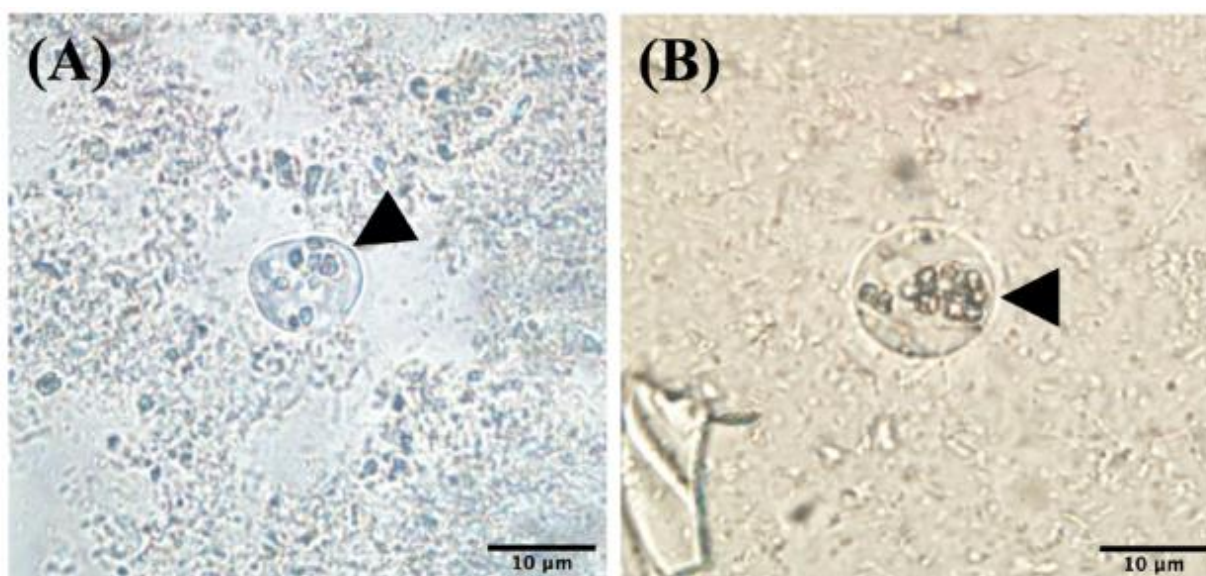
Kromě barvení roztěrů stolice se pro diagnostiku *D. fragilis* dříve hojně využívala také kultivační metoda (Stark et al., 2016). Převážně se používala dvoufázová média. Z pohledu diagnostiky *D. fragilis*, obdobně jako u jiných prvků, se v současné době kultivace posunuje do pozadí a využívají se především molekulární metody, které jsou citlivější (Stark et al.,

2016). Přesto i v současné době vznikají práce, které se zabývají kultivací *D. fragilis* (Kurt et al., 2019).

Nejčastěji používanými médii pro kultivaci jsou Dobellovo médium (Jepps a Dobell, 1918; Dobell, 1940), Robinsonovo médium (Robinson, 1968 a;b), Boeck-Drbohlavovo médium (Drbohlav a Boeck 1925) a TYGM-9 médium (Diamond, 1982). Jako první se autor studie Dobell (1940) snažil vytvořit monoxenickou kulturu *D. fragilis* z důvodu přerůstání *Blastocystis* sp.. Dobellovo médium se skládá z koňského séra, zředěných vaječných bílků v Ringerově roztoku a rýžového škrobu. V tomto médiu rostla *D. fragilis* překvapivě nejlépe při 41 °C (Dobell, 1940). Velmi často je také používané Robinsonovo médium, které má široké uplatnění při diagnostice řady střevních prvoků nejen u *D. fragilis* (Robinson 1968 a;b).

Autoři studie Kurt et al. (2019) zhodnotili rozdíly v sensitivitě a efektivitě tří médií pro kultivaci *D. fragilis*, a to Robinsonovo médium (RM), Dobellovo médium (DM) a Talisovo médium (TM). Zjistili, že pro krátkodobou kultivaci spojenou s detekcí *D. fragilis* nejvíce vyhovuje Robinsonovo médium. V této studii bylo zahrnuto 104 vzorků stolice od pacientů s gastrointestinálními problémy. Prvok *D. fragilis* byl úspěšně detekován v 11 vzorcích. Všech 11 pozitivních vzorků bylo úspěšně kultivováno v RM, v DM tři vzorky a v TM čtyři vzorky (Obr. 8). Autoři vyhodnotili výhody a nevýhody jednotlivých médií. Přestože Robinsonovo médium se ukázalo být jako nejvhodnější pro kultivaci a diagnostiku *D. fragilis*, jeho nevýhodou je přerůstání *Blastocystis* sp. na úkor *D. fragilis* v případě smíšené kolonizace vyšetřovaného subjektu. Proto není vhodné Robinsonovo médium pro dlouhodobé udržení kultury *D. fragilis* v laboratorních podmínkách. Tento problém nebyl pozorován u Dobellova média, nicméně jeho nevýhodou je nižší citlivost a také časově a finančně náročná příprava.

Autoři studie Stark et al. (2010a) porovnávali citlivost mezi barvením roztěrů stolice a kultivační diagnostikou, přičemž kultivace vykazovala vyšší sensitivitu. Dále testovali úspěšnost kultivace ve dvou médiích, a to modifikované Boeck-Drbohlavovo médium a jako druhé TYGM-9. Z celkem 650 vzorků bylo s použitím Boeck-Drbohlavova média odhaleno 14 pozitivních vzorků a TYGM-9 médiem pouze deset. Oproti tomu pomocí barvení roztěrů stolice železitým hematoxylinem a jejich následným zhodnocení mikroskopicky bylo detekováno 12 pozitivních vzorků z 650.



Obr. 8: Kultura trofozoitů *Dientamoeba fragilis* v Robinsonově médiu: **(A)** živý trofozoit vykazující pohyb, zvětšení 400×, fázový kontrast; **(B)** trofozoit, který obsahuje škrobová zrna, zvětšení 400× (adaptováno dle publikace Aykur et al., 2019).

4.2. Molekulární diagnostika

V současné době se pro detekci střevních prvků využívají zejména molekulární přístupy, a to pro jejich vyšší citlivost a specifitu oproti výše popsaným tradičním metodám. Pro detekci *D. fragilis* pomocí konvenční PCR (cPCR) a Real-Time PCR (qPCR) jsou zapotřebí specifické primery, a v případě qPCR se také využívá Tagman systém. Molekulární diagnostika umožňuje rychlou a citlivou detekci *D. fragilis* přímo z klinických vzorků v diagnostických laboratořích (Stark et al., 2016). Kromě toho je molekulární diagnostika

pro *D. fragilis* v současnosti doporučována kvůli fragilnímu trofozoitovi tohoto prvoka. Vzhledem k neustále častějšímu používání molekulární diagnostiky, epidemiologické studie odhalují vyšší prevalence *D. fragilis* (Jimenez-Gonzalez et al., 2012; Sarafraz et al., 2013; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., 2015; Jokelainen et al., 2017).

4.2.1. Konvenční PCR

Konvenční PCR (cPCR) umožňuje amplifikaci úseku DNA pomocí primerů a DNA polymerázy (Šmarda et al., 2005). Celý tento proces probíhá v blokovém termocykleru a získaný ampikon pomocí PCR cyklů je následně vizualizován v agarózovém gelu s ethidium bromidem v elektroforéze. DNA produkt požadované délky je možné ověřit Sangerovým osekvenováním, případně jsou výsledné sekvence použity pro rozlišení genotypů apod. U prvoka *D. fragilis* se pro cPCR diagnostiku využívají oblasti genu pro malou ribosomální podjednotku (SSU rRNA). Její variabilnější oblasti jsou vhodné pro rozlišení genotypu *D. fragilis* (Stark et al., 2005a). Autoři studie Johnson a Clark (2000) jako první detekovali *D. fragilis* pomocí cPCR metody, která nebyla druhově specifická. Použili univerzální primery pro amplifikaci celého genu SSU rRNA trichomonád o velikosti 1.7 kbp. Takový přístup je ovšem náročný, a proto později autoři Peek et al. (2004) navrhli primery, označené DF1 a DF4, vysoce specifické pouze pro část SSU rRNA *D. fragilis* o délce 662 bp. Dále autoři studie Stark et al. (2005a) vyvinuli protokol pro cPCR, který je vysoce citlivý a specifický pro *D. fragilis*. Navrhli sadu primerů, označených DF400 a DF1250, které amplifikují část genu SSU rRNA o velikosti 850 bp.

4.2.2. Real-Time - PCR

Kromě detekce cílené části DNA, je výhodou Real-Time PCR (qPCR) kvantifikování DNA s využitím specifických primerů a fluorescenčně značených sond (Šmarda et al., 2005). Prostřednictvím fluorescenčního signálu je možné detekovat a kvantifikovat množství DNA v reakci. Systém využívající fluorescenčně značené sondy má k fluoroforům navíc ještě zhášec, který překrývá svým absorpčním spektrem emisní spektrum fluoroforů. DNA-polymeráza svojí exonukleázovou aktivitou 5' → 3' oddělí molekulu zhášec a tím dojde k emisi fluorescence. Dodnes bylo pro detekci *D. fragilis* popsáno několik qPCR protokolů (Stark et al., 2006a; Verweij et al., 2007; De Canale et al., 2009). Nejvíce používaným je protokol optimalizovaný ve studii Verweij et al. (2007). Tito autoři využili primery (Df-124F,

Df221R) a Taqman sondu (Df-172revT) amplifikující oblast pro 5.8S rRNA o velikosti 98 bp. Autoři studie Stark et al. (2006a) vyvinuli další qPCR diagnostický protokol. Navrhli primery a Taqman sondu podle sekvencí genu SSU rRNA získaných z databáze *GenBank*, přičemž primery amplifikují část SSU rRNA o velikosti 78 bp.

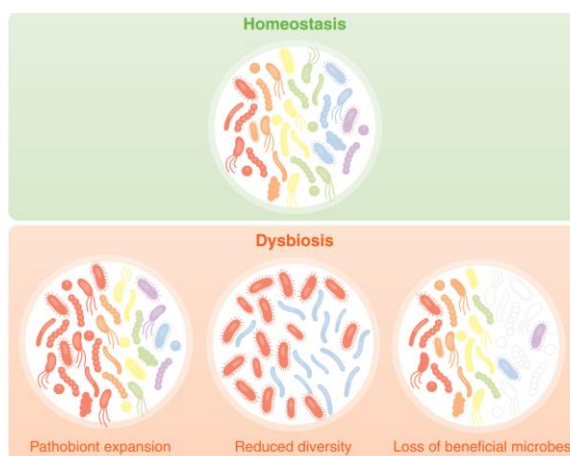
4.3. Diagnostika založená na imunologii

V případě klinicky významných prvoků jako je například *G. intestinalis* nebo *E. histolytica*, se využívají imunologické metody – imunofluorescenční mikroskopie, imunochromatografické testy nebo enzymová imunoanalýza, a to i ve formě komerčních kitů (Alles et al., 1995; McHardy et al., 2014). Diagnostika založená na imunologii velmi často využívá reakce antigenu s protilátkou.

Pro detekci *D. fragilis* imunologickými metodami není v současné době dostupný komerční kit. Autorům studie Chan et al. (1993) se povedlo vytvořit fluorescenčně značenou protilátku pro diagnostiku *D. fragilis* pomocí fluorescenčního mikroskopu. Francis Chan a jeho kolegové použili pro detekci tohoto prvoka nepřímé značení protilátkami. Při takové diagnostice se využívají dva druhy protilátek. První typ protilátek se naváže na antigen (v tomto případě antigen *D. fragilis*) a v následném kroku se druhý typ protilátek nesoucí fluorescenční značení (v tomto případě fluoresceinem) naváže na první typ protilátek. Tímto způsobem bylo vyšetřeno 155 vzorků stolice a *D. fragilis* byla diagnostikována u devíti vzorků. Přesnost vyšetření byla potvrzena barvením roztěru stolice železitým hematoxylinem, kdy byl detekován stejný počet pozitivních vzorků.

5. Střevní mikrobiom a *Dientamoeba fragilis*

Střevní organismy vytvářejí výjimečně složitý mikrobiální ekosystém (Petersen a Round, 2014; Levy et al., 2017). Tento ekosystém se skládá z bakterií, archeí, prvoků a virů. Všechny tyto organismy společně interagují, a to jak mezi sebou, tak i se svým hostitelem. Diverzita střevního mikrobiomu byla ještě docela nedávno opomíjena, detailnější informace zejména o bakteriálních populacích a v poslední době i o prvocích s sebou přinesl až rozvoj sekvenování nových generací, tzv. *Next-generation sequencing* (Gut Microbiota for Health; NIH Human Microbiome Project; Lozupone et al., 2012; Lukeš et al., 2015; Chabé et al., 2017; Stensvold a van der Giezen, 2018). Snížení diverzity nebo kompoziční změny v populacích střevních organismů (tzv. dysbióza) může mít vliv na celkovou homeostázu střev (Obr.9) (Petersen a Round, 2014). Podle hypotézy „*Old friends*“ pokud dojde k rozvoji dysbiózy střevního mikrobiomu, naruší se funkce imunitního systému (Rook, 2012; Rook et al., 2014, 2017). Podobně také Biome depleční hypotéza pojednává o důsledcích dysbiózy (Parker a Ollerton, 2013; Parker, 2014). Právě narušením velmi křehké rovnováhy a dynamiky střevního mikrobiomu může dojít k aktivaci pro-zánětlivých mechanismů, a to je zřejmě jeden z faktorů přispívajících k rozvoji zánětlivých onemocnění (Sobotková et al., 2019). K takovým onemocněním se řadí idiopatické střevní záněty, roztroušená skleróza, diabetes mellitus 1. typu, alergie či astma (Scheperjans et al., 2015; Putignani et al., 2016; O'Toole a Paoli, 2017; Hirt, 2019).



Obr. 9: Grafické znázornění změn v diverzitě mikrobiomu (převzato z publikace Petersen a Round, 2014).

K faktorům ovlivňující diverzitu mikrobiomu patří geografická poloha, pohlaví, věk či způsob stravování (Yatsunenko et al., 2012; Rook et al., 2017). Bakteriální část mikrobiomu tvoří zřejmě jeho nejhojnější část, které bylo věnováno nejvíce pozornosti (Gut Microbiota for Health; NIH Human Microbiome Project). Nicméně v posledních několika letech se pozornost začíná upírat i na eukaryotickou složku mikrobiomu, tzv. eukaryom (Lukeš et al., 2015). Eukaryom zahrnuje helminty a prvoky, ale míra vlivu této části mikrobiomu na zdraví musí být teprve odhalena (Lukeš et al., 2015; Sobotková et al., 2019). V případě střevních prvoků, nedávné epidemiologické studie odhalují, že prevalence komenzálních druhů je u zdravé populace vyšší, než se původně předpokládalo. Jako příklady slouží právě střevní prvoci *D. fragilis* a *Blastocystis* sp. (Röser et al., 2013b; Scanlan et al., 2014; Krogsgaard et al., 2015; Stensvold a van der Giezen, 2018; Lhotská et al., 2020).

V případě studií zaměřených na výzkum interakcí mezi střevními prvoky a bakteriálními populacemi převažují výzkumy střevního prvoka *Blastocystis* sp. (Stensvold a van der Giezen, 2018; Billy et al., 2021), zatímco studie u *D. fragilis* stále chybí. Právě u prvoka *Blastocystis* sp. byl nedávno zjištěn fakt, že jeho přítomnost ve střevě hostitele je často spojena s vyšší bakteriální diverzitou (Andersen et al., 2015; Nieves-Ramirez et al., 2018). Kromě toho autoři experimentální studie Billy et al. (2021) odhalili příznivý vliv dlouhodobé kolonizace *Blastocystis* suptypu ST3 na chemicky indukovaný zánět u potkanů.

Přestože obdobný výzkum na *D. fragilis* zatím neprobíhá, komenzální role je mu víceméně prisuzována na základě častějšího výskytu v populaci zdravých lidí (Kašparová, nepublikované výsledky; Stensvold a van der Giezen, 2018). Přesto v případě prvoka *D. fragilis* se může vliv jeho kolonizace na hostitelský organismus a střevní mikrobiom měnit s věkem, protože u dětí je stále považován za možného patogena (de Wit et al., 2001; Ögren et al., 2015). Jedna ze studií naší Laboratoře parazitární terapie (Biologické centrum AV ČR) odhalila 25 % prevalenci *D. fragilis* v populaci zdravých lidí (tj. bez střevních potíží a onemocnění) (Kašparová, nepublikovaná data).

6. Výskyt *Dientamoeba fragilis* u primátů

Vzhledem ke zjištěnému nízkému počtu studií o výskytu střevního prvoka *D. fragilis* u nehumánních primátů v průběhu mé rešeršní práce, jsem se rozhodla zařadit i kapitulu o jeho výskytu u lidí. Přehled epidemiologických dat demonstruje neustálou rozpačitost nad posouzením role *D. fragilis* v hostitelském organismu.

6.1. *Dientamoeba fragilis* u člověka

U člověka je *D. fragilis* prvok s kosmopolitním rozšířením a velmi rozdílnou prevalencí napříč různými populacemi, která se pohybuje od 0,3 až 91% (Preiss et al., 1990; Chan et al., 1996; Stark et al., 2007). Prevalence *D. fragilis* je pravděpodobně závislá na sledované skupině lidí, která se liší životním stylem (městský versus život na vesnici), věkem, pohlavím, ale také na zvolené diagnostické metodě (Barratt et al., 2011a; Garcia, 2016; Stark et al., 2016).

Podle výsledků epidemiologických studií je výskyt *D. fragilis* vyšší u dětí do desátého roku života a dále u žen ve věku okolo 40 let (Norberg et al., 2003; Stark et al., 2010a; Röser et al., 2013b; Jokelainen et al., 2017). Autoři těchto studií si to vysvětlují nižšími hygienickými návyky u dětí, a u žen blízkým kontaktem s dětmi. U dětí ve věkovém rozmezí 4 až 6 let byla zjištěna vysoká prevalence, a to 50 % opět v další studii naší laboratoře (Kašparová, nepublikovaná data). Vliv cestování nebyl na výskyt *D. fragilis* zaznamenán u dospělých ani u dětí (Stark et al., 2010a; Jokelainen et al., 2017).

Vzhledem ke stále nevyjasněné roli *D. fragilis* ve střevním ekosystému člověka (tzn., zda se jedná o patogena nebo komenzála) převažují prevalenční studie u pacientů s různými střevními onemocněními (pro více informací viz Tabulka 2). Kromě toho celou situaci ohledně epidemiologických studií na *D. fragilis* ještě donedávna komplikovala také absence citlivých diagnostických přístupů (de Wit et al., 2001; Stark et al., 2005b, 2010a; Holtman et al., 2017; Jokelainen et al., 2017; Brands et al., 2019). V současnosti stále chybí studie zkoumající výskyt *D. fragilis* u zdravých lidí, ale v budoucnu budou publikovaná data naší laboratoře, která byla zmíněná již výše (Kašparová, nepublikovaná data). Přesto sporadické informace o výskytu a prevalenci *D. fragilis* u zdravých lidí existují, protože byli zařazováni jako subjekty do kontrolních skupin ve studiích zaměřených na pacienty.

Autoři studie Stark et al. (2005b) zjišťovali výskyt *D. fragilis* ve vzorcích stolice u 6750 pacientů s průjemovým onemocněním. Byla zařazena také kontrolní skupina zdravých subjektů, od kterých bylo získáno 900 vzorků stolice. Pro detekci *D. fragilis* byla použita metoda barvení roztěrů stolice železitým hematoxylinem. Posléze byly všechny zjištěné pozitivní vzorky na *D. fragilis* vyšetřeny také pomocí cPCR pro ověření výsledků. Přítomnost *D. fragilis* byla zjištěna u 60 pacientů (60/6750), tj 0,9% prevalence. V další studii Damien Stark vyšetřoval vzorky dohromady 750 vzorků jak od pacientů s gastrointestinálními problémy tak asymptomatických jedinců pomocí qPCR (Stark et al., 2010a). *Dientamoeba fragilis* byla detekována u 39 pacientů (39/750), tj. 5,2 %. Z těchto 32 pacientů uvádělo gastrointestinální problémy.

Tab. 2: Přehled vybraných studií zaměřených na výskyt *Dientamoeba fragilis* (*D. f.*) u lidí. V tabulce jsou uvedeny názory na patogenitu a diagnostické přístupy (cPCR- konvenční PCR, qPCR- Real-time PCR).

Studie	<i>D. f.</i> patogenní	<i>D. f.</i> nepatogenní	Diagnostika	Věkové kategorie
de Wit et al. (2001)	Pouze děti	Ano	Hematoxylin	všechny
Stark et al. (2005b)	Ano	Ne	Hematoxylin/PCR	všechny
Stark et al. (2010a)	Ano	Ne	qPCR	všechny
Yakoob et al. (2010)	Ano	Ne	cPCR	všechny
De Jong et al. (2014)	Ne	Ano	qPCR	děti
Bruijnesteijn van Coppensraet et al. (2015)	Ne	Ano	qPCR	všechny
Krogsgaard et al. (2015)	Ne	Ano	qPCR	18-50 let
Ögren et al. (2015)	Ano	Ne	qPCR	děti
Holtman et al. (2017)	Ne	Ano	qPCR	děti
Jokelainen et al. (2017)	Ne	Ano	qPCR	děti
Brands et al. (2019)	Ne	Ano	qPCR/ELISA	děti

Kromě průjemových onemocnění bývá přítomnost *D. fragilis* spojována s funkčním onemocněním střev, a to syndromem dráždivého tračníku (IBS -Irritable Bowel Syndrome) (Yakoob et al., 2010). Autoři studie použili metodu cPCR pro detekci prvoka *D. fragilis* a zaznamenali jej u šesti pacientů s IBS z celkových 171 (tj. 4 %). Naopak v kontrolní skupině čítající 159 zdravých subjektů nebyl prvek detekován vůbec.

Autoři studie Bruijnesteijn van Coppenraet et al. (2015) zjišťovali příčinu infekční gastroenteritidy pomocí multiplexní qPCR. Do studie byly opět zařazeny dvě skupiny, a to pacienti s gastroenteritidou čítající 1515 jedinců a kontrolní skupina zahrnující 1195 zdravých subjektů. Vyšší prevalence *D. fragilis* byla zaznamenána u kontrolní skupiny, a to 37,3 % (446/1195) oproti skupině pacientů s infekční gastroenteritidou, kde byla prevalence 25,7 % (390/1515).

Kromě dosud neobjasněné role *D. fragilis*, se zdá celá situace komplikovaná ještě rozdílným vlivem tohoto prvoka na děti a dospělé. Komenzální role *D. fragilis* se předpokládá u dospělých, zatímco u dětí do 14 let může být spíše patogenem (de Wit et al., 2001). Takový rozdílný vliv *D. fragilis* popsala studie zaměřená na pacienty s gastroenteritidou (de Wit et al., 2001). Gastroenteritida byla ve studii definována symptomy jako je průjem nebo zvracení s alespoň dvěma dalšími příznaky (tj., nevolnost, horečka, bolest břicha nebo krev ve stolici). Byly zařazeny opět dvě skupiny: (i) 857 pacientů a (ii) 574 subjektů do kontrolní skupiny. Subjekty byly rozděleny podle věku do šesti kategorií (tj., <1, 1–4, 5–14, 15–29, 30–59, ≥ 60) v obou skupinách. Celková prevalence *D. fragilis* napříč všemi věkovými skupinami byla vyšší u kontrolní skupiny a to 14,6 % (83/574) oproti skupině pacientů s 10,3 % (88/857). V případě dětí, byl výskyt *D. fragilis* častější výskyt u pacientů s gastroenteritidou. Například v kategorii 5 až 14 let byl prvek zjištěn u 19,8 % pacientů (38/96) oproti kontrolní skupině s 13,6 % prevalencí (7/58). Podobně i v kategorii od jednoho roku do čtyř let výskyt *D. fragilis* častější u pacientů, a to s prevalencí 11 % (15/136) oproti 7,3 % prevalenci u kontrolní skupiny (5/69). Naopak ve věkové kategorii pod jeden roky byla prevalence mezi skupinami téměř srovnatelná (6,1 % u pacientů a 5,9 % kontrolní skupiny).

U pediatrických pacientů v Nizozemí byla od dubna 2011 do dubna 2013 provedena studie s použitím diagnostiky qPCR pro zjištění prevalence *D. fragilis* u dětí s chronickou bolestí břicha (De Jong et al., 2014). U dětí s chronickou bolestí břicha byla *D. fragilis* detekována ve 43,2 % případů (57/132), zatímco u kontrolní skupiny byla odhalena prevalence 50,6 %

(39/77) u kontrolní skupiny. Autoři podle výsledků studie zhodnotili, že přítomnost *D. fragilis* zřejmě nemá přímou souvislost s chronickou bolestí břicha u pediatrických pacientů. Podle analýzy nebyl výsledek statisticky významný.

Další studie u dětí byla provedena přímo ve dvou školských zařízeních ve Švédsku kvůli neustále se opakujícím gastrointestinálním problémům (Ögren et al., 2015). U dětí s gastrointestinálními problémy byla *D. fragilis* detekována v 85,2 % případů (92/108) oproti kontrolní asymptomatické skupině dětí s prevalencí 18 % (10/54). V této studii byla jako diagnostická metoda použita qPCR. Autoři studie Holtman et al. (2017) v Nizozemí vyšetřili 107 vzorků od dětí ve věkové kategorii od šesti do dvanácti lety a *D. fragilis* byla diagnostikována v 55,1 % případů (59/107) pomocí qPCR. Přítomnost *D. fragilis* u těchto dětí korelovala s chronickým průjmem, pro který byla typická měkká a vodnatá stolice, a s únavou. Jako kontrola sloužila skupina asymptomatických sourozenců od výše uvedených dětí. Autoři studie Brands et al. (2019) zabývající se diagnostikou *D. fragilis* pomocí qPCR u nizozemských a belgických dětí a dospívajících s chronickými bolestmi břicha a průjmy (200 subjektů). Byla zařazena i kontrolní skupina 122 zdravých subjektů. Prevalence v kontrolní skupině byla opět vyšší a to 71 % (87/122) než u pacientů s 45 % případů (89/200). Rozdíl prevalence mezi skupinami byl určen jako statisticky významný.

Z výsledků studií výše je zřejmé, že názor na patogenitu *D. fragilis* není jednoznačně uzavřen, i když prevalence tohoto prvoka je vyšší u zdravých jedinců. Přesto pro jasné stanovisko je zapotřebí provést rozsáhlé prevalenční studie ve zdravé populaci lidí (tzn. bez gastrointestinálních potíží). Autoři studií, kteří vyhodnotili *D. fragilis* jako patogenní doporučují léčbu (Stark et al., 2005b, 2010a; Vandenberg et al., 2006; Kurt et al., 2008). Pro terapii je doporučováno použití metronidazolu, clioquinolu, paromycinu a ornidazolu (Kurt et al., 2008; Engsbro et al., 2012; van Gestel et al., 2019). Nejčastěji předepisovaným antiparazitikem u infekce *D. fragilis* je metronidazol (van Gestel et al., 2019).

6.2. Výskyt *Dientamoeba fragilis* u nehumánních primátů

Dientamoeba fragilis se dostává do podvědomí výzkumníků zaměřených na střevní mikrobiom. Kromě lidí se střevní prvoci intenzivně studují také u evolučně příbuzných nehumánních primátů (NHP), ale v případě výskytu *D. fragilis* u NHP existuje stále omezený

počet studií. Oproti tomu střevní prvek *Blastocystis* sp. je u NHP v zajetí i ve volné přírodě zkoumán poměrně intenzivně (např. Petrášová et al., 2011; Vlčková et al., 2018; Renelies-Hamilton et al., 2019; Šejnohová, 2021). Z důvodu evoluční blízkosti je ovšem důležité získat informace o epidemiologii *D. fragilis* u NHP a jeho případném vlivu na hostitelský organismus. Takové znalosti mohou zásadně přispět k rozklíčování vlivu *D. fragilis* na lidské zdraví, rozšířit povědomí o genetické diverzitě (tzn. zda existuje více genotypů) a také zda může docházet k zoonotickým přenosům.

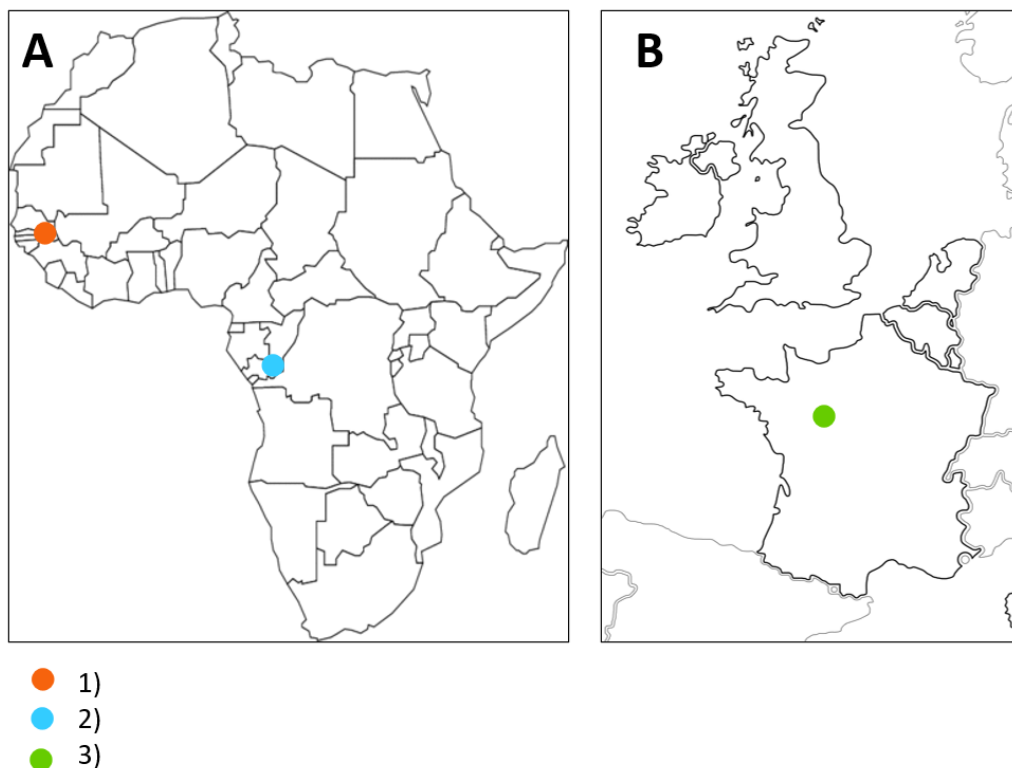
6.2.1. Výskyt *Dientamoeba fragilis* u nehumánních primátů ve volné přírodě

V současnosti je jen velmi málo studií zaměřených na výskyt *D. fragilis* u NHP ve volné přírodě. Tento stav je zřejmě zapříčiněný donedávna používanou složitou diagnostikou, a to barvením roztěrů stolice a kultivačními metodami (viz kapitola 4.1).

První studie zaměřená na výskyt *D. fragilis* u volně žijících NHP byla provedena v první polovině minulého století (Hegner a Chu 1930). Autoři vyšetřili vzorky trusu získaných od 44 jedinců makaka jávského (*Macaca fascicularis philippensis*) z Filipín, konkrétně z ostrova Luzon. Z celkového počtu vzorků pocházelo 28 od samců a 16 od samic. *Dientamoeba fragilis* byla nalezena pouze u dvou jedinců. Diagnostická metoda nebyla v dochovaných materiálech uvedena. V roce 1966 bylo vyšetřeno 106 jedinců paviána neurčeného druhu (*Papio* sp.) v Keni s použitím nativních roztěrů stolice (Myers, 1968). Ze všech vyšetřených vzorků byla *D. fragilis* nalezena opět u dvou jedinců, což je prevalence 1,88 %.

Průzkum výskytu střevních prvků, včetně *D. fragilis*, u volně žijících populací NHP byl předmětem velmi recentní studie Menu et al. (2021). Autoři studie použili k detekci prvků protokoly pro qPCR metodu. Sledovanými populacemi byli šimpanzi hornoguinejští (*Pan troglodytes verus*) z přírodní rezervace *Dindifelo Community Natural Reserve* v Senegalu a populace goril nížinných západních (*Gorilla gorilla gorilla*) z přírodní rezervace *Lesio-Louna Lefini Gorilla Nature Reserve* v Republice Kongo (Obr. 10). Cílem bylo zjistit výskyt střevních organismů diagnostikovaných často u lidí u NHP primátů, a to *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Balantiodides coli*, *Blastocystis* sp., *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Cystoisospora belli* a dvou druhů mikrosporidií *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon intestinalis*. *Dientamoeba fragilis* byla v této studii detekována u šimpanzů s 25 % prevalencí (12/48). Ze všech sledovaných organismů bylo u NHP nalezeno pět druhů. Kromě *D. fragilis* byli ještě detekováni *G. intestinalis*, *B. coli*,

Blastocystis sp. a *E. intestinalis*. Největší prevalence napříč celou studií byla pro prvoka *Blastocystis* sp., a to 98,5 % (66/67).



Obr. 10: Místa odebrání vzorků (1) přírodní rezervace *Dindifelo community*; (2) přírodní rezervace *Lesio-Louna Lefini*; (3) zoologická zahrada *Beauval* ve Francii (adaptováno dle <https://mapaeuropy.eu/wp-content/uploads/Politicka-mapa-zapadni-Evropy.jpg> http://www.supercoloring.com/sites/default/files/styles/coloring_medium/public/cif/2009/09/Africa-map-coloring-page.gif).

6.2.2. Výskyt *Dientamoeba fragilis* u nehumánních primátů v zajetí

Výskyt *D. fragilis* u NHP v zajetí byl popsán u goril západních nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*), vřešťanů pláštíkových (*Alouatta palliata aequatorialis*) a paviánů (*Papio* sp.).

Studie na paviánech Myers (1986) zmíněná již výše, pokračovala v detekci *D. fragilis* i po jejich odchytu a převezení 106 jedinců do zajetí do San Antonia v Texasu v roce 1966. Zde probíhal výzkum dalších 18 měsíců. *Dientamoeba fragilis* byla u jedinců detekována až do šestého měsíce po transportu a poté vymizela.

Jedna z recentnějších studií zaměřených na výskyt *D. fragilis* u velkého spektra druhů NHP byla provedena v Taronga Zoo v Sydney (Stark et al., 2008). Celkem bylo vyšetřeno 608 vzorků trusu od různých živočišných druhů a mezi nimi byl trus od několika druhů NHP. Zahrnuté byly vzorky od šesti druhů NHP: gorila nížinná (*Gorilla gorilla gorilla*) (n=10), šimpanz (*Pan troglodytes*) (n=19), kočkodan Brazzův (*Cercopithecus neglectus*) (n=2), hulman uzdičkový (*Trachypithecus francoisi*) (n=2), orangutan bornejský (*Pongo pygmaeus*) (n=4) a chápan černý (*Ateles paniscus*) (n=8). *Dientamoeba fragilis* byla překvapivě detekována pouze u tří gorilích jedinců z celkově deseti vyšetřených. U dalších pěti druhů NHP nebyla *D. fragilis* zjištěna vůbec. Jako primární diagnostická metoda byla v této studii využita mikroskopie roztěrů trusu barvených modifikovaným hematoxylin železem. Následně byly pozitivní vzorky vyhodnocené mikroskopicky analyzovány s použitím qPCR diagnostiky. Nicméně tento detekční přístup nemusí mít zcela optimální vypovídající hodnotu, protože mikroskopické metody mají v případě *D. fragilis* nízkou sensitivitu a také vyšetření jednoho vzorku není zcela dostačující (více informací v kapitole 4.1). Kromě *D. fragilis*, se tato studie zaměřila na detekci výskytu také jiných druhů střevních prvoků a byly zjištěny tyto – *Blastocystis* sp., *Endolimax nana*, *Entamoeba* sp. a *Giardia intestinalis*. Prevalence těchto prvoků nebyla uvedena.

Další studie zaměřená na detekci *D. fragilis* u NHP v zajetí byla provedena v soukromém rehabilitačním centru Bilsa v Ekvádoru (Helenbrook et al., 2015). Sledovaným druhem NHP byl vřešťan plášťový (*Alouatta palliata aequatorialis*). Celkem bylo vyšetřeno 96 vzorků trusu od 19 skupin vřešťanů a čtyři vzorky od samotářských jedinců tohoto druhu. Pro detekci *D. fragilis* byla použita metoda barvení roztěru trusu pomocí Wheatleovo trichromu (modifikovaný Gomoriho trichrom). Ve výsledku byla zjištěna prevalence 3 %. (3/96). K dalším zjištěným prvokům patřili *Balantoides* sp. (9 %), *Blastocystis* sp. (60 %), *Chilomastix* sp. (4 %), *Entamoeba* sp. (56 %), a *Iodamoeba* sp. (5 %). Kromě toho byly všechny vzorky trusu vyšetřeny také flotací a sedimentací dle Hendrix a Robinson (2006). Na základě těchto metod byli detekováni helminti – *Capillaria* sp. (78 %), *Enterobius* sp. (3 %), *Strongyloides* sp. (88 %) *Trypanoxyuris* sp. (12 %) a *Controrchis* sp. (15 %).

Studie Menu et al. (2021), již zmíněná v předchozí kapitole, zahrnovala také skupinu devíti goril nížinných (*Gorilla gorilla*) v zoologické zahradě Beauval ve Francii (Obr. 10). Jak bylo zmíněno v kapitole 6.2.1, tak bylo sledováno deset druhů střevních organismů U žádného

gorilího jedince nebyla *D. fragilis* detekována. Byly zjištěny pouze *B. coli* u 77,8 % jedinců (7/9), *Blastocystis* sp. u 88,9 % (8/9).

Kromě epidemiologických studií byla popsána jedna kazuistika o symptomatickém průběhu infekce *D. fragilis* u gorily nížinné západní (*Gorilla gorilla gorilla*) v rehabilitačním centru *Limbe Wildlife Centre* (LWC) v Kamerunu (Lankester et al., 2010). Sedmiletá gorilí samice vykazovala symptomy jako chronický průjem, deprese a v důsledku dehydratace také velká ztráta hmotnosti v průběhu osmi týdnů. Samice patřila do deseti-členné skupiny a v rehabilitačním centru žila šest let před rozvojem popisovaného gastrointestinálního onemocnění. Pro parazitologické vyšetření byly použity tyto metody – nativní roztěr trusu, formol-etherová sedimentace, roztěr trusu s Fieldovým barvením a modifikovaná kultivační metoda s využitím černého uhlí. Byli identifikováni následující parazité – *Balantioides coli*, *Blastocystis* spp., *Pentatrichomonas hominis* a *Strongyloides fuelleborni*. Následovala terapie s využitím paromomycin sulfátu (30 mg/kg po dobu pěti dní), 1% roztokem ivermektinu (0,2 mg/kg) a amoxycilin-klavulánatem (14 mg/kg). Přesto že tento terapeutický postup eliminoval popsané parazity, zdravotní stav gorily se nezlepšil. Z původní váhy 45 kg se gorila dostala na 33 kg i přes popsanou léčbu, spolu s tím došlo k velké ztrátě srsti a rozvinutí anémie. Následující mikroskopické vyšetření roztěru trusu barveným Fieldovou metodou odhalil dvoujaderné kulaté struktury, které byly určeny jako trofozoiti *D. fragilis*. Proto byla u gorily zahájena další léčba s využitím metronidazolu (3× denně 500 mg po dobu 10 dní). Již během prvního dne se zdravotní stav gorily výrazně zlepšil, začala být aktivní a přijímat potravu. Konzistence trusu se vrátila k normálu. Došlo také ke zlepšení psychického stavu gorily a tělesná hmotnost se začala vracet do původního stavu. Po třech týdnech od této léčby byla gorila zařazena opět do skupiny.

6.3. Zoonotický potenciál *Dientamoeba fragilis*

K fekálně-orálnímu přenosu prvoka *D. fragilis* dochází prostřednictvím jeho cysty, případně vajíček střevních červů (Munasinghe et al., 2013; Röser et al., 2013a; Stark et al., 2014). U řady střevních prvoků může docházet k zoonotickým přenosům, které mohou být vyhodnoceny na základě distribuce jejich genotypů, subtypů nebo asambláží u lidí a zvířat, se kterými jsou v kontaktu (Volf a Horák, 2007). Jako jeden ze stěžejních příkladů může být uveden střevní prvek *Blastocystis* sp., který má širokou vnitrodruhovou diverzitu s popsánými 22 subtypy u savců včetně člověka a NHP (Stensvold a Clark, 2020). Lidé a NHP nejčastěji

sdílejí subtypy ST1, ST2 a ST3 (Stensvold et al., 2007; Petrášová et al., 2011; Clark et al., 2013; Hublin et al., 2021). U *D. fragilis* jsou v současné době známy pouze dva genotypy (Genotyp 1 a Genotyp 2) (Johnson a Clark, 2000; Windsor et al., 2004). Ovšem studie zaměřené na výskyt tohoto prvoka u nehumánních primátů se distribucí jednotlivých genotypů a zoonotickými přenosy nezabývají.

Zoonotický potenciál *D. fragilis* byl popsán v současné době pouze u prasat (Cacciò et al., 2012). V této studii byly porovnány sekvence SSU rDNA získané ze vzorků prasat a jejich ošetřovatelů. Výsledky ukázaly, že jak u lidí, tak u prasat byl Genotyp 1. Proto autoři předpokládají, že došlo k zoonotickému přenosu.

7. Experimentální část

Spolu s mojí rešeršní bakalářskou prací probíhá také experimentální práce v Laboratoři Parazitární terapie na Parazitologickém ústavu Biologického centra AV ČR (České Budějovice). Cílem je zjistit výskyt a prevalenci *D. fragilis* u NHP v českých zoologických zahradách a u jejich ošetřovatelů. Dalším cílem bude zjistit výskyt jednotlivých genotypů *D. fragilis*. Tyto informace by mohly přispět ke zhodnocení případného zoonotického přenosu. Výsledky mojí experimentální práce budou shrnuty v navazující magisterské práci.

7.1. Materiál a metodika

7.1.1. Vzorky

Vzorky exkrementů NHP a jejich ošetřovatelů jsou získávány z českých zoologických zahrad. V současné době máme vzorky z pěti míst, a to Zoopark Na Hrádečku, Zoo Hodonín, Zoo Děčín, Zoo Olomouc a Zoo Brno. Kromě toho stále očekáváme vzorky ze Safari parku Dvůr Králové a Zoo Hluboká nad Vltavou. Od ošetřovatelů jsme obdrželi vyplněné dotazníky s informacemi o cestování, věku, a jaké druhy primátů mají v péči. Tyto informace jsou anonymizované a zpracovány dle zákona č. 101/2000 Sb. O ochraně osobních údajů Tato studie byla zhodnocena jako eticky přípustná a odpovídající rozsahu Etické komise Biologického centra AV ČR v. v. i. v Českých Budějovicích.

7.1.2. Diagnostické metody

Vzorky exkrementů od NHP a lidí jsme obdrželi čerstvé a byly ihned pro přijetí vyšetřeny parazitologickými metodami (flotace, sedimentace) a zpracovány pro účely následujících molekulárních analýz pro detekci střevních prvoků.

Část všech vzorků je uchovávána při teplotě -20°C. Kromě toho byla ze všech vzorků extrahovaná celková DNA s využitím CatchGeneTM Stool DNA kitu (CatchGene Co., Ltd.; Taiwan) dle přiloženého návodu.

Modifikovaná Sheatherova flotace

Ve třetí misce byla část exkrementu z každého vzorku rozmíchána spolu s vodou. Vzniklý homogenát byl poté přefiltrován přes sítko do zkumavek jak pro flotaci (skleněné o objemu 10 ml) tak pro sedimentaci (15 ml Falkonovy zkumavky). V případě flotace následně proběhlo odstředění při 3 min./2000 rpm. Vzniklý supernatant byl odstraněn slitím a zbylý sediment byl zhomogenizován s přidáním modifikovaným Sheatherovým cukrovým roztokem (1,33). Následně byly zkumavky znovu odstředěny při 3 min./2000 rpm. Na závěr byly všechny vzorky vyhodnoceny na přítomnost střevních parazitů s využitím světelné mikroskopie.

MIF Sedimentace (*Merthiolate Iodine Formaldehyde*)

Přibližně 2 ml homogenátu (z třetí misky) z každého vzorku pro MIF sedimentaci v 15 ml Falkonových zkumavkách byly smíchány s 5 ml éteru a 5 ml MIF roztoku. Následně byly zkumavky odstředěny při 3 min./2000 rpm. Ze všech zkumavek byl nakonec slitím odstraněn supernatant a sediment na dně byl vyšetřován mikroskopicky na přítomnost střevních parazitů. Pro zvýraznění struktur byl vzorek na podložním sklíčku obarven kapkou Lugolova roztoku.

7.2. Průběžné výsledky

Současný soubor vzorků zahrnuje 164 vzorků celkem (Tab. 3), z toho 147 od nehumánních primátů (od 31 druhů) a 17 vzorků od ošetřovatelů. V současnosti se v naší databázi nacházejí vzorky 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 hornoguinejský (*Pan troglodytes verus*), tamarín (*Saguinus* sp.), vari (*Varecia* sp.).

Tab. 3: Shrnutí počtu vzorků trusu od nehumánních primátů (NHP) a stolic od ošetřovatelů z českých zoologických zahrad.

ZOO	Počet vzorků	Ošetřovatelé	NHP
Na Hrádečku	15	4	11
Hodonín	7	2	5
Děčín	18	2	16
Olomouc	97	4	93
Brno	27	5	22
Celkem	164	17	147

V dosavadních vzorcích bylo nalezeno osm druhů parazitů, a to *Giardia intestinalis*., *Entamoeba coli*, *Blastocystis* sp., *Chilomastix* sp., *Strongyloides* sp., *Trichuris* sp. a *Troglodytella abrasarti*.

Následně budou všechny vzorky DNA analyzovány qPCR pro detekci *D. fragilis* dle protokolu (Verweij et al., 2004). A také budou pozitivní vzorky genotypizovány s využitím protokolu pro konvenční PCR (Stark et al., 2005a). Celkové výsledky budou shrnuty v mé magisterské práci.

8. Závěr

Během vypracování mé bakalářské práce jsem zjistila, že aktuální počet studií zabývajících se výskytem prvoka *Dientamoeba fragilis* u nehumánních primátů (NHP) v zajetí je velmi omezený. Tudíž moje experimentální práce s cílem zjistit výskyt a prevalenci *D. fragilis* u primátů v zajetí jednoznačně obohatí současnou vědeckou literaturu.

V rámci dílčího cíle shrnutí obecných poznatků o prvoku *D. fragilis* jsem sesumarizovala informace o jeho taxonomickém zařazení, životním cyklu, morfologii životních stádií, genetické diverzitě, hostitelské specifitě, diagnostice a souvislosti se střevním mikrobiomem. Na základě těchto informací jsem zjistila, že dosud není zcela ujasněna role prvoka *D. fragilis* ve střevním ekosystému a lidském zdraví. To znamená, zda se jedná o patogena nebo spíše o komenzála, a zároveň jaký je rozdíl v jeho vlivu na děti a na dospělé. Kromě toho jsem zjistila, že informace o hostitelské specifitě *D. fragilis* jsou velmi sporadické a dosud zahrnují záznamy o výskytu *D. fragilis* pouze u několika živočišných druhů, včetně několika primátů. Těm jsem se ovšem věnovala v samostatné kapitole, protože to byly stěžejní informace pro moji bakalářskou práci.

Dalším a stěžejním cílem bylo provést rešerši o výskytu *D. fragilis* u primátů v zajetí a volné přírodě. Zjistila jsem, že v je velký nedostatek prací v obou případech. Recentní práce popisující výskyt *D. fragilis* u NHP ve volné přírodě existuje jedna, v ní byl tento prvek diagnostikován u šimpanze hornoguinejského (*Pan troglodytes verus*). V minulosti byl prvek *D. fragilis* ve volné přírodě diagnostikován u makaků filipínských (*Macaca fascicularis philippensis*) a druhově neurčených paviánů (*Papio* sp.). Oproti tomu byla v recentních studiích *D. fragilis* u primátů v zajetí zjištěna u vřešťanů pláštíkových (*Alouatta palliata aequatorialis*) a goril nížinných západních (*Gorilla gorilla gorilla*). Také v zajetí byla *D. fragilis* nalezena v minulém století u paviánů (*Papio* sp.) a makaků (*Macaca* sp.)

Poznatky dalšího dílčího cíle mé bakalářské práce o shrnutí zoonotického potenciálu *D. fragilis* navazují na malé množství prací o tomto prvoku u NHP. V současnosti není popsán žádný zoonotický přenos mezi NHP a lidmi. Jediná práce zabývajících se zoonotickým potenciálem *D. fragilis* je u prasat domácích, kde se předpokládá zoonotický přenos na základě nálezů stejného genotypu (Genotyp 1) u prasat i lidí.

9. Seznam citované literatury

- Afzan, M. Y., Sivanandam, S., a Kumar, G. S. (2010). Modified Field's staining-a rapid stain for *Trichomonas vaginalis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 68, 159–162.
- Alles, A. J., Waldron, M. A., Sierra, L. S., a Mattia, A. R. (1995). Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1632–1634.
- Andersen, L. O., Bonde, I., Nielsen, H. B., a Stensvold, C. R. (2015). A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microb. Ecol.*, 91, 1–9.
- Aykur, M., Kurt, C. C., Erdogan, D. D., Avcı, C. B., Vardar, R., Aydemir, S., Girginkardeşler, N., Gündüz, C. a Dagci, H. (2019). Investigation of *Dientamoeba fragilis* prevalence and evaluation of sociodemographic and clinical features in patients with gastrointestinal symptoms. *Acta Parasitol.*, 64, 162–170.
- Banik, G. R., Birch, D., Stark, D., a Ellis, J. T. (2012). A microscopic description and ultrastructural characterisation of *Dientamoeba fragilis*: An emerging cause of human enteric disease. *Int. J. Parasitol.*, 42, 139–153.
- Barratt, J. L. N., Banik, G. R., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T., a Stark, D. (2010). Newly defined conditions for the *in vitro* cultivation and cryopreservation of *Dientamoeba fragilis*: New techniques set to fast track molecular studies on this organism. *Parasitology*, 137, 1867–1878.
- Barratt, J. L. N., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T., a Stark, D. (2011a). A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: Several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes.*, 2.
- Barratt, J. L. N., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T., a Stark, D. (2011b). The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology*, 138, 557–572.
- Billy, V., Lhotská, Z., Jirků, M., Kadlecová, O., Frgelecová, L., Parfrey, L. W., Jirků-Pomajbíková, K. (2021). *Blastocystis* colonization alters the gut microbiome and, in some cases, promotes faster recovery from induced colitis. *Front. Microbiol.*, 12, 1–20.

- Boga, J. A., Rojo, S., Fernández, J., Rodríguez, M., Iglesias, C., Martínez-Camblor, P., Vázquez F., Rodríguez-Guardado A. (2016). Is the treatment of *Enterobius vermicularis* co-infection necessary to eradicate *Dientamoeba fragilis* infection? *Int. J. Infect. Dis.*, 49, 59–61.
- Brands, M. R., Van De Vijver, E., Haisma, S. M., Heida, A., a Van Rheeën, P. F. (2019). No association between abdominal pain and *Dientamoeba* in Dutch and Belgian children. *Arch. Dis. Child.*, 104, 686–689.
- Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S., Dullaert-de Boer, M., Ruijs, G. J. H. M., van der Reijden, W. A., van der Zanden, A. G. M., Weel, J. F. L., Schuurs, T. A. (2015). Case-control comparison of bacterial and protozoan microorganisms associated with gastroenteritis: Application of molecular detection. *Clin. Microbiol. Infect.*, 21, 592.e9–592.e19.
- Burrows, R. B. (1967). A new fixative and technics for the diagnosis of intestinal parasites. *Tech. Bull. Regist. Med. Technol.* 37, 208–212.
- Cacciò, S. M., Sannella, A. R., Manuali, E., Tosini, F., Sensi, M., Crotti, D. a Pozio, E. (2012). Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. *Emerg. Infect. Dis.*, 18, 838–841.
- Camp, R. R., Mattern, C. F. T., a Honirberg, B. M. (1974). Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell I. Electronmicroscopic observations of the binucleate stages II. Taxonomic position and revision of the genus. *J. Protozool.*, 21, 69–82.
- Cartwright, C. P. (1999). Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 2408–2411.
- Čepicka, I., Hampl, V., a Kulda, J. (2010). Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist*, 161, 400–433.
- Chabé, M., Lokmer, A., a Ségurel, L. (2017). Gut protozoa: Friends or foes of the human gut microbiota? *Trends. Parasitol.*, 33, 925–934.
- Chan, D., Barratt, J., Roberts, T., Phillips, O., Šlapeta, J., Ryan, U., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J. a Stark, D. (2016). Detection of *Dientamoeba fragilis* in animal faeces using species specific real time PCR assay. *Vet. Parasitol.*, 227, 42–47.

- Chan, F., Stewart, N., Guan, M., Robb, I., Fuite, L., Chan, I., Diaz-Mitoma, F., King, J., MacDonald, N. a Mackenzie, A. (1996). Prevalence of *Dientamoeba fragilis* antibodies in children and recognition of a 39 kDa immunodominant protein antigen of the organism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 15, 950–954.
- Chan, F. T. H., Ming Xu Guan, a Mackenzie, A. M. R. (1993). Application of indirect immunofluorescence to detection of *Dientamoeba fragilis* trophozoites in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1710–1714.
- Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A., a Stensvold, C. R. (2013). Recent Developments in *Blastocystis* Research. Elsevier., 82, 1-32.
- Crotti, D., Sensi, M., Crotti, S., Grelloni, V., a Manuali, E. (2007). *Dientamoeba fragilis* in swine population: A preliminary investigation. *Vet. Parasitol.*, 145, 349–351.
- De Canale, E., Biasolo, M. A., Tessari, A., Bettanello, S., Besutti, V., a Mengoli, C. (2009). Real Time PCR for *Dientamoeba fragilis*: a comparison between molecular and microscopical approach. *Microbiol. Medica.*, 24, 133–138.
- De Jong, M. J., Korterink, J. J., Benninga, M. A., Hilbink, M., Widdershoven, J., a Deckers-Kocken, J. M. (2014). *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: A case-control study. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 99, 1109–1113.
- De Wit, M. A. S., Koopmans, M. P. G., Kortbeek, L. M., Van Leeuwen, N. J., Bartelds, A. I. M., a Van Duynhoven, Y. T. H. P. (2001). Gastroenteritis in sentinel general practices, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 82–91.
- Diamond, L. (1982). A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen-dwelling protozoa. *J. Parasitol.*, 68, 958–959.
- Dobell, C. (1940). Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man V. The *Endolimax* of macaques. *Parasitology*, 25, 436–467.
- Drbohlav, J., a Boeck, W. (1925). The Cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Natl. Avademy Sci.*, II, 235–238.
- El-Gayar, E. K., Mokhtar, A. B., a Hassan, W. A. (2016). Study of the pathogenic potential of *Dientamoeba fragilis* in experimentally infected mice. *Parasite Epidemiol. Control.*, 1,

136–143.

- Engsbro, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V., a Bytzer, P. (2012). Treatment of *Dientamoeba fragilis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 87, 1046–1052.
- Garcia, L. S. (2007). Diagnostic medical parasitology. Fifth edit. Washington, D.C. : ASM Press.
- Garcia, L. S. (2016). *Dientamoeba fragilis*, one of the neglected intestinal protozoa. *J. Clin. Microbiol.*, 54, 2243–2250.
- Gerbod, D., Edgcomb, V. P., Noel, C., Zenner, L., Wintjens, R., Delgado-Viscogliosi, P., Holder, E., Sogin, M. L. a Viscogliosi, E. (2001). Phylogenetic position of the Trichomonad parasite of Turkeys,. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 48, 498–504.
- Girginkardeşler, N., Kurt, Ö., Kilimcioğlu, A. A., a Ok, Ü. Z. (2008). Transmission of *Dientamoeba fragilis*: Evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. *Parasitol. Int.*, 57, 72–75.
- Gut Microbiota for Health. Dostupné na: <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/> [zobrazeno 4. duben, 2022].
- Hegner, R., a Chu, H. J. (1930). A comparative study of the intestinal protozoa of wild monkeys and man. *Am. J. Hyg.*, 12, 62–108.
- Helenbrook, W. D., Wade, S. E., Shields, W. M., Stehman, S. V., a Whipps, C. M. (2015). Gastrointestinal parasites of ecuadorian mantled howler monkeys (*Alouatta palliata aequatorialis*) based on fecal analysis. *J. Parasitol.*, 101, 341–350.
- Hendrix, C. M. ., a Robinson, E. (2006). Diagnostic parasitology for veterinary technicians. ed. Elsevier - Health Sciences Division.
- Heyworth, M. F. (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*, 23, 1–5.
- Hiatt, R. A., Markell, E. K., a Ng, E. (1995). How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 36–39.
- Hirt, R. P. (2019). Mucosal microbial parasites/symbionts in health and disease: An integrative

- overview. *Parasitology*, 146, 1109–1115.
- Holtman, G. A., Kranenberg, J. J., Blanker, M. H., Ott, A., Lisman-van Leeuwen, Y., a Berger, M. Y. (2017). *Dientamoeba fragilis* colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level. *Fam. Pract.*, 34, 25–29.
- Hublin, J. S. Y., Maloney, J. G., a Santin, M. (2021). *Blastocystis* in domesticated and wild mammals and birds. *Elsevier Ltd.*, 135, 260-282.
- Hussein, E. M., Al-Mohammed, H. I., a Hussein, A. M. (2009). Genetic diversity of *Dientamoeba fragilis* isolates of irritable bowel syndrome patients by high-resolution melting-curve (HRM) analysis. *Parasitol. Res.* 105, 1053–1060.
- Jepps, M. W., a Dobell, C. (1918). *Dientamoeba fragilis* n. g., n. sp., a new intestinal amoeba from man. *Parasitology*, 10, 352–367.
- Jimenez-Gonzalez, D. E., Martinez-Flores, W. A., Reyes-Gordillo, J., Ramirez-Miranda, M. E., Sara Arroyo-Escalante, Romero-Valdovinos, M., Stark, D., Souza-Saldivar, V., Martinez-Hernandez, F., Flisser, A., Olivo-Diaz, A. a Maravilla, P. (2012). *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol. Res.*, 110, 1269–1275.
- Johnson, E. H., Windsor, J. J., a Clark, C. G. (2004). Emerging from obscurity: Biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 553–570.
- Johnson, J. A., a Clark, C. G. (2000). Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4653–4654.
- Jokelainen, P., Jensen, B. H., Andreassen, B. U., Petersen, A. M., Röser, D., Krogfelt, K. A., Nielsen, H. V. (2017). *Dientamoeba fragilis*, a commensal in children in Danish day care centers. *J. Clin. Microbiol.*, 55, 1707–1713.
- Knoll, E. W., a Howell, K. M. (1946). Studies on *Dientamoeba fragilis*; its incidence and possible pathogenicity. *Med. Womans. J.*, 53, 40–46.
- Knowles, R. ;, a Das Gupta, B. M. (1936). Some observations on the intestinal protozoa of macaques. *Indian J. Med. Res.*, 24, 547–556.

- Krogsgaard, L. R., Engsbro, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V., a 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.e2.
- Kurt, Ö., Girinkardeşler, N., Balcioğlu, I. C., Özbilgin, A., a Ok, Ü. Z. (2008). A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of dientamoebiasis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14, 601–604.
- Kurt, O., Girinkardesler, N., Ozbilgin, A., a Zeki Ok, U. (2019). The effectiveness of the Culture for *Dientamoeba fragilis* from the Stool. *Infect. Dis. Clin. Microbiol.*, 1, 34–41.
- Lankester, F., Kiyang, J. A., Bailey, W., a Unwin, S. (2010). *Dientamoeba fragilis*: Initial evidence of pathogenicity in the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *J. Zoo Wildl. Med.*, 41, 350–352.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., a Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nat. Publ. Gr.*, 17, 219–232.
- Lhotská, Z., Jirků, M., Hložková, O., Brožová, K., Jirsová, D., Stensvold, C. R., Kolísko, M. a Jirku-Pomajbíková, K. (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, 1–14.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., a Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota Catherine. *Appita J.* 489, 220–230.
- Lukeš, J., Stensvold, C. R., Jirků-Pomajbíková, K., a Wegener Parfrey, L. (2015). Are human intestinal eukaryotes beneficial or commensals? *PLoS Pathog.*, 11, 7–12.
- Mathison, B. A., Kohan, J. L., Walker, J. F., Smith, R. B., Ardon, O., Ardon, O., Couturier, M., R. (2020). Detection of intestinal protozoa in trichrome-stained stool specimens by use of a deep convolutional neural network. *J. Clin. Microbiol.*, 58, 1–13.
- McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Roger Couturier, M., a Humphries, R. M. (2014). Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 52, 712–720.

- Menu, E., Davoust, B., Mediannikov, O., Akiana, J., Mulot, B., Diatta, G., Levasseur, A., Ranque, S., Raoult, D. a Bittar, F. (2021). Occurrence of ten protozoan enteric pathogens in three non-human primate populations. *Pathogens.*, 10, 1–10.
- Munasinghe, V. S., Vella, N. G. F., Ellis, J. T., Windsor, P. A., a Stark, D. (2013). Cyst formation and faecal-oral transmission of *Dientamoeba fragilis* - The missing link in the life cycle of an emerging pathogen. *Int. J. Parasitol.*, 43, 879–883.
- Myers, B. (1968). Intestinal protozoa of the baboon. *J. Protozol.*, 15, 363-365.
- Nieves-Ramirez, M. E., Partida-Rodriguez, O., Laforest-Lapointe, L. A., Reynolds, L. A., Brown, E. M., Morien, E., Parfrey, L. W., Jin, M., Walter, J., Torres, J., Arrieta, M. C., Ximénez-García, C. a Finlay, B. B. (2018). Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis*. *Host-Microbe Biol.*, 3, 1–18.
- NIH Human Microbiome Project. Dostupné na: <https://hmpdacc.org/hmp/> [zobrazeno 4. dubna , 2022].
- Noble, G. A., a Noble, E. R. (1952). *Entamoebae* in farm mammals. *J. Parasitol.*, 38, 571–595.
- Norberg, A., Nord, C. E., a Evengård, B. (2003). *Dientamoeba fragilis* - A protozoal infection which may cause severe bowel distress. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9, 65–68.
- O'Toole, P. W., a Paoli, M. (2017). The contribution of microbial biotechnology to sustainable development goals: microbiome therapies. *Microb. Biotechnol.*, 10, 1066–1069.
- Ockert, G. (1990). Symptomatology, Pathology, epidemiology, and diagnosis of *Dientamoeba fragilis*. *Trichomonands Parasit. Humans.*, 394–410.
- Ögren, J., Dienus, O., Löfgren, S., Einemo, I. M., Iveroth, P., a Matussek, A. (2015). *Dientamoeba fragilis* prevalence coincides with gastrointestinal symptoms in children less than 11 years old in Sweden. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 34, 1995–1998.
- Ögren, J., Dienus, O., Löfgren, S., Iveroth, P., a Matussek, A. (2013). *Dientamoeba fragilis* DNA detection in *Enterobius vermicularis* eggs. *Pathog. Dis.*, 69, 157–158.
- Ogunniyi, T., Balogun, H., a Shasanya, B. (2014). Ectoparasites and endoparasites of peridomestic house-rats in Ile-Ife, Nigeria and implication on human health. *Iran. J.*

- Parasitol.*, 9, 134–140.
- Parker, W. (2014). The „hygiene hypothesis" for allergic disease is a misnomer. *BMJ.*, 349, 10–11.
- Parker, W., a Ollerton, J. (2013). Evolutionary biology and anthropology suggest biome reconstitution as a necessary approach toward dealing with immune disorders. *Evol. Med. Public Heal.*, 2013, 89–103.
- Peek, R., Reedecker, F. R., a van Gool, T. (2004). Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 631–635.
- Petersen, C., a Round, J. L. (2014). Microreview defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell. Microbiol.*, 16, 1024–1033.
- Petrášová, J., Uzlíková, M., Kostka, M., Petrželková, K. J., Huffman, M. A., a Modrý, D. (2011). Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. *Int. J. Parasitol.*, 41, 1113–1120.
- Preiss, U., Ockert, G., Bromme, S., a Otto, A. (1990). *Dientamoeba fragilis* infection, a cause of gastrointestinal symptoms in childhood. *Klin. Padiatr.*, 202, 120–123.
- Putignani, L., Del Chierico, F., Vernocchi, P., Cicala, M., Cucchiara, S., a Dallapiccola, B. (2016). Gut microbiota dysbiosis as risk and premorbid factors of IBD and IBS along the childhood-adulthood transition. *Inflamm. Bowel Dis.*, 22, 487–504.
- Ragavan, A. D., a Govind, S. K. (2015). Modified fields' stain: ideal to differentiate *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* sp. *Parasitol. Res.*, 114, 1163–1166.
- Renelies-Hamilton, J., Noguera-Julian, M., Parera, M., Paredes, R., Pacheco, L., Dacal, E., Saugar, J. M., Rubio, J. M., Poulsen, M., Köster, P. C. a Carmena, D. (2019). Exploring interactions between *Blastocystis* sp., *Strongyloides* spp. and the gut microbiomes of wild chimpanzees in Senegal. *Infect. Genet. Evol.*, 74, 104010.
- Robinson, G. L. (1968a). Laboratory cultivation of some human parasitic amoebae. *J. Gen. Microbiol.*, 53, 69–79.
- Robinson, G. L. (1968b). The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 62, 285–294.

- Rook, G. A. W. (2012). Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 42, 5–15.
- Rook, G. A. W., Raison, C. L., a Lowry, C. A. (2014). Microbial ‘Old friends’, immunoregulation and socioeconomic status. *Clin. Exp. Immunol.*, 177, 1–12.
- Rook, G., Bäckhed, F., Levin, B. R., McFall-Ngai, M. J., a McLean, A. R. (2017). Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *The Lancet.*, 390, 521-530.
- Röser, D., Nejsum, P., Carlsgart, A. J., Nielsen, H. V., a Stensvold, C. R. (2013a). DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. *Exp. Parasitol.*, 133, 57–61.
- Röser, D., Simonsen, J., Nielsen, H. V., Stensvold, C. R., a Mølbak, K. (2013b). *Dientamoeba fragilis* in Denmark: Epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1303–1310.
- Ryan, U., a Zahedi, A. (2019). Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective. *Adv. in Parasitol.* 106, 209-254.
- Sarafraz, S., Farajnia, S., Jamali, J., Khodabakhsh, F., a Khanipour, F. (2013). Detection of *Dientamoeba fragilis* among diarrheal patients referred to Tabriz health care centers by nested PCR. *Trop. Biomed.* 30, 113–118.
- Sawangjaroen, N., Luke, R., a Procivl, P. (1993). Diagnosis by faecal culture of *Dientamoeba fragilis* infections in Australian patients with diarrhoea. *Trop. Med.*, 87, 163–165.
- Scanlan, P. D., Toole, P. W. O., Cotter, P. D., a Vos, W. M. De (2014). The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microb. Ecol.*, 90, 326–330.
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K. a Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson’s disease and clinical phenotype. *Mov. Disord.*, 30, 350–358.
- Šejnohová, A. (2021). Výskyt střevního prvoka *Blastocystis* sp . u primátů v zajetí.
- Silberman, J. D., Clark, C. G., a Sogin, M. L. (1996). *Dientamoeba fragilis* shares a recent

- common evolutionary history with the trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 76, 311–314.
- Šmarda, J., Dostál, J., Pantůček, R., Růžicková, V., a Koptíková, J. (2005). *Metody molekulární biologie*. 1.vydání. Masarykova univerzita.
- Sobotková, K., Parker, W., Levá, J., Růžková, J., Lukeš, J., a Jirků-Pomajbíková, K. (2019). Helminth therapy – from the parasite perspective. *Trends Parasitol. Opin.*, 35, 501–515.
- Stark, D., Barratt, J., Chan, D., a Ellis, J. T. (2016). *Dientamoeba fragilis*, the neglected trichomonad of the human bowel. *Clin. Microbiol. Rev.*, 29, 553–580.
- Stark, D., Barratt, J., Ellis, J., Harkness, J., a Marriott, D. (2009). Repeated *Dientamoeba fragilis* infections: a case report of two families from Sydney, Australia. *Infect. Dis. Rep.*, 1, 7–10.
- Stark, D., Barratt, J., Roberts, T., Marriott, D., Harkness, J., a Ellis, J. (2010a). A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82, 614–619.
- Stark, D., Barratt, J., Roberts, T., Marriott, D., Harkness, J., a Ellis, J. (2010b). Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 29, 411–416.
- Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., a Harkness, J. (2005a). Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *Int. J. Parasitol.*, 35, 57–62.
- Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., a Harkness, J. (2005b). Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 2718–2723.
- Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., a Harkness, J. (2006a). Evaluation of three diagnostic methods, including real-time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 232–235.
- Stark, D., Fotedar, R., Van Hal, S., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. T., Harkness, J. (2007). Prevalence of enteric protozoa in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative men who have sex with men from Sydney, Australia. *Am. J. Trop. Med.*

Hyg., 76, 549–552.

- Stark, D., Garcia, L. S., Barratt, J. L. N., Phillips, O., Roberts, T., Marriott, D., Harkness, J. a Ellis, J. T. (2014). Description of *Dientamoeba fragilis* cyst and precystic forms from human samples. *J. Clin. Microbiol.*, 52, 2680–2683.
- Stark, D. J., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. T., a Harkness, J. (2006b). Dientamoebiasis: Clinical importance and recent advances. *Trends Parasitol.*, 22, 92–96.
- Stark, D., Phillips, O., Peckett, D., Munro, U., Marriott, D., Harkness, J. a Ellis, J. (2008). Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: An update on the life cycle and host distribution. *Vet. Parasitol.*, 151, 21–26.
- Stensvold, C. R., a Clark, C. G. (2020). Pre-empting Pandora’s box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends Parasitol.*, 36, 229–232.
- Stensvold, C. R., Clark, C. G., a Röser, D. (2013). Limited intra-genetic diversity in *Dientamoeba fragilis* housekeeping genes. *Infect. Genet. Evol.*, 18, 284–286.
- Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S. W., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H. a Clark, C. G. (2007). Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends Parasitol.*, 23, 93–96.
- Stensvold, C. R., a van der Giezen, M. (2018). Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends Parasitol.*, 34, 369–377.
- Taliaferro, W. H., a Becker, E. R. (1922). The human intestinal amoeba, *iodamoeba williamsi*, and its cysts (iodine cysts). *Am. J. Epidemiol.* 2, 188–207.
- Van Gestel, R. S. F. E., Kusters, J. G., a Monkelbaan, J. F. (2019). A clinical guideline on *Dientamoeba fragilis* infections. *Parasitology*, 146, 1131–1139.
- Van Gool, T., Weijts, R., Lammerse, E., a Mank, T. G. (2003). Triple faeces test: An effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 22, 284–290.
- Vandenberg, O., Peek, R., Souayah, H., Dediste, A., Buset, M., Scheen, R., Retore, P., Zissis, G., van Gool, T. (2006). Clinical and microbiological features of dientamoebiasis in patients suspected of suffering from a parasitic gastrointestinal illness: A comparison of

- Dientamoeba fragilis* and *Giardia lamblia* infections. *Int. J. Infect. Dis.*, 10, 255–261.
- Verweij, J. J., Blange, R. A., Templeton, K., Schinkel, J., Brien, E. A. T., van Rooijen, M. A. A., van Lieshout, L. a Polderman, A. M. (2004). *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 1220–1223.
- Verweij, J. J., Mulder, B., Poell, B., van Middelkoop, D., Brien, E. A. T., a van Lieshout, L. (2007). Real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. *Mol. Cell. Probes.*, 21, 400–404.
- Volf P, Horák P (2007). *Paraziti a jejich biologie*, Triton, Praha, 318 p. ISBN 978-80-7387-008-9.
- Vlčková, K., Pafčo, B., Petrželková, K. J., Modrý, D., Todd, A., Yeoman, C. J., Torralba, M., Wilson, B. A., Stumpf, R. M., White, B. A., Nelson, K. E., Leigh, S. R. a Gomez, A. (2018). Relationships between gastrointestinal parasite infections and the fecal microbiome in free-ranging western lowland gorillas. *Front. Microbiol.*, 9, 1–12.
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Texier, C., Delbac, F., Viscogliosi, E., Dionigia, M. a Alaoui, H. E. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: An overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.*, 1, 167–178.
- Windsor, J. J., Clark, C. G., a Macfarlane, L. (2004). Molecular typing of *Dientamoeba fragilis*. *Br. J. Biomed. Sci.*, 61, 153–155.
- Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M. A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M. a Khan R. (2010). *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol. Res.*, 107, 679–684.
- Yang, J., a Scholten, T. (1977). A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. *Am. J. Clin. Pathol.*, 67, 300–304.
- Yang, J., a Scholten, T. H. (1976). Celestine blue B stain for intestinal protozoa. *Am. J. Clin. Pathol.*, 65, 715–718.
- Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Gregory, J. C., Lozupone, C. A., Lauber, Ch., Clemente, J.

C., Knights, D., Knight, R. a Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 222–227.

Zahedi, A., Field, D., a Ryan, U. (2017). Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland – first report of assemblage e. *Parasitology*, 114, 1154–1161.