Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Prevalence střevního prvoka *Dientamoeba fragilis* v populaci lidí a zvířat v České republice

Diplomová práce

Bc. Andrea Kašparová

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, PhD.

Školitel – specialista: RNDr. Milan Jirků

České Budějovice 2023

Kašparová A., 2023: Prevalence střevního prvoka *Dientamoeba fragilis* v populaci lidí a zvířat v České republice. [Prevalence of the intestinal protist *Dientamoeba fragilis* in the human and animals in the Czech Republic. Mgr. Thesis, in Czech] – 45 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The main aim of this study was to find out the prevalence of *Dientamoeba fragilis* in the gut-healthy humans and their animals using two molecular approaches. A total of 296 stool samples from humans and 135 samples from 18 animal species were analyzed. Using real-time PCR (qPCR), a prevalence of 24% was found in humans in contrast to conventional PCR (cPCR) (7%). In addition, we compared the sensitivity of these two methods for detection of *D. fragilis.* Based on our results, we found out that qPCR is more sensitive method than cPCR. In humans, several factors were found to influence the occurrence of *D. fragilis*. A higher prevalence of *D. fragilis* was observed among people who live in a village, traveling outside Europe and are in frequent contact with farm animals. In animals, *D. fragilis* was detected in 11% of samples from eight species using qPCR. Thanks to Sanger sequencing, we found that all positive samples from humans only were Genotype 1. In addition, co-infection *D. fragilis* with *Blastocystis* spp. was observed in nearly half of the colonized humans.

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne …… Podpis.....

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce MVDr. Kateřině Jirků, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení při zpracování mé diplomové práce a celému kolektivu Laboratoře parazitární terapie za přátelské prostředí.

V neposlední řadě mé díky patří i Studentské grantové agentuře za udělení grantu, který pomohl financovat tuto práci. Dále paní Mgr. Kláře Juditě Petrželkové, Ph.D., za pomoc se statistickým zpracováním dat.

Obsah

1. Úvod 1
1.1. Biologie 1
1.1.1. Taxonomie 1
1.1.2. Morfologická stádia a možnosti přenosu 1
1.1.3. Hostitelská specifita 4
1.1.4. Genetická diverzita 4
1.2. Diagnostika 5
1.2.1. Tradiční diagnostické metody 5
1.2.2. Molekulární metody 6
1.3. Epidemiologie 7
1.3.1. Faktory ovlivňující kolonizaci člověka 7
1.3.2. Role prvoka *Dientamoeba fragilis* v lidském zdraví 8
1.3.3. Ko-infekce s dalšími prvoky 9
1.3.4. Klinická manifestace u lidí 9
1.3.5. Terapie 10
2. Cíle 11
3. Materiál a metodika 12
3.1. Odběr vzorků 12
3.2. Izolace DNA a zpracování vzorků 12
3.3. Molekulární diagnostika 13
3.3.1. Konvenční PCR 13
3.3.2. Real-time PCR 13
3.3.2.1. Kontrola vnitřní inhibice ve vzorcích při použití qPCR 14
3.3.3. Sekvenování vzorků 14
3.3.4. Klonování 15
3.4. Statistická analýza 16

4. Výsledky 17
4.1. Soubor získaných vzorků 17
4.2. Prevalence *Dientamoeba fragilis* na základě cPCR 18
4.3. Prevalence *Dientamoeba fragilis* na základě qPCR 18
4.4. Porovnání citlivosti cPCR a qPCR pro detekci *Dientamoeba fragilis* 19
4.5. Klonování cPCR pozitivních vzorků pro fylogenetickou analýzu 19
4.6. Ověření získaných sekvencí na přítomnost *Dientamoeba fragilis* 19
4.7. Vliv vybraných specifických faktorů na výskyt *Dientamoeba fragilis* 21
4.7.1. Životní styl 21
4.7.2. Kontakt se zvířaty 22
4.7.3. Rodina 22
4.7.4. Věk a pohlaví 23
4.8. Ko-infekce *Dientamoeba fragilis* a jiných střevních prvoků 24
4.9. Vnitřní inhibice 24
5. Diskuze 25
6. Závěr 34
7. Seznam použité literatury 36

Úvod

1.1.Biologie

1.1.1. Taxonomie

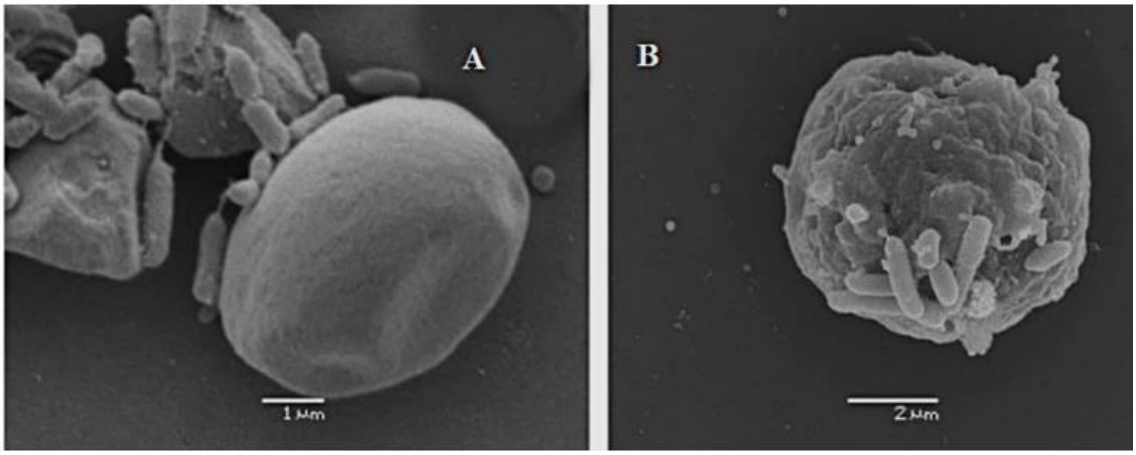
Dientamoeba fragilis je střevní prvok objevený roku 1909 Charlesem Wenyonem, anglickým parazitologem. Nicméně poprvé byl popsán až dvojicí Margaret Jepps a Clifford Dobell (Jepps & Dobell, 1918). Na základě několika biologických znaků, konkrétně absenci cysty a dvoujaderného trofozoita, zařadili autoři dientamébu mezi améby. Později, díky využití moderních metod, a to elektronové mikroskopie a molekulárně-fylogenetických analýz, byla *D. fragilis* přeřazena mezi trichomonády, konkrétně do čeledi Parabasalia, řádu Trichomonadida (Camp et al., 1974; Silberman et al., 1996; Stark et al., 2016).

1.1.2. Morfologická stádia a možnosti přenosu

Morfologická stádia jsou stále předmětem diskuzí. Některá literatura uvádí tři: cystu, precystu a trofozoita (Munasinghe et al., 2013; Stark et al., 2014). Cysta byla poprvé popsána Charlesem Kofoidem v roce 1923 (Kofoid, 1923), nicméně o několik let později Cliford Dobell (Dobell, 1940) provedl experimentální inokulaci trofozoity *D. fragilis* u několika zvířat včetně nehumánních primátů, avšak cysty se mu ve stolici objevit nepodařilo. Na základě svých vlastních pozorování tedy s Kofoidovými výsledky nesouhlasil a existenci cyst zamítl. Téměř o sto let později byla provedena experimentální inokulace myší trofozoity *D. fragilis*, která vedla k nalezení cyst v jejich trusu (Munasinghe et al., 2013). Nicméně nalezené cysty nebyly před extrakcí DNA purifikovány a sterilizovány a molekulární analýza pomocí PCR byla provedena z izolované DNA z trusu. To znamená, že pozitivní výsledek PCR na přítomnost *D. fragilis* nedokazuje, že popsané cysty jsou skutečně z životního cyklu dientaméby (Clark et al., 2014).

V dostupné literatuře můžeme najít zmínky i o možných precystách v životním cyklu *D. fragilis*, které se na rozdíl od stádia cysty vyznačují hustší strukturou cytoplazmy a byly pozorovány jak jednojaderné, tak dvoujaderné formy (Stark et al., 2014; Wenrich, 1936). Nicméně ani zde nemáme jistotu, že pozorované útvary skutečně patří do životního cyklu *D. fragilis*. Naopak stádium trofozoita bylo popsáno již dávno, a to protistology Jeppsovou a Dobellem, kteří jej popsali ve své práci roku 1918. Později, díky moderním zobrazovacím metodám, jako je skenovací nebo transmisní elektronová mikroskopie (SEM a TEM), byla potvrzena nejen velikost, která se pohybuje nejčastěji v rozmezí od 5 do 15 μm, ale také byla

pozorována specifická morfologie. Kolektiv Banik et al. (2012) ve své studii popsal dva typy trofozoitů, kteří se liší ve své povrchové struktuře. Jedná se o hladké (tzv. „smooth cells“) a zvlněné buňky (tzv. „ruffled cells“), které jsou zobrazeny na obrázku 1. Nejčastěji můžeme trofozoity *D. fragilis* pozorovat jako dvoujaderné buňky, ale jednojaderná forma není výjimkou (Stark et al., 2016).



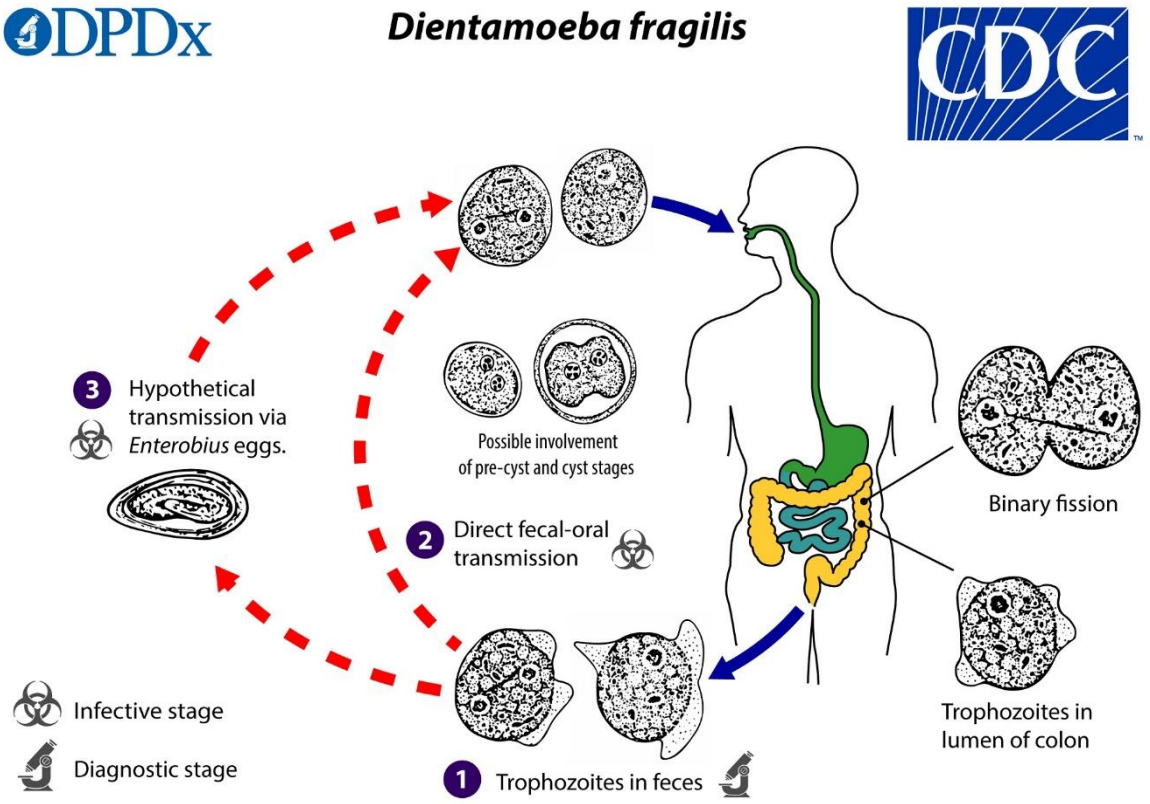
Obr. 1: Dva typy prvoka *Dientamoeba fragilis* lišící se svým povrchem: (A) hladká buňka, (B) zvlněná buňka. Fotografie jsou pořízeny pomocí skenovací elektronové mikroskopie (Banik et al., 2012).

Životní cyklus *D. fragilis* probíhá fekálně-orální cestou. Trofozoit (nebo potenciálně jiné stádium) se dostane společně s potravou nebo vodou do trávicího traktu hostitele. Následně putuje *D. fragilis* do tlustého střeva, kde se množí binárním dělením a s výkaly se posléze dostávají do vnějšího prostředí, kde kontaminují potraviny a/nebo vodní zdroje. Dientaméba je následně pozřena novým hostitelem, čímž se cyklus dokončí (Barratt et al., 2011).

Přenos *D. fragilis* mezi hostiteli není dodnes zcela objasněný. Dříve se uvažovalo o přenosu tohoto prvoka pomocí vektoru (Dobell, 1940). Autor přemýšlel o možnosti přenosu prostřednictvím vajíček různých střevních hlístic (*Trichuris* nebo *Ascaris*). Později se kvůli opakovaně zaznamenaným výskytům ko-infekcí prvoka *D. fragilis* a roupa dětského (*Enterobius vermicularis*) u dětí začalo hypotetizovat o přenosu D. *fragilis* jeho vajíčky (Burrows & Swerdlow, 1956; Girginkardeşler et al., 2008; Ockert & Schulz, 1972). Tento fakt potvrdil svým experimentem německý parazitolog Günter Ockert, který sám sebe experimentálně nakazil vajíčky *E. vermicularis* získaných od pacienta pozitivního

na přítomnost obou organismů. Posléze potvrdil vlastní kolonizaci prvokem *D. fragilis*, která přetrvala několik týdnů (Ockert, 1990). Později byla ve vajíčcích *E. vermicularis* skutečně detekována DNA *D. fragilis* (Ögren et al., 2013; Röser et al., 2013). Nicméně přítomnost DNA ještě nemusí znamenat přítomnost trofozoitů tohoto prvoka a tudíž přenos. Autorské dvojici Burrows a Swerdlow (1956) se nepodařilo z vajíček *E. vermicularis* potvrdit přítomnost *D. fragilis* pomocí kultivace a pozdější studie se o toto ověření nepokusily vůbec (Ögren et al., 2013; Röser et al., 2013).

Případná existence cyst v životním cyklu *D. fragilis* by otevřela další možnosti přenosu dientaméby (Baqer et al., 2018). Shrnutí životního cyklu dientaméby společně s možnými variantami přenosu je na obrázku 2.



Obr. 2: Předpokládaný životní cyklus prvoka *Dientamoeba fragilis.* (https://www.cdc.gov/dpdx/dientamoeba/index.html)

1.1.3. Hostitelská specifita

Přítomnost prvoka *D. fragilis* byla zaznamenána u lidí napříč různými populacemi (Barratt et al., 2011). Kromě toho, byl jeho výskyt popsán s jistotou také u některých druhů nehumánních primátů žijících v zajetí. Jednalo se o gorily nížinné, u kterých je *D. fragilis* považován za patogena způsobující průjmová onemocnění (Cacciò et al., 2012; Lankester et al., 2010; Stark et al., 2008) a vřešťany pláštíkové (*Alouatta palliata aequatorialis*) (Helenbrook et al., 2015). V nedávné době proběhla rozsáhlá studie zaměřená na výskyt střevních prvoků (včetně *D. fragilis*) u nehumánních primátů ve volné přírodě. Konkrétně se jednalo o šimpanze hornoguinejské (*Pan troglodytes verus*) a gorily nížinné západní (*Gorilla gorilla gorilla*). S využitím metody qPCR byla u šimpanzů zjištěna prevalence prvoka *D. fragilis* 25 %. Nejčastěji diagnostikovaný prvok v této skupině šimpanzů byl *Blastocystis* spp., přičemž prevalence dosahovala 97,4 %. Dientaméba se v této studii u goril nevyskytovala vůbec (Menu et al., 2021). Další nehumánní primáti, žijící ve volné přírodě, u kterých byl prvok *D. fragilis* popsán, jsou makak jávský (*Macaca fascicularis philippensis*) a pavián (*Papio* sp.) (Hegner & Chu, 1930; Myers & Kuntz, 1968).

Z domácích zvířat jsou dalšími hostiteli například prasata domácí (Crotti et al., 2007). V této studii autoři odhalili vysokou prevalenci (43,8 %), což je v kontrastu s pozdější velmi rozsáhlou studií, kde kolektiv Chan et al. (2016) analyzoval 37 druhů zvířat včetně prasat o celkovém počtu 420 jedinců a pozitivní byli pouze jeden pes a jedna kočka. Větší záchyt byl pozorován v nedávné studii Yetismis et al. (2022) u andulek vlnkovaných, kde byla prevalence 21,3 %. Podobná prevalence byla zjištěna i u dobytka a to, 19 % (Yildiz & Aynur, 2022).

1.1.4. Genetická diverzita

U *D. fragilis* byla v porovnání s jinými druhy prvoků odhalena nízká genetická variabilita. Například u *Blastocystis* spp. je v současné době známo celkem 28 subtypů (Maloney et al., 2020), oproti tomu u dientaméby byly doposud popsány pouze dva genotypy, a to Genotyp 1 a Genotyp 2, označované také jako Bi a PA (Cacciò, 2018; Stensvold et al., 2013). Kolektiv autorů studie Stensvold et al. (2013) provedl fylogenetickou studii zaměřenou na analýzu tří genů *D. fragilis* a to konkrétně gen pro malou ribozomální podjednotku, aktin a elongační faktor. Genetická variabilita v rámci těchto genů se ukázala být velice nízká (3 %). Genotyp 1 je nejčastějším genotypem diagnostikovaným jak u lidí, tak u zvířat. Ve studii Cacciò et al. (2012) byl tento genotyp nalezen u prasat i jejich ošetřovatelů, což naznačuje možnost

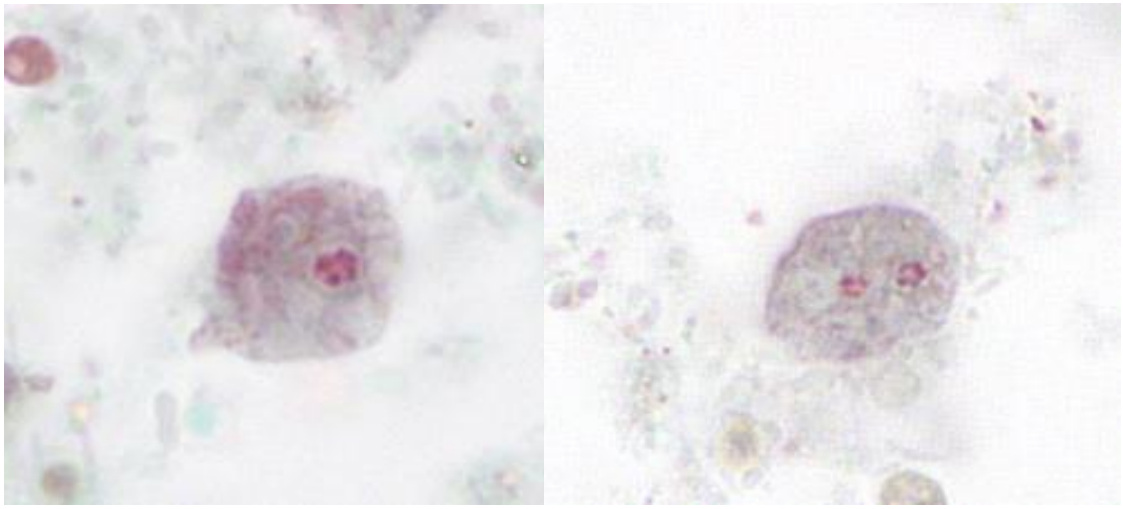
zoonotického přenosu tohoto prvoka. Další zvířata, u kterých byl Genotyp 1 zjištěn, jsou andulky a skot (Yetismis et al., 2022; Yildiz & Aynur, 2022). Bohužel ani v jedné studii nebyli do genetických analýz zahrnuti i majitelé (popřípadě ošetřovatelé) daných zvířat, proto zde nejsou k dispozici informace o možnosti zoonotického přenosu.

1.2. Diagnostika

Dříve se k diagnostice prvoka *D. fragilis* používaly převážně tradiční parazitologické metody, jako je například barvení roztěrů stolice nebo xenická kultivace. Nicméně s rozvojem moderních molekulárních metod, mezi které patří polymerázová řetězová reakce, se ukazuje, že nejsou tak citlivé a spolehlivé.

1.2.1. Tradiční diagnostické metody

Do této kategorie spadá diagnostika *D. fragilis* s využitím nativního preparátu, barvení roztěrů stolice a kultivace. Vzhledem k tomu, že se trofozoit na vzduchu do 48 hodin rozpadá (Clark et al., 2014; Johnson et al., 2004) a eventuální cysty lze v preparátu snadno přehlédnout, je mikroskopická diagnostika poměrně náročná a vyžaduje zkušeného diagnostika (Sarafraz et al., 2013; Van Gestel et al., 2019). Ačkoli byly tradiční diagnostické postupy pro detekci *D. fragilis* dříve hojně využívané, dnes jsou již na ústupu. V nedávné studii Clemente et al. (2021) bylo porovnáno několik diagnostických technik spadajících do této kategorie. Konkrétně se jednalo o přímé mikroskopické vyšetření po koncentraci stolice (Para-Pak® CON-Trate® System), barvení roztěru stolice pomocí Giemsy nebo pomocí modifikovaného Ziehl-Nielsenova barvení. Zde byla zjištěna prevalence *D. fragilis* 5 %, a to na základě použití metody barvení dle Giemsy. Nicméně při analýze vzorků pomocí real-time PCR (qPCR), byla prevalence 15 %. Podobný výsledek zaznamenali také autoři další studie (Sarzhanov et al., 2021), kteří opět prokázali nižší citlivost tradičních mikroskopických metod (trichrom a acidorezistentní barvení dle Kinyouna) pro detekci prvoka *D. fragilis* ve srovnání s qPCR. Prevalence dientaméby za použití qPCR, byla velice podobná, jako v předchozí zmíněné studii. Oproti tomu mikroskopický přístup neodhalil dientamébu vůbec. Ke stejným závěrům došla i autorská dvojice (Yildiz & Aynur, 2022), která zjistila nízkou spolehlivost v diagnostice s využitím barvení pomocí trichromu (Obr. 3).



Obr. 3: Prvok *Dientamoeba fragilis* obarvený pomoci Gomoriho trichrichromu. (https://www.cdc.gov/dpdx/dientamoeba/index.html)

1.2.2. Molekulární metody

Nejhojněji dnes využívanou diagnostickou metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR), která amplifikuje a detekuje specifickou DNA. Rozlišujeme konvenční (cPCR) a real-time PCR (qPCR). Real-time PCR na rozdíl od konvenční PCR zaznamenává nárůst množství sledované DNA v reálném čase (Klein, 2002). Díky jednoduché analýze Ct hodnot (threshold cycle) lze navíc kvantifikovat množství DNA přítomné ve vzorku. Hodnota Ct je dána konkrétním amplifikačním cyklem, při kterém úroveň fluorescenčního signálu převyšuje fluorescenci pozadí, a tedy přímo koreluje s množstvím DNA v analyzovaném vzorku. Čím je Ct hodnota vyšší, tím menší množství templátové DNA se nachází v reakci a naopak (Verweij & Stensvold, 2014).

Další výhodou qPCR oproti cPCR je eliminace rozsáhlejší manipulacese vzorky a amplikony, a tím i možnost záměny vzorků. Konvenční PCR se skládá ze dvou kroků, a to amplifikace DNA v blokovém termocykleru s následnou elektroforézou k vizualizaci DNA. Tyto dva kroky je nutné provést ve dvou různých přístrojích s rizikem kontaminace při přenosu amplifikované DNA z termocykleru do vizualizačního zařízení. V qPCR jsou oba kroky, amplifikace a vizualizace generování PCR produktu v reálném čase, prováděny současně v jediném přístroji.

Autoři několika studií se v závislosti na výsledcích shodují na tom, že qPCR představuje účinný nástroj k zjištění přesné prevalence prvoka *D. fragilis* napříč různými kohortami lidí.

Například kolektiv Calderaro et al. (2010) porovnával qPCR a kultivaci *D. fragilis* na souboru, který čítal celkem 959 lidských vzorků. PCR v reálném čase v této studii odhalila o 117 pozitivních vzorků více, než kultivace. Rozsáhlá studie zabývající se porovnáním účinnosti několika metod proběhla i v Íránu. Vzorky stolice od 1000 pacientů byly okamžitě vyšetřeny pomocí nativních roztěrů a trvalého barvení (fixace pomocí PVA a nabarvení trichromem). Všechny pozitivní vzorky a 55 náhodně vybraných negativních vzorků bylo následně podrobeno cPCR. Při přímém vyšetření roztěru nebyl mezi 1000 vzorky stolice nalezen žádný pozitivní vzorek, zatímco u obarvených preparátů bylo zjištěno celkem 21 (2,1 %) pozitivních a 26 podezřelých případů. Konvenční PCR ukázala, že z 21 pozitivních případů bylo 17 pozitivních a nested cPCR detekovala všech 21 pozitivních případů a také tři nové pozitivní vzorky z podezřelých případů, a to celkem 24 (tj. 2,4 %) pozitivních vzorků (Sarafraz et al., 2013).

1.3.Epidemiologie

Dientaméba je kosmopolitně rozšířený prvok a prevalence u lidí se velmi liší v závislosti na studované kohortě lidí a části světa (Barratt et al., 2011; Stark et al., 2016). Byly popsány případy jak v zemích třetího světa, tak i v industrializované společnosti. Prevalence tohoto prvoka se pohybuje v rozmezí 0,4 až 91 % v závislosti na studované kohortě lidí (Chan et al., 1996; Cengiz et al., 2009).

1.3.1. Faktory ovlivňující kolonizaci člověka

Dříve byl prvok *D. fragilis* detekován hlavně u pacientů trpících gastrointestinálními obtížemi, a proto se mu přisuzovala role patogenu. Nicméně s přibývajícími studiemi na zdravých lidech se ukazuje, že je v této populaci častější, než u nemocných pacientů (de Boer et al., 2020; de Jong et al., 2014).

Věk je jedním z možných faktorů, které mohou ovlivňovat výskyt prvoka *D. fragilis*. Studie z posledních let naznačují, že se *D. fragilis* vyskytuje častěji u dětí (Fletcher et al., 2014; Menéndez et al., 2019). Konkrétně ve studii de Boer et al. (2020) byla nejvyšší prevalence *D. fragilis* pozorována u mladistvých do 20 let věku. Ke stejným závěrům dospěl i kolektiv Lagacé-Wiens et al. (2006), kde byla dientaméba nejčastěji pozorována u chlapců ve věku mezi 16 a 20 let, a to 11,5 %. Zajímavé výsledky ukázala studie ze Švédska, kde byla *D. fragilis* nejčastěji pozorována u chlapců ve věku 0 až 10 let (Norberg et al., 2003). S tím

souhlasí i výsledky dánské studie, ve které byla nejvyšší prevalence pozorována u dětí ve věku sedmi let (Röser et al., 2013). K podobnému závěru dospěli i autoři ve Španělsku, kde v rámci 163 testovaných lidí byl nejčastější výskyt *D. fragilis* u dětí do 14 let (Menéndez et al., 2019). Tyto závěry se zdají být logické z důvodu nižší hygieny u dětí.

Dalším faktorem, na který se prevalenční studie zaměřují, je pohlaví. K zajímavým závěrům dospěl kolektiv autorů Lagacé-Wiens et al. (2006) kteří v rámci jedné věkové kategorie odhalili značný rozdíl mezi výskytem *D. fragilis* u dívek a u chlapců, a to 1,1 % vs. 11,5 %. Ke stejným výsledkům dospěli i autoři studie Banik et al. (2011), kde taktéž zjistili častější výskyt *D. fragilis* u chlapců než u dívek. Oproti tomu ve Švédsku byl tento prvok častěji diagnostikován u žen ve všech věkových kategoriích kromě té nejnižší (tj. 0 až 10 let) (Norberg et al., 2003). Prvok *D. fragilis* je velice často diagnostikován i u žen ve věku 30 až 40 let (Menéndez et al., 2019; Röser et al., 2013), což může souviset s tím, že maminky bývají s dětmi v častějším a intenzivnějším kontaktu než otcové.

V Dánsku proběhla studie u malých dětí, která se zabývala vlivem několika faktorů na kolonizaci prvokem *D. fragilis*, mezi kterými bylo i cestování (Jokelainen et al., 2017). Z 27 dětí, které měly cestování ve své anamnéze, bylo pozitivně diagnostikováno celkem 22 jedinců (81,5 %). Nicméně poměrně vysoká prevalence byla i u těch dětí, které necestovaly vůbec, a to 64,3 % (72 / 112). Jediné dva faktory, které byly vyhodnocené, jako statisticky významné, byl věk pod tři roky a více než jedno dítě v rodině.

1.3.2. Role prvoka *Dientamoeba fragilis* v lidském zdraví

Role *D. fragilis* v lidském zdraví je v současné době stále v lékařské a vědecké komunitě předmětem diskuzí. V minulosti byl tento prvok řazen mezi patogeny způsobující gastrointestinální problémy (Aykur et al., 2019; Norberg et al., 2003) nebo zánětlivá střevní onemocnění (Inflammatory Bowel Disease – IBD, Inflammatory Bowel Syndrome – IBS) (Engsbro et al., 2012; Yakoob et al., 2010). K těmto závěrům přispěly, krom nedostatku studií zaměřených na zdravou populaci, také časté nálezy dientaméby u lidí trpících právě těmito střevními obtížemi. Předpoklad, že je *D. fragilis* příčinou některých gastrointestinálních onemocnění, pochází také ze zjištění, že ke zlepšení stavu pacientů došlo po jeho eliminační léčbě (Stark et al., 2016). Nicméně, ne všechny studie se na tomto shodují. Oproti tomu ve studii Engsbro et al. (2012) nebyla nalezena žádná významná souvislost mezi eradikací *D. fragilis* pomocí metronidazolu a zlepšením symptomů u pacientů trpících IBS. Ani o dva

roky později nepozoroval autorský kolektiv Röser et al. (2014) žádné významné rozdíly mezi dětmi, které byly léčeny metronidazolem a těmi, které dostávaly placebo. V posledních letech také přibývají studie, které zahrnují zdravé lidi, u kterých se *D. fragilis* vyskytuje častěji, než u nemocných pacientů trpících zažívacími obtížemi a ukazuje se, že bezpříznakové infekce jsou častější, než symptomatické (de Boer et al., 2020; de Jong et al., 2014). To naznačuje komenzální roli *D. fragilis* v mikrobiomu člověka.

1.3.3. Ko-infekce s dalšími prvoky

Dientamoeba fragilis se často vyskytuje v ko-infekci s dalším střevním prvokem *Blastocystis* spp., přičemž oba jsou spojováni s vyšší diverzitou střevního bakteriomu (Stensvold & van der Giezen, 2018). Například studie z Nizozemí ukázala vyšší prevalenci nejen *D. fragilis*, ale i *Blastocystis* spp. u zdravých lidí z kontrolní skupiny, než u pacientů trpících gastroenteritidou (de Boer et al., 2020). Dále byla ko-infekce pozorována ve studii Lagacé-Wiens et al. (2006), kde nejčastěji zastoupeným prvokem byl *Blastocystis* spp., pak následovala *D. fragilis* a *Giardia intestinalis*. V rozsáhlé studii ve Španělsku byla zjištěna ko-infekce *Blastocystis* a dientaméby ve 33,6 % případů (Burgaña et al., 2019).

1.3.4. Klinická manifestace u lidí

Klinická manifestace u lidí kolonizovaných prvokem *D. fragilis* je různá. Jsou popsány asymptomatické průběhy u lidí, kteří netrpí žádným chronickým onemocněním střev, ale může se objevit i abdominální diskomfort, jako například průjem nebo nadýmání (Stark et al., 2010). Tyto symptomy jsou nejčastěji popisovány u dětí, avšak studie Holtman et al. (2017), která zahrnovala 107 dětí ve věku okolo devíti let, nenašla žádnou souvislost mezi přítomností *D. fragilis* a příznaky průjmu či bolestí břicha. Zde autoři pracovali s dětmi, u kterých byla diagnostikována dientaméba a jako kontrolní skupina posloužili jejich sourozenci, kteří byli také pozitivní na přítomnost *D. fragilis*, ale nevyskytoval se u nich žádný abdominální diskomfort. To potvrzují i závěry dánské studie u dětí ve věku do šesti let, která probíhala po dobu tří let. Za tuto dobu byla *D. fragilis* diagnostikována z celkového počtu 148 zúčastněných alespoň jednou u 108 dětí. Ani v tomto případě nebyla zjištěna žádná souvislost mezi přítomností tohoto prvoka a častějším výskytem zažívacích obtíží (Jokelainen et al., 2017).

1.3.5. Terapie

Ačkoli s přibývajícími studiemi se zdá, že *D. fragilis* má v zažívacím traktu člověka spíše komenzální roli, někteří autoři jej stále označují jako patogenní organismus (Aykur et al., 2019; Burgaña et al., 2019; Stark et al., 2016). K tomuto názoru přispívá i fakt, že u některých jedinců bylo pozorováno zlepšení zdravotního stavu po eradikaci tohoto prvoka. Konkrétně ve studii (Stark et al., 2010) byl použit nejprve metronidazol a později i paramomycin pro léčbu pacientů, z nichž všichni hlásili výrazné zlepšení klinických příznaků (průjem a bolesti břicha). U dvou pacientů byla použita kombinovaná terapie, která se sestávala z doxycylinu a iodoquinolu, jelikož nereagovali na úvodní léčbu metronidazolem. Následně došlo k vymizení klinických symptomů i u nich. Nicméně u léčených pacientů byly diagnostikovány i další střevní organismy, které mohly střevní obtíže způsobit. Konkrétně se jednalo o *Blastocystis* spp., *Entamoeba coli*, *Iodamoeba butschlii* a *Endolimax nana.* Naopak ve studii provedené v Dánsku nedošlo ke zlepšení stavu dětských pacientů po podání metronidazolu a gastrointestinální příznaky i nadále přetrvávaly (Röser et al., 2014). Další terapeutické látky, u kterých je popsána účinnost při eradikaci *D. fragilis*, jsou například clioquinol (Bosman et al., 2004), doxycyklin, oxytetracyclin a iodoquinol (Preiss et al., 1991), ornidazol (Kurt et al., 2008) a secnidazol (Girginkardeşler et al., 2003). Rozsáhlá studie ve Španělsku se zabývala různými antiparazitiky, a snažila se zhodnotit terapeutické odpovědi na jejich použití (Burgaña et al., 2019). Autoři dospěli k závěru, že ze dvou nejčastěji předepisovaných léčiv proti střevním prvokům (tj. metronidazol a paromomycin), vykazuje léčba paromomycinem vyšší míru eradikace *D. fragilis* než metronidazol ve všech věkových kategoriích, s výjimkou dětí mladších šesti let.

2. Cíle

Hlavním cílem této studie bylo zjistit prevalenci střevního prvoka *Dientamoeba fragilis* v souboru zdravých dobrovolníku z řad obyvatel České republiky a jejich domácích zvířat.

Dílčí cíle byly následující:

- optimalizovat real-time PCR (qPCR) protokol pro detekci *D. fragilis*;
- porovnat senzitivitu dvou diagnostických metod – konvenční PCR (cPCR) a qPCR;
- zjistit korelace mezi výskytem *D. fragilis* a některými specifickými faktory, jako jsou kontakt se zvířaty, pohlaví, věk a životní styl (cestování, život na venkově/ve městě).

3. Materiál a metodika

3.1. Odběr vzorků

Tato studie je součástí rozsáhlého projektu zaměřeného na zjišťování výskytu střevních prvoků v České republice ve zdravé populaci lidí a jejich zvířat. Vzorky exkrementů byly odebírány v letech 2017 - 2019. Tato dílčí práce se věnuje výskytu prvoka *Dientamoeba fragilis* a navazuje na předchozí studii o prevalenci prvoka *Blastocystis* spp. (Lhotská et al., 2020). Byl použit stejný soubor vzorků stolice a trusu, jako ve výše zmíněné studii, pouze dodatečně doplněný o několik vzorků (celkové N = 431). Všechny vzorky stolice byly získány od zdravých dobrovolníků (tj. bez jakýchkoliv příznaků gastrointestinálního onemocnění v době odběru). Pro vyhodnocení možného zoonotického přenosu byly také odebírány vzorky trusu od zvířat, se kterými byli dobrovolníci v úzkém kontaktu. Všichni účastníci vyplnili dotazník, který obsahoval informace o bydlišti (město / vesnice), cestování (necestování / cestování po Evropě / cestování mimo Evropu), kontaktu se zvířaty (žádný kontakt / kontakt pouze s domácími zvířaty / kontakt s domácími zvířaty a hospodářskými zvířaty), pohlaví a věku (věkové kategorie: 0-3, 4-6, 7-12, 13-17, 18-30, 31-49, 50-60, >60).

Každý účastník ve studii podepsal informovaný souhlas s účastí. Proces, podmínky a etická pravidla této studie jsou v souladu s Helsinskou deklarací 2013 (World Medical Association). Veškeré údaje byly přísně anonymizovány a zpracovány dle platných zákonů České republiky (např. zákon č. 101/2000 Sb. a pozdějších předpisů). Studie byla schválena Etickou komisí Biologického centra Akademie věd ČR (číslo jednací: 1/2017).

3.2. Izolace DNA a zpracování vzorků

Celková DNA byla izolována přímo ze vzorků stolice pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (Stratec, Německo) podle protokolu výrobce. Z každého vzorku bylo tímto způsobem získáno 200 µl DNA (koncentrace v rozmezí 120 až 850 ng/µl), která byla skladována při teplotě -20 °C. Všechny odebrané vzorky byly vyšetřeny dvěma molekulárními diagnostickými přístupy, a to konvenční PCR (cPCR) (Stark et al., 2005a) a real-time (qPCR) (Verweij et al., 2007). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z xenické kultury *D. fragilis*.

3.3. Molekulární diagnostika

V mé rešeršní bakalářské práci jsem shrnula dosavadní informace o *D. fragilis* (Růžičková, 2020). Zjistila jsem, že cPCR a qPCR jsou v současné době nejvyužívanějšími diagnostickými postupy díky své nízké časové náročnosti a vysoké citlivosti. Z těchto důvodů jsme se rozhodli je využít i v naší laboratoři a zároveň porovnat jejich senzitivitu.

3.3.1. Konvenční PCR

Protokol pro detekci *D. fragilis* pomocí konvenční PCR využívá primery DF400 a DF1250 (Tab. 1), které amplifikují oblast ~850 bp SSU rDNA (Stark et al., 2005a). Konvenční PCR byla provedena v T100^{TM} Thermal Cycler (Biorad, USA) za následujících podmínek: 95 °C/5 min, 34× (94 °C/1 min; 58 °C/1,5 min; 72 °C/2 min) a 72 °C/10 min. Všechny cPCR reakce byly připraveny v konečném objemu 10 µl, obsahujících 5 µl komerčně vyráběného 2× koncentrovaného Master Mixu (AccuPowerR Taq PCR PreMix; Bioneer, Korea), 1µl každého primeru, 1µl miliQ vody a 2 µl získané DNA. Produkty cPCR byly následně podrobeny elektroforéze, s využitím elektroforetického systému Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Na 1% agarózový gel s ethidium bromidem bylo naneseno 8 µl cPCR produktu. K vlastní vizualizaci byl použit UV transiluminátor (UltraLum 900-1425-24). U všech sad cPCR reakcí byla vždy kromě vzorků připravena také jedna reakce s pozitivní kontrolou a reakce s negativní kontrolou (zde byla DNA nahrazena odpovídajícím množstvím vody).

Tab. 1: Přehled použitých primerů u cPCR.

Primery	**Sekvence**
DF-400	5’-TATCGGAGGTGGTAATGACC - 3’
DF-1250	5’- CATCTTCCTCCTGCTTAGACG - 3’

3.3.2. Real-time PCR

PCR v reálném čase v rámci předkládané práce využívala zařízení LightCycler LC 480 I (Roche, Basel, Švýcarsko) s 96-jamkovým blokem. Základní diagnostický protokol byl převzat ze studie Verweij et al. (2007) a optimalizován pro podmínky naší laboratoře. Výsledné podmínky reakce byly následující: 95 °C/12 min; 50× (95 °C/15 s; 60 °C/30 s; 72 °C/30 s) a byl použit polymerázový Master Mix (HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus Rox,

Solis BioDyne, Estonsko), pár primerů (Df-124F a Df-221R) a sonda Taqman (*D. fragilis*-specific MGB Taqman probe Df-172revT Dark Quencher, Generi Biotech, Česká republika) (Tab. 2). Tyto primery amplifikují úsek genu pro malou ribozomální podjednotku o velikosti ~97 bp. Na každé reakční desce byla vždy krom testovaných vzorků (vždy v triplikátech) použita také pozitivní kontrola (DNA z *in vitro* kultury *D. fragilis*) a negativní kontrola (DNA nahrazena miliQ vodou). Všechny negativní vzorky byly navíc kontrolovány pro případnou vnitřní inhibici (viz kap. 3.3.2.1.).

Tab. 2: Přehled použitých primerů a sondy pro qPCR.

Primery a sonda	**Sekvence**
Df-124F	5′–CAACGGATGTCTTGGCTCTTTA–3′
Df-221R	5′–TGCATTCAAAGATCGAACTTATCAC–3′
Taqman	5'–CAATTCTAGCCGCT TAT- 3'

3.3.2.1. Kontrola vnitřní inhibice ve vzorcích při použití qPCR

U vzorků DNA izolované z trusu nebo stolice dochází občas k inhibici amplifikace během qPCR, tzv. vnitřní inhibici (Stensvold & Nielsen, 2012). Pro účely vyloučení nebo zjištění případné vnitřní inhibice jsme použili vzorky, které se ukázaly jako negativní v qPCR pro všechny prvoky studované v naší laboratoři (*D. fragilis*, *Giardia intestinalis* a *Blastocystis* spp.). Možnou vnitřní inhibici jsme testovali přidáním cizorodé DNA k analyzovanému vzorku. V našem případě se jednalo o DNA izolovanou z tkáně potkana a byl použit protokol pro amplifikaci tzv. „house-keeping" genu potkana pro beta-2 podjednotku mikroglobulinu (B2M) za použití komerčních primerů a Taqman sondy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3.3.3. Sekvenování vzorků

Sekvence byly získány z pozitivních vzorků pomocí Sangerova sekvenování u komerční společnosti Eurofins GATC Biotech (Německo). Amplikony získané pomocí cPCR o vhodné velikosti byly izolovány z gelu pomocí GenElute^{TM} Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, MO, USA) a následně obousměrně sekvenovány. Všechny sekvence byly následně porovnány se

sekvencemi v databázi GenBank™ (National Center for Biotechnology Information) prostřednictvím platformy BLASTnt.

3.3.4. Klonování

Vzorky, které po sekvenování obsahovaly více překrývajících se signálů, byly klonovány pro potvrzení přítomnosti *D. fragilis*. Tento postup zahrnoval několik kroků.

Nejprve bylo nutné izolovat DNA z agarózového gelu, po proběhnutí cPCR a následné elektroforézy, pomocí Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, MO, USA). Pro vlastní klonování byl použit pGEM®-T Easy Vector Systém I (Promega, WI, USA). Objemy jednotlivých složek pro přípravu jednoho vzorku jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3). Připravená klonovací směs byla přes noc inkubována při teplotě 12°C.

Dále bylo potřeba transformovat připravený vektor do buněk *Escherichia coli*. To zahrnovalo několik kroků, kdy prvním bylo smíchání klonovacího vektoru s kompetentními buňkami *E. coli* XL-1. Směs byla ponechána 30 min na ledu, a poté zahřáta ve vodní lázni na 42°C po dobu 40 sekund, tzv. „heat shock“. Vektor se takto dostal do buněk bakterií. Následovalo ochlazení na ledu po dobu 1 minuty, a poté bylo ke směsi přidáno 150 µl SOC (Super Optimal Catabolite) média (2% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgS0_4$ a 20 mM glukóza) předehřátého na 37°C. Bakteriální buňky se v připravené kultivační směsi nechaly třepat po dobu 40 minut při 37 °C.

V dalším kroku byly buňky vysety na předem připravené agarové plotny, ošetřené ampicilinem, který byl použit z důvodu zamezení růstu nežádoucích organismů. Ještě před vlastním výsevem buněk bylo na každou Petriho misku naneseno a rozetřeno pomocí bakteriologické hokejky 35 µl X-gal (5- bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid; Amresco, ID, USA) a 5 µl IPTG (izopropyl-β-D-thiogalaktosid, Amresco; ID, USA). Po výsevu buněk se misky nechaly přes noc inkubovat při teplotě 37 °C.

Po inkubaci byly z každé misky odebrány tři bílé kolonie pomocí vždy nové sterilní pipetovací špičky a přeneseny do připravených zkumavek se 4 ml tekutého LB (Luria-Bertani) média (trypton, kvasničný extrakt a NaCl), s přidaným ampicilinem. Tato kultura byla opět inkubována v třepačce 12 hodin při 37 °C.

Narostlá směs buněk byla odstředěna a získaný bakteriální sediment byl použit pro izolaci plazmidové DNA pomocí komerčního kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche,

Švýcarsko). Po izolaci plazmidové DNA následovalo restrikční štěpení pro ověření přítomnosti a velikosti zaklonovaného fragmentu. DNA byla štěpena pomocí restrikčního enzymu, v našem případě EcoRI (New England Biolabs; MA, USA). Reakční směs obsahovala 3,5 µg plazmidové DNA, 1 µl pufru (10x koncentrovaného), 2 jednotky enzymu EcoRI a 5,5 µl miliQ vody. Tato směs byla inkubována 30 minut při teplotě 37 °C.

Pomocí elektroforézy se ověřila úspěšnost celého procesu klonování a zároveň se zkontrolovala velikost zaklonovaného fragmentu. DNA vybraných klonů byla odeslána na sekvenování komerční firmou Eurofins GATC Biotech.

Tab. 3: Chemikálie pro přípravu ligační směsi a jejich použité množství na 1 reakci.

Název sloučeniny	**Množství (µl)**
2x Rapid Ligation Buffer	5
pGem®-T Easy vector	1
cPCR produkt (DNA)	2,3
DNA T4 Ligase	1
voda pro PCR	0,7

3.4.Statistická analýza

Rozdíly v citlivosti cPCR a qPCR pro detekci *D. fragilis* byly hodnoceny pomocí McNemar testu s Yatesovou korekcí. U vzorků analyzovaných pomocí qPCR byl použit Fisherův exaktní test, za účelem zjištění rozdílu mezi věkovými kategoriemi ve výskytu *D. fragilis* u lidí. Navíc byl použit zobecněný lineární model ke sledování vlivu věku jako spojité proměnné. Chí-kvadrát test byl použit pro statistické vyhodnocení významnosti rozdílu v prevalenci *D. fragilis* mezi skupinami lidí v rámci jediného sledovaného faktoru, jako je životní styl (život ve městě versus život na venkově), cestování (v Evropě a mimo ni), kontakt se zvířaty (s a bez) a pohlaví. Tyto analýzy byly provedeny pomocí programů GraphPad Prism 5.0 a R Studio verze 3.6.2. Za indikaci statistické významnosti byla považována P-hodnota menší než 0,05.

4. Výsledky

4.1.Soubor získaných vzorků

V rámci této studie bylo analyzováno celkem 431 vzorků, z toho 296 lidských a 135 vzorků od zvířat, která jsou s danými lidmi v častém kontaktu. Většina nehumánních vzorků pocházela od psů (54/135), druhým nejčastějším zastoupeným zvířetem byly kočky (19/135), následovali koně (15/135), králíci (13/135), přežvýkavci (12/135), slepice (8/135), prasata (3/135) a několik dalších druhů (11/135) (Tab. 4).

Tab. 4: Přehled lidských a zvířecích vzorků testovaných na přítomnost prvoka *Dientamoeba fragilis* za pomocí cPCR a qPCR (N – celkový počet vzorků).

Hostitel	Kategorie	N	N pozitivní v cPCR	N pozitivní v qPCR
Homo sapiens	lidé	296	22 (7 %)	72 (24 %)
Canis lupus familiaris	psi	54	0	4 (7 %)
Felis silvestris catus	kočky	19	0	1 (5 %)
Equus caballus	koně	15	0	2 (13 %)
Oryctolagus cuniculus domesticus	králíci	13	1 (8 %)	5 (38 %)
Ovis aries	ovce	6	0	1 (17 %)
Capra aegagrus hircus	kozy	4	0	1 (25 %)
Cavia aperea porcellus	morčata	2	0	1 (50 %)
Bos primigenius taurus	krávy	2	0	0
Sus scrofa domestica	prasata	3	0	0
Gallus gallus domesticus	slepice	8	0	0
Testudo horsfieldii	želvy	2	0	0
Psittacus erithacus	papoušek	1	0	0
Columba livia domestica	holub	1	0	0
Phodopus sungorus	křeček	1	0	0
Atelerix albiventris	ježek	1	0	0
Anas platyrhynchos domesticus	kachna	1	0	0
Anser anser domesticus	husa	1	0	0
Phelsuma madagascariensis	felsuma	1	0	0

Soubor humánních vzorků zahrnoval 124 vzorků od mužů (42 %; 124/296) a 172 od žen (58 %; 172/296) ze 14 krajů České republiky. Žádný z dobrovolníků netrpěl chronickým zánětlivým onemocněním střev ani nevykazoval žádné gastrointestinální příznaky nemoci.

Pokud jde o informace o cestování, 52 jedinců uvedlo, že necestovali mimo Českou republiku (18 %; 52/296), 140 respondentů necestovalo v rámci Evropy (47 %; 140/296) a 104 účastníků cestovalo mimo Evropu (35 %, 104/296). Celkově 83 dobrovolníků žije trvale na vesnici (28 %; 83/296) a zbývajících 213 ve městě (72 %; 213/296). Dále 252 dotázaných (85 %; 252/296) uvedlo nedávný kontakt se zvířaty, přičemž 180 (71 %; 180/252) bylo v kontaktu pouze s domácími zvířaty a 72 také se zvířaty hospodářskými (29 %; 72/252).

4.2. Prevalence *Dientamoeba fragilis* na základě cPCR

Konvenční PCR s následnou elektroforézou detekovala *D. fragilis* ve 32 z celkového počtu 431 vzorků, přičemž se jednalo krom jednoho případu jen o lidské vzorky. Sangerovo sekvenování potvrdilo přítomnost *D. fragilis* ve 23 vzorcích, přičemž 22 bylo lidských a jeden zvířecí (králík). Pouze tyto sekvenčně ověřené vzorky byly na základě cPCR vyhodnoceny jako pozitivní (Tab. 5). Na základě tohoto vyhodnocení byla celková prevalence u lidí 7 % (22/296) a 0,7 % u zvířat (1/135). Ze zbývajících devíti vzorků, které se zdály být pozitivní při využití metody cPCR, jsme nebyli schopni získat sekvence a tím pádem byly považovány za negativní.

4.3. Prevalence *Dientamoeba fragilis* na základě qPCR

PCR v reálném čase odhalila *D. fragilis* v 72 lidských vzorcích s prevalencí 24 % (72/296) a v 15 vzorcích od zvířat (11 %; 15/135). Mezi pozitivními zvířaty byly psi (*Canis lupus familiaris*), kočka (*Felis silvestris catus*), morče (*Cavia aperea porcellus*), králíci (*Oryctolagus cuniculus domesticus*), koza (*Capra aegagrus hircus*), ovce (*Ovis aries*) a koně (*Equus caballus*) (Tab. 4). Všech 23 pozitivních vzorků detekovaných pomocí cPCR (a potvrzených Sangerovým sekvenováním) bylo pozitivních i s využitím qPCR (Tab. 4). Protože se nám bohužel nepodařilo získat čistou kulturu *D. fragilis* pro sestavení kvantifikační křivky, tak pro jednotlivé pozitivní vzorky jsou zobrazeny pouze Ct hodnoty (Tab. 6).

4.4. Porovnání citlivosti cPCR a qPCR pro detekci *Dientamoeba fragilis*

Jedním z dílčích cílů této práce bylo porovnat senzitivitu dvou diagnostických přístupů, a to cPCR a qPCR. Na základě výsledků pouze u lidských vzorků (N=296) s použitím McNemarova testu bylo potvrzeno, že qPCR je významně citlivější metodou pro diagnostiku *D. fragilis* ($p < 0,05$; $\chi 2 = 49$; Tab. 5). Navíc byla qPCR úspěšnější v detekci *D. fragilis* i ve zvířecích vzorcích (Tab. 4), které ale nebyly zahrnuty do statistických analýz.

Tab. 5: Porovnání senzitivity cPCR a qPCR pro detekci *D. fragilis* v lidských vzorcích (N=296) s využitím McNemarova testu ($p < 0.05$; $\chi 2 = 49$).

		qPCR		
		positive	**negative**	
cPCR	**positive**	22	0	22 (7 %)
	negative	50	224	274 (93 %)
		72 (24 %)	224 (76 %)	296

4.5. Klonování cPCR pozitivních vzorků pro fylogenetickou analýzu

Pro fylogenetické analýzy bylo nutné provést klonování, aby se předešlo nejasnostem vícenásobných signálů nebo chimér. Jednalo se celkem o dvacet dílčích sekvencí SSU rDNA *D. fragilis*, konkrétně 19 sekvencí z kolonizovaných lidí a jedna z králíka (B174). Kromě toho byla zahrnuta do konečného souboru dat také sekvence DNA *Trichomonas* sp. získaná ze slepice (B131). Tento soubor dat se sestával z deseti izolátů, u kterých se nám povedlo získat sekvence z obou vláken (B9, B13, B126, B224, B238, B288, B329, B338, B174, B131), osmi izolátů, u kterých byla do analýz zahrnuta pouze forward sekvence (B113, B326, B328, B341, B371, B393, B413, B418) a tři izoláty s pouze revers sekvencemi (B24, B82, B345). Výsledný fylogenetický strom (Obr. 4) je již publikovaný v práci Jirků et al. (2022), jejíž jsem spoluautorem.

4.6. Ověření získaných sekvencí na přítomnost *Dientamoeba fragilis*

Sekvence získané z pozitivních vzorků pomocí Sangerova sekvenování jsem porovnala se sekvencemi v databázi GenBank™ prostřednictvím platformy BLASTnt. Většina získaných sekvencí vykazovala shodu se sekvencemi uloženými v databázi nad 97 %.

Tab. 6: Shrnutí pozitivních vzorků od lidí a zvířat za použití qPCR (N = 88) s Ct hodnotami a srovnání s výsledky cPCR.

vzorek	metoda		Ct hodnota	hostitel	vzorek	metoda		Ct hodnota	hostitel
	cPCR	qPCR				cPCR	qPCR		
B45	-	+	15	člověk	**B437**	-	+	34	člověk
B9	+	+	16	člověk	**B372**	-	+	35	člověk
B13	+	+	17	člověk	**B375**	-	+	35	člověk
B126	+	+	17	člověk	**B286**	-	+	35	člověk
B226	-	+	17	člověk	**B289**	-	+	35	člověk
B288	+	+	17	člověk	**B49**	-	+	36	člověk
B312	-	+	17	člověk	**B378**	-	+	37	člověk
B328	+	+	18	člověk	**B34**	-	+	37	člověk
B24	+	+	19	člověk	**B246**	-	+	37	člověk
B373	+	+	19	člověk	**B150**	-	+	38	člověk
B224	+	+	20	člověk	**B31**	-	+	38	člověk
B339	+	+	20	člověk	**B287**	-	+	38	člověk
B371	+	+	20	člověk	**B325**	-	+	39	člověk
B32	-	+	22	člověk	**B331**	-	+	39	člověk
B345	+	+	22	člověk	**B291**	-	+	39	člověk
B418	+	+	23	člověk	**B121**	-	+	39	člověk
B113	+	+	24	člověk	**B416**	-	+	39	člověk
B238	+	+	24	člověk	**B227**	-	+	39	člověk
B347	-	+	24	člověk	**B245**	-	+	39	člověk
B414	-	+	24	člověk	**B41**	-	+	39	člověk
B82	+	+	24	člověk	**B234**	-	+	39	člověk
B329	+	+	25	člověk	**B327**	-	+	39	člověk
B343	-	+	25	člověk	**B3**	-	+	40	člověk
B413	+	+	25	člověk	**B23**	-	+	40	člověk
B326	+	+	26	člověk	**B35**	-	+	40	člověk
B341	+	+	26	člověk	**B106**	-	+	40	člověk
B393	+	+	26	člověk	**B42**	-	+	40	člověk
B225	-	+	27	člověk	**B232**	-	+	40	člověk
B361	-	+	27	člověk	**B174**	+	+	23	králík
B338	+	+	28	člověk	**B263**	-	+	28	králík
B377	+	+	28	člověk	**B262**	-	+	29	morče
B424	-	+	28	člověk	**B163**	-	+	31	králík
B346	-	+	29	člověk	**B151**	-	+	32	králík
B367	-	+	29	člověk	**B422**	-	+	33	koza
B124	-	+	30	člověk	**B285**	-	+	34	králík
B231	-	+	30	člověk	**B229**	-	+	38	kočka
B374	-	+	31	člověk	**B351**	-	+	38	ovce
B425	-	+	31	člověk	**B152**	-	+	39	pes
B430	-	+	31	člověk	**B171**	-	+	39	králík
B431	-	+	31	člověk	**B337**	-	+	39	kůň
B338	-	+	31	člověk	**B369**	-	+	39	pes
B406	-	+	32	člověk	**B137**	-	+	39	pes
B419	-	+	33	člověk	**B205**	-	+	40	kůň
B280	-	+	33	člověk	**B273**	-	+	40	pes

4.7. Vliv vybraných specifických faktorů na výskyt *Dientamoeba fragilis*

Na základě informací získaných z dotazníků od dobrovolníků bylo u všech lidských vzorků pozitivních na přítomnost *D. fragilis* sledováno, existuje-li korelace mezi výskytem tohoto prvoka a některými vybranými faktory, které jsou postupně rozepsány v následujících kapitolách.

4.7.1. Životní styl

Z hlediska vlivu životního stylu na přítomnost *D. fragilis* byly zvoleny dva aspekty: (i) život ve městě versus život na vesnici a (ii) vliv cestování (Tab. 7 a 8). V případě druhého faktoru jsme rozlišovali tři kategorie, a to (a) cestující mimo Evropu, (b) cestující pouze v rámci Evropy a (c) lidé, kteří do zahraničí necestují.

Co se týče lokality bydlení, vyšší prevalence *D. fragilis* byla zjištěna u lidí žijících na vesnici (29 %) oproti lidem z městských oblastí (23 %, Tab. 7), tento rozdíl však nebyl statisticky významný ($p = 0{,}1252$). V případě vlivu cestování jsme pozorovali vyšší prevalenci *D. fragilis* mezi cestovateli. Prevalence mezi lidmi cestujícími v rámci Evropy byla 24 %, zatímco u těch, kteří cestují mimo Evropu 29 % (Tab. 8). Významně se tedy liší od prevalence u necestujících, která činí 15 % ($p = 0{,}0324$).

Tab. 7: Prevalence prvoka *Dientamoeba fragilis* u lidí v závislosti na místě bydliště za použití qPCR (N – počet vzorků v dané kategorii z celkového množství obdržených vzorků).

Bydliště	N	Prevalence
město	213/296	23 % (48/213)
vesnice	83/296	29 % (24/83)

Tab. 8: Prevalence prvoka *Dientamoeba fragilis* u lidí ve vztahu k cestování za použití qPCR (N – počet vzorků v dané kategorii z celkového množství obdržených vzorků).

Cestování	N	Prevalence
vůbec	52/296	15 % (8/52)
v rámci EU	140/296	24 % (34/140)
mimo EU	104/296	29 % (30/104)

4.7.2. Kontakt se zvířaty

Na základě informací od dobrovolníků týkajících se kontaktu se zvířaty jsme následně lidské vzorky rozdělili do tří skupin: (i) bez kontaktu se zvířaty, (ii) kontakt pouze s domácími zvířaty a (iii) kontakt s domácími i hospodářskými zvířaty. Mezi skupinou osob s kontaktem (25 %) a bez kontaktu se zvířaty byl statisticky neprůkazný rozdíl (23 %; Tab. 9). Významný rozdíl ve výskytu *D. fragilis* byl však pozorován mezi skupinou osob, které udávali kontakt jak s hospodářskými tak i domácími zvířaty (36 %) a osobami v kontaktu pouze s domácími zvířaty (20 %; p = 0,0037).

Tab. 9: Prevalence prvoka *Dientamoeba fragilis* u lidí v závislosti na kontaktu se zvířaty za použití qPCR (N – počet vzorků v dané kategorii z celkového množství obdržených vzorků).

Kontakt se zvířaty	N	Prevalence
žádný	44/296	23 % (10/44)
domácí zvířata	180/252*	20 % (36/180)
domácí i hospodářská	72/252*	36 % (26/72)

*celkový počet dobrovolníků, kteří jsou v kontaktu se zvířaty

4.7.3. Rodina

Celkem jsme obdrželi vzorky od 69 rodin, z nichž 34 (tj. 49 %) vždy zahrnovalo alespoň jednoho člena kolonizovaného *D. fragilis*. Kromě toho byla *D. fragilis* detekována v některých rodinách, jejichž členové byli v úzkém kontaktu s domácím mazlíčkem nebo hospodářským zvířetem, které bylo pozitivní na přítomnost *D. fragilis* (za využití qPCR). Jednalo se konkrétně o králíky, kočku, koně, psy a malé přežvýkavce (Tab. 10).

Tab. 10: Přehled rodin s jedinci kolonizovanými prvokem *Dientamoeba fragilis*. Jsou zde zahrnuta i zvířata, se kterými byli tito členové rodiny v častém kontaktu (N členů rodiny – celkový počet členů dané rodiny; N pozitivních členů – počet pozitivních členů dané rodiny za použití qPCR).

N členů rodiny	N pozitivních členů (#vzorek)	Pozitivní zvíře (#vzorek)
3	3 (B371, B372, B373)	pes (B369) a kůň (B337)
4	3 (B338, B339, B341)	ovce (B351)
3	2 (B418, B419)	koza (B422)
4	1 (B150)	králík (B151)
4	1 (B49)	králík (B285)
1	1 (B227)	kočka (B229)

4.7.4. Věk a pohlaví

Získané vzorky byly rozděleny do celkem osmi věkových kategorií (Tab. 11). Nejvyšší prevalence *D. fragilis* byla pozorována ve skupině 4–6 let (50 %) a nejnižší počet pozitivních jedinců byl zjištěn u dětí do tří let (11 %). Mezi věkovými kategoriemi však nebyly zjištěny signifikantní rozdíly (Fisherův exaktní test; $p = 0{,}91$). Stejný závěr byl zjištěn, pokud byl vliv věku (0–79 let) modelován jako spojitá proměnná (zobecněný lineární model; $\chi 2 = 0{,}30$, $p = 0{,}59$). Také párová srovnání proporcí mezi všemi věkovými kategoriemi nezjistila signifikantní rozdíly pomocí binominálního exaktního testu s hodnotami *p* upravenými pomocí Holmovy metody (vše $p > 0{,}34$). V případě vlivu pohlaví nebyl zjištěn rozdíl v prevalenci *D. fragilis* mezi muži (24 %) a ženami (24 %).

Tab. 11: Výskyt prvoka *Dientamoeba fragilis* v jednotlivých věkových kategoriích (N – celkový počet vzorků; N pozitivní – počet pozitivních vzorků za využití qPCR).

Věk	N	N pozitivní	Prevalence (%)
0-3	18	2	11
4-6	14	7	50
7-12	16	7	44
13-17	4	1	25
18-30	73	15	21
31-49	88	21	24
50-60	36	9	25
60+	47	10	21

4.8.Ko-infekce *Dientamoeba fragilis* a jiných střevních prvoků.

Soubor všech vzorků v naší laboratoři byl otestován na přítomnost nejen *D. fragilis,* ale i dalších střevních prvoků, a to *G. intestinalis* a *Blastocystis* spp. (Brožová 2021; Lhotská et al., 2020). Z celkového počtu 296 lidských vzorků byli u dvou odhaleni pomocí metody qPCR všichni tři zkoumaní prvoci. Společným rysem těchto dvou osob bylo cestování mimo EU a kontakt s domácími zvířaty. Dále byla u 29 dobrovolníků zjištěna přítomnost *D. fragilis* a zároveň *Blastocystis* spp. V 35 případech byl *D. fragilis* jediný prvok diagnostikovaný v daném vzorku stolice.

4.9.Vnitřní inhibice

Vzorky, které vyšly negativně na přítomnost *G. intestinalis, Blastocystis* spp. a *D. fragilis* (248), byly podrobeny testu vnitřní inhibice. Ukázalo se, že k vnitřní inhibici nedošlo u žádného ze vzorků.

5. Diskuze

Střevní prvok *Dientamoeba fragilis* byl objeven roku 1909 parazitologem Charlesem Wenyonem, ale popsán byl až v roce 1918 (Jepps & Dobell, 1918). Je tedy znám déle než 100 let, přesto se o jeho roli v mikrobiomu a zdraví člověka stále vedou diskuze. V minulosti byl prvok *D. fragilis* považován za patogena spojovaného s některými střevními onemocněními, jako je například syndrom dráždivého tračníku (IBS – Irritable Bowel Syndrom) (Stark et al., 2007). V posledních letech však přibývá studií zaměřujících se na výskyt *D. fragilis* u zdravých jedinců, kde se tento prvok často objevuje (Holtman et al., 2016; Ögren et al., 2015). Tato skutečnost nás vede k zamyšlení a přehodnocení vnímání role dientaméby v tlustém střevě člověka.

K definitivnímu objasnění role *D. fragilis* v lidském zdraví a nemoci jsou ovšem zapotřebí epidemiologické studie prováděné v první řadě na zdravých (asymptomatických) jedincích, kterých je prozatím velmi málo. Z toho důvodu bylo hlavním cílem této diplomové práce zjistit prevalenci *D. fragilis* v populaci zdravých lidí v České republice. Tato práce je součástí širší studie zabývající se výskytem nejen *D. fragilis*, ale i dalších střevních prvoků, jako je *Blastocystis* spp. a *Giardia intestinalis,* v souboru vzorků stolice získaných od zdravých dobrovolníků (tj. bez střevních symptomů či onemocnění) a trusu různých druhů zvířat, která jsou s danými lidmi v častém kontaktu.

Diagnostika prvoka *Dientamoeba fragilis*

Vzhledem k fragilní povaze trofozoita a malým cystám, které lze v preparátu snadno přehlédnout, a také podobnosti s jinými prvoky, je tradiční mikroskopická diagnostika poměrně náročná a vyžaduje velmi zkušeného pozorovatele (van Gestel et al., 2019). I v případě molekulárních technik úspěch závisí na mnoha faktorech, jako například na rychlosti zpracování vzorku, na citlivosti použité metody či nakládání s izolovanou DNA ze vzorku (Hurych et al., 2022; Stensvold et al., 2007). Obecně vyšší citlivosti pro detekci *D. fragilis* je dosaženo, když se vyšetření stolice provádí bezprostředně po defekaci, ale ve většině klinických laboratoří je to obtížné realizovat. Obvykle vzorky stolice dorazí hodiny (ne-li dny) po vyprázdnění. Použitím klasických metod, jako je například přímý roztěr stolice, je bohužel možné ve skutečnosti pozitivní vzorek zhodnotit při diagnostickém procesu jako negativní, zvláště když je nízká intenzita infekce. Například kolektiv Sarzhanov et al. (2021) prokázal nižší citlivost tradičních mikroskopických metod pro detekci *D. fragilis* ve srovnání

s PCR v reálném čase (qPCR). Konkrétně v tomto případě byla prevalence dientaméby za použití qPCR 12 %, ale mikroskopie neodhalila přítomnost *D. fragilis* vůbec. Stejně tak autoři Yildiz et al. (2022) zjistili nízkou spolehlivost v diagnostice s využitím barvení pomocí trichromu. Z 31 pozitivně vyhodnocených vzorků pomocí konvenčního PCR (cPCR) bylo při barvení roztěrů stolice pozitivních pouze šest. Citlivost mikroskopické diagnostiky se nicméně zvyšuje o více než 30 %, když jsou vzorky stolice vyšetřovány tři po sobě jdoucí dny (Hiatt et al., 1995). To ovšem nic nemění na tom, že mikroskopie je velmi náročnou diagnostickou metodou s relativně nízkou citlivostí.

Molekulární metody jsou oproti tomu rychlejší a spolehlivější. Ve srovnání s cPCR a/nebo mikroskopickým vyšetřením má qPCR vyšší senzitivitu a specificitu při detekci *D. fragilis*. Nejvhodnější metodou pro rutinní diagnostiku *D. fragilis* se tedy zdá být qPCR a některé nedávné studie již tuto metodu běžně používají (Cacciò, 2018; Calderaro et al., 2010; Stensvold & Nielsen, 2012). PCR v reálném čase byla využita i kolektivem Yetismis et al. (2022) při prevalenční studii na andulkách vlnkovaných (*Melopsittacus undulatus*), kde byla prevalence s využitím této molekulární metody 21,3 % (32/150). Mikroskopický přístup s využitím železitého hematoxilinu odhalil přítomnost *D. fragilis* jen u 13 vzorků z celkových 32 pozitivních. V jiné nedávné studii byly mezi sebou porovnány tři diagnostické postupy, a to nativní roztěry, roztěry barvené pomocí trichromu a cPCR. Ta odhalila dientamébu ve 41 vzorcích ze 100, kdežto barvení trichromem jen ve 14 a nativní roztěry pouze ve 13 (Tolba et al., 2022).

V této studii jsme se rozhodli použít a porovnat citlivost dvou molekulárních přístupů pro diagnostiku *D. fragilis*, a to cPCR a qPCR. Ve skupině lidí, která čítala celkem 296 jedinců, jsme pomocí qPCR zjistili celkovou prevalenci 24 %. Bohužel se nám nepodařilo získat kulturu *D. fragilis* pro vytvoření kvantifikační křivky pro stanovení intenzity kolonizace u pozitivně vyhodnocených subjektů pomocí qPCR jako například v případě prvoka *Blastocystis* spp. (Šloufová et al., 2022). Místo toho jsme tedy použili Ct hodnoty, které jsou dány konkrétním amplifikačním cyklem, při kterém úroveň fluorescenčního signálu převyšuje fluorescenci pozadí, a tedy přímo koreluje s množstvím DNA v analyzovaném vzorku. I přes nesnáze se nám nakonec podařilo optimalizovat qPCR protokol pro detekci *D. fragilis* v lidských i zvířecích vzorcích.

Dílčím cílem této diplomové práce bylo také porovnat citlivost pro detekci *D. fragilis* mezi qPCR a cPCR v lidských vzorcích. Real-time PCR identifikovala o 50 pozitivních vzorků více

než cPCR, a byla statisticky vyhodnocena jako citlivější metoda pro detekci *D. fragilis*. Oproti tomu prevalence založená na cPCR byla 7 %. Ke stejným závěrům dospěla i studie Šloufová et al. (2022) porovnávající citlivost molekulárních metod pro detekci jiných střevních prvoků, v tomto případě *Blastocystis* spp.

Prevalence prvoka *Dientamoeba fragilis*

Dientamoeba. fragilis je kosmopolitně rozšířený střevní prvok, jehož prevalence se pohybuje v rozmezí od 0,4 do 91 % (Cengiz et al., 2009; Chan et al., 1996). Dříve se tento prvok objevoval hlavně ve studiích zaměřených na osoby trpící zažívacími obtížemi, ale v poslední době přibývá i výzkumů, které se zaměřují na zdravé jedince. Data o výskytu *D. fragilis* u asymptomatických lidí (tj. jedinců bez gastrointestinálních příznaků nebo onemocnění) jsou i v současné době dostupná především z kontrolních skupin, zařazených do studií zkoumající pacienty s různými gastrointestinální problémy, jako je například akutní nebo chronický průjem či zánětlivé onemocnění střev (IBD - Inflammatory Bowel Disease). Na základě těchto dat bylo zjištěno, že se prevalence *D. fragilis* u zdravých lidí pohybuje mezi 36 % a 71 % (Brands et al., 2019; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., 2015; de Jong et al., 2014; Jokelainen et al., 2017; Krogsgaard et al., 2015). Protože epidemiologické studie používají stále kromě molekulárních metod i klasické koproskopické přístupy, které se mohou vzájemně lišit ve specificitě a senzitivitě (Cacciò, 2018), porovnala jsem naše výsledky hlavně se studiemi využívající qPCR.

Vliv specifických faktorů na výskyt prvoka *Dientamoeba fragilis* u zdravých jedinců

Jedním z dílčích cílů této diplomové práce bylo zjistit, zda existují nějaké korelace mezi určitými specifickými faktory a přítomností *D. fragilis* u lidí. Na základě několika výzkumů se ukazuje, že prevalenci *D. fragilis* může ovlivňovat věk, geografická poloha nebo vyspělost daného státu (Cacciò et al., 2018; Chan et al., 2016). V této práci jsem se zaměřila na vliv několika ze zmíněných proměnných na výskyt *D. fragilis* u zdravých dobrovolníků v České republice, a to konkrétně na vliv lokality bydliště (život ve městě versus život na venkově), kontaktu se zvířaty (hospodářskými a domácími), cestování (v rámci Evropy i mimo ni), věku a pohlaví. Zdrojem těchto informací byly anonymní dotazníky z předchozí studie naší laboratoře zaměřující se na výskyt prvoka *Blastocystis* spp. ve zdravé populaci lidí v České

republice (Lhotská et al., 2020). Bohužel se nám nepodařilo získat stejný počet vzorků ve všech věkových kategoriích, čímž mohou být výsledky této práce částečně ovlivněné. Věk účastníků této studie se pohyboval v rozmezí šesti týdnů až 79 let. Dále může být přítomnost *D. fragilis* ve vzorcích ovlivněn i kvalitou vzorků, jejich skladováním, případně četností zmrazování a rozmrazování při práci s DNA (Hurych et al., 2022).

i) život ve městě/na vesnici

Na téma vlivu lokality bydliště na prevalenci *D. fragilis* zatím mnoho studií neexistuje, pouze Heusinkveld et al. (2016) popsal častější výskyt tohoto prvoka u obyvatel venkova. Předpokládá se, že lidé žijící na vesnici mají vyšší pravděpodobnost setkat se s možnými zdroji dientaméby, kterými může být kontaminovaná voda či potrava (Baqer et al., 2018). Výsledky naší studie odhalují vyšší prevalenci u lidí žijících na vsi (29 %), zatímco u lidí z města byla prevalence 23 %.

ii) kontakt se zvířaty

V naší studii jsme překvapivě nezjistili žádný významný vliv kontaktu se zvířaty na výskyt *D. fragilis* u lidí. Tyto výsledky se shodují se studií Stark et al. (2012), ve které autoři došli k závěru, že domácí zvířata nehrála žádnou roli v přenosu *D. fragilis* na své majitele. Nicméně jsme prokázali možný vliv chovu některých hospodářských zvířat (tj. kůň, ovce, koza, králík), protože více než třetina těchto chovatelů byla kolonizována (36 %). Prevalence *D. fragilis* u majitelů domácích zvířat byla o něco nižší (20 %) než u dobrovolníků, kteří v kontaktu se zvířaty nebyli (23 %). Podobně i celková prevalence u lidí, kteří uvedli jakýkoliv kontakt se zvířaty, byla taktéž 23 %. Na základě těchto faktů ovšem nemůžeme vyvozovat žádné závěry ohledně zoonotického přenosu, jelikož přítomnost *D. fragilis* u zvířat byla potvrzena pouze s využitím qPCR, a bohužel jsme nebyli schopni získat sekvence pro posouzení genetické diverzity. V nedávné studii Yildiz et al. (2022) se podařilo získat sekvence ze vzorků skotu chovaného na farmách, a vždy se jednalo o Genotyp 1, který je nejběžnějším typem i u lidí, což může zoonotický přenos naznačovat. Bohužel majitelé těchto zvířat nebyli zahrnuti do studie. Stejně tak autorský kolektiv Yetismis et al. (2022), který zkoumal prevalenci u andulek vlnkovaných chovaných v zajetí (21,3 %), se zaměřil pouze na zvířata a nikoli na majitele. I zde byl zjištěn Genotyp 1. Naopak v Itálii, kde byla provedena studie na

prasatech, zahrnuli do fylogenetických analýz i vzorky od farmářů. V tomto případě byl pozorován Genotyp 1 jak u prasat, tak jejich ošetřovatelů, což naznačuje možnost zoonotického přenosu (Cacciò et al., 2012b).

iii) cestování

Prevalence *D. fragilis* v evropských zemích je ve většině případů udávána kolem 25 % (de Boer et al., 2020; Jokelainen et al., 2017; Krogsgaard et al., 2015; Menéndez et al., 2019), zatímco v rozvojových zemích je většinou o něco nižší (okolo 10 %) (Aykur et al., 2019; David et al., 2015; Greigert et al., 2018; Sarafraz et al., 2013). Všechny lidské vzorky v našem souboru byly rozděleny do tří skupin, a to (i) lidé, kteří necestují; (ii) lidé, kteří cestují pouze v rámci Evropy; (iii) lidé, kteří cestují i mimo Evropu. Nejvyšší prevalence dientaméby byla zaznamenána u lidí, kteří cestují i mimo Evropu (29 %). O poznání nižší byla prevalence u lidí, kteří necestují vůbec, a to 15 %. U cestovatelů v rámci Evropy byla prevalence 24 %. Cestování, jako možný faktor přispívající k vyšší pravděpodobnosti kolonizace *D. fragilis*, byl zkoumán i v několika dalších studiích (Norberg et al., 2003; Stark et al., 2005b), které se ovšem na rozdíl od nás zaměřovaly na pacienty s různými střevními obtížemi. Vliv cestování na zdravé jedince zkoumal například Jokelainen et al. (2017), v jehož studii byly zahrnuty děti do šesti let. Zde 82 % dětí, které v nedávné době cestovaly do zahraniční, bylo pozitivních na *D. fragilis.*

iv) věk a pohlaví

Obecně se předpokládá častější výskyt *D. fragilis* u dětí do 15 let věku (Menéndez et al., 2019; Norberg et al., 2003)). Naše výsledky ukázaly častý výskyt *D. fragilis* ve skupině dětí mezi sedmým a dvanáctým rokem věku (44 %) a dokonce 50 % u dětí ve věku od čtyř do šesti let, nebyly tyto rozdíly tolik statisticky významné jako v jiných studiích (Aykur et al., 2019; Lagacé-Wiens et al., 2006). Toto může být způsobeno nerovnoměrným počtem vzorků v jednotlivých věkových kategoriích, jak bylo již zmíněno výše. Výskyt *D. fragilis* v ostatních věkových skupinách byl velmi podobný. Další studie z posledních let také ukazují, že se *D. fragilis* vyskytuje častěji u dětí (Fletcher et al., 2014; Menéndez et al., 2019; Norberg et al., 2003). Například ve studii de Boer et al. (2020) byla nejvyšší prevalence *D. fragilis*

pozorována u mladistvých do 20 let věku a stejně tak i kolektiv Lagacé-Wiens et al. (2006) pozoroval dientamébu nejčastěji u chlapců ve věku mezi 16 a 20 let, a to 11,5 %.

Výskyt prvoka *Dientamoeba fragilis* v rámci rodin

Během této studie se povedlo získat vzorky od celkem 69 rodin, a to vždy od více členů každé z nich. Výsledky ukázaly, že alespoň jeden člen rodiny byl pozitivní na přítomnost *D. fragilis* u téměř poloviny rodin (49 %), ale většinou se jednalo o více pozitivních členů. Naše výsledky také naznačují, že pozitivní členové jedné rodiny by mohly být kolonizováni ze stejného zdroje, protože u šesti z nich jsme také detekovali přítomnost *D. fragilis* i u jejich zvířat. Bohužel kvůli chybějícím sekvencím v případě zvířecích vzorků jsme nebyli schopni potvrdit zoonotický přenos. Prevalenčních studií, které by se zabývaly výskytem případných přenosů *D. fragilis* mezi jednotlivými členy rodiny, je dosud velmi málo. Například kolektiv Heusinkveld et al. (2016) zahrnul do své epidemiologické studie celkem 981 dětí a 971 rodičů, přičemž vyšší prevalence byla pozorována v rodinách s více než jedním dítětem.

Ko-infekce prvoků *Dientamoeba fragilis* a *Blastocystis* spp.

Náš soubor lidských vzorků byl podroben diagnostice dalších prvoků, a to *G. intestinalis* a *Blastocystis* spp., kteří byli předmětem jiných studií v naší laboratoři (Brožová, 2021; Lhotská et al., 2020; Šloufová et al., 2022). Tento fakt mi umožnil sledovat ko-infekci více prvoků ve studovaných lidských vzorcích. Na základě výsledků předchozích studií naší laboratoře jsme zjistili, že téměř v polovině vzorků (konkrétně 46 %) od dobrovolníků kolonizovaných prvokem *D. fragilis*, byla zjištěna koinfekce s *Blastocystis* spp. Tyto vzorky (respektive jedince) spojovalo několik faktorů, konkrétně častý kontakt se zvířaty a cestování. Společný výskyt těchto dvou prvoků může naznačovat, že existují sdílené zdroje přenosu nebo oba druhy preferují podobné podmínky ve střevě hostitele. Koinfekce všech tří prvoků (*D. fragilis, Blastocystis* spp. a *G. intestinalis*) byla pozorována pouze ve dvou případech, kdy společným jmenovatelem bylo cestování mimo Evropu a kontakt s domácími mazlíčky. Koinfekce *D. fragilis* a *Blastocystis* spp. byly zkoumány i v jiných studiích, které se však na rozdíl od naší studie zaměřovaly především na pacienty s gastrointestinálním onemocněním (Aykur et al., 2019; Piubelli et al., 2019). Konkrétně například autoři studie z roku 2022 pozorovali koinfekci *D. fragilis* a *Blastocystis* spp. u 33,6% (248/739) pacientů (Burgaña et

al., 2019). O poznání nižší míra koinfekce obou prvoků byla pozorována v jiné studii, a to prevalence 4,2 % (8/193) u imunokompetentních a 1,6 % (4/245) u imunodeficientních účastníků (Sarzhanov et al., 2021).

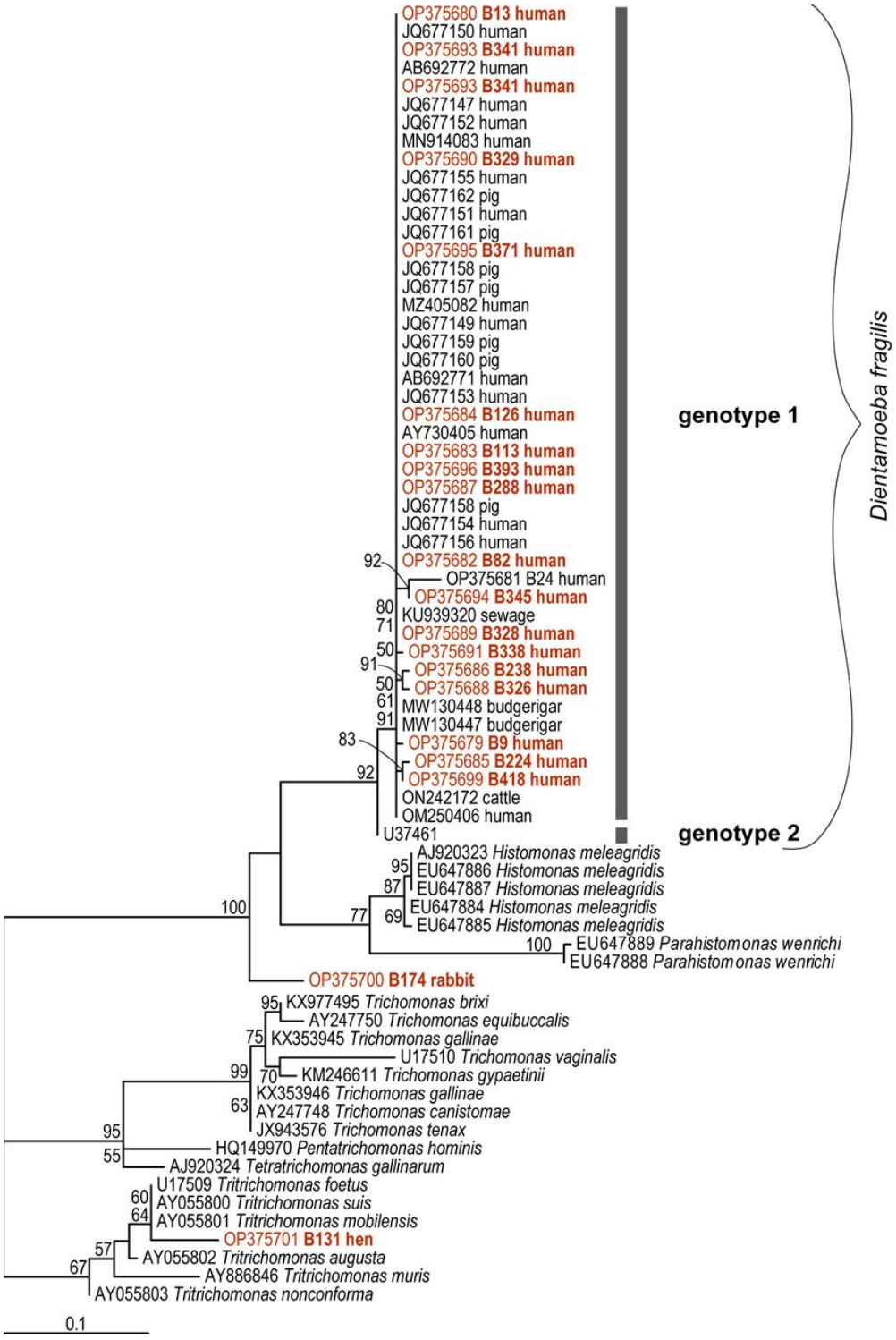
Výskyt prvoka *Dientamoeba fragilis* u zvířat

Naše studie zahrnuje celkem 135 vzorků získaných od 18 druhů zvířat, která byla s účastníky v častém kontaktu. Celkem 11 % z těchto zvířat bylo pozitivních na *D. fragilis* s využitím metody qPCR. Dientaméba byla detekována u sedmi živočišných druhů, a to konkrétně u psů (4/55), kočky (1/19), ovce (1/6), králíků (5/13), koní (2/15), kozy (1/4) a morčete (1/2). Tyto výsledky potvrzují i dřívější studie, ve kterých byla *D. fragilis* diagnostikována pomocí cPCR (kočky a psi), nicméně ovce byla zatím diagnostikována pouze pomocí koproskopických metod (Chan et al., 2016; Noble & Noble, 1952; Yildiz et al., 2022). Oproti studii Yetismis et al. (2022), kde byla zjištěna prevalence u domácích andulek vlnkovaných 21,3 %, jsme neodhalili dientamébu v žádném ptačím vzorku. Naše studie nezjistila *D. fragilis* ani u domácích prasat, na rozdíl od studií provedených v Itálii (Cacciò et al., 2012; Crotti et al., 2007). Autoři těchto studií naopak pozorovali vysokou prevalenci *D. fragilis*. Z hospodářských zvířat byla popsána *D. fragilis* také u krav (Yildiz et al., 2022), u kterých dosahovala prevalence 19 %, a u všech vzorků se jednalo o Genotyp 1. Je překvapivé, že v rozsáhlé studii Chan et al. (2016) byla *D. fragilis* objevena pouze ve dvou vzorcích trusu z celkem 420 zkoumaných zvířat, a to u jednoho psa a kočky z celkového počtu 37 druhů.

Genetická diverzita

Genetická diverzita *D. fragilis* je v porovnání s ostatními prvoky poměrně nízká (Cacciò et al., 2016; Ryan & Cacciò, 2013). Ve většině studií můžeme dosud najít pouze dva hlavní genotypy, které byly navrženy na základě variability tří genů, a to SSU rRNA, EF-1α (elongační faktor 1α) a aktin (Johnson et al., 2004; Stark et al., 2005b; Stensvold et al., 2013). Tyto genotypy se označují jako Genotyp 1 a Genotyp 2, nicméně se v literatuře objevuje i označení Bi / PA. Roku 2009 proběhla studie, kde autoři Hussein et al. (2009) použili pro zkoumání genetické variability metodu HRM (High Resolution Melting), která v rámci 30 vzorků pacientů trpících průjmem a syndromem dráždivého tračníku odhalila čtyři skupiny *D. fragilis*. Nicméně není další studie, která by tyto výsledky zopakovala. Většina prací

zabývajících se fylogenetickou identifikací izolátů *D. fragilis* popisuje nejčastěji se vyskytující Genotyp 1 napříč hostiteli (člověk, zvíře), a také u pacientů i asymptomatických jedinců (Greigert et al., 2018; Unalan-Altintop et al., 2022; Yetismis et al., 2022; Yildiz et al., 2022). Na výsledky mojí magisterské práce ještě navazují fylogenetické výsledky, které jsou již publikované v práci Jirků et al. (2022), jejíž jsem spoluautorem. Tyto výsledky ukázaly, že u lidí se vyskytoval pouze Genotyp 1. U zvířat genotyp nebyl určen, protože nebylo možné získat sekvence, zřejmě kvůli nízkým intenzitám infekcí, jak ukázaly Ct hodnoty v qPCR (Tab. 6). Nicméně podařilo se získat sekvenci z králíka, která na základě fylogenetického stromu (Obr. 4) poukazuje na možnost výskytu velmi příbuzného prvoka *D. fragilis*, který ovšem nebyl zatím popsán. Tato sekvence rDNA SSU byla pomocí databáze BlastNt určena jako *D. fragilis*, ale naše fylogenetické analýzy ukázaly, že jde o silně podporovanou samostatnou větev vedle *D. fragilis, Histomonas meleagridis* a *Parahistomonas wenrichi.* Tato fakta poukazují na fakt, že je zapotřebí optimalizovat nové protokoly více specifičtější pro diagnostiku *D. fragilis*.



Obr. 4: SSU rDNA strom ze sekvencí SSU rDNA *Dientamoeba fragilis* vypočítaných pomocí IQTree. Čísla výše uvedených větví představují maximální pravděpodobnost podpory bootstrapu vypočtená z 10 000 UFBoot. Lišta měřítka představuje 10 substitucí na 100 pozic. Nové sekvence jsou v červené barvě (Jirků et al., 2022).

6. Závěr

V rámci své diplomové práce jsem analyzovala soubor 296 vzorků stolice od dobrovolníků z řad občanů České republiky, kteří netrpí žádným střevním onemocněním a 135 vzorků od zvířat, která byla s danými lidmi v častém kontaktu. S využitím dvou molekulárních metod, konvenční PCR (cPCR) a PCR v reálném čase (qPCR), jsem daný soubor otestovala na přítomnost prvoka *Dientamoeba fragilis*, což bylo hlavním cílem této práce.

Konvenční PCR odhalila *D. fragilis* v 31 lidských vzorcích a jednom zvířecím. Sangerovo sekvenování potvrdilo přítomnost *D. fragilis* ve 23 případech, což značí prevalenci 7 % (22/296) u lidí a 0,7 % u zvířat (1/135). Real-time PCR odhalila prvoka *D. fragilis* v 72 lidských vzorcích, což znamená prevalenci 24 % (72/296) a v 15 zvířecích vzorcích (11%; 15/135). Pozitivně vyhodnocená zvířata jsou psi (*Canis lupus familiaris*), kočka (*Felis silvestris catus*), morče (*Cavia aperea porcellus*), králíci (*Oryctolagus cuniculus domesticus*), koza (*Capra aegagrus hircus*), ovce (*Ovis aries*) a koně (*Equus caballus*). Všechny pozitivně detekované vzorky pomocí metody cPCR (které byly následně potvrzeny Sangerovým sekvenováním), byly pozitivní i s využitím qPCR. Na základě výsledků daných dvou molekulárních přístupů pouze u lidských vzorků (N=296) jsem vyhodnotila jejich citlivost a spolehlivost, což bylo jedním z dílčích cílů mé diplomové práce. S použitím McNemarova testu bylo potvrzeno, že qPCR je významně citlivější metodou pro diagnostiku *D. fragilis*. Navíc byla qPCR úspěšnější v detekci *D. fragilis* i ve zvířecích vzorcích.

Následně jsem vyhodnotila, které z námi stanovených faktorů mohou mít vliv na kolonizaci tímto prvokem, což byl třetí dílčí cíl mé diplomové práce. Rozhodli jsme se sledovat vliv životního stylu, což zahrnovalo místo bydliště (město/vesnice) a cestování (v rámci Evropy, mimo Evropu a necestování). Co se týče lokality bydlení, tak vyšší prevalence byla pozorována u lidí žijících na vesnici oproti lidem z měst, nicméně tento rozdíl nebyl statisticky významný. Ohledně cestování byla nejvyšší prevalence dientaméby zjištěna u lidí cestujících mimo Evropu a nejnižší u lidí, kteří do zahraničí necestují vůbec. Dalším sledovaným faktorem byl kontakt se zvířaty, kde se ukázalo, že nejčastěji se *D. fragilis* vyskytuje u jedinců, kteří jsou v častém kontaktu jak s domácími mazlíčky, tak s hospodářskými zvířaty. Co se týče věku, tak nejčastěji byl prvok *D. fragilis* pozorován u dětí ve věku čtyř až šesti let. V rámci pohlaví nebyl v prevalenci mezi muži a ženami žádný rozdíl. Nicméně se nám nepodařilo nashromáždit rovnoměrný počet vzorků ve všech věkových kategoriích, proto nelze vyvozovat vážnější závěry.

Na základě výsledků dalších prevalenčních studií, konkrétně prvoků *G. intestinalis* a *Blastocystis* spp., provedených naší laboratoří na stejném souboru dobrovolníků, jsme zjistili častou ko-infekci *D. fragilis* a *Blastocystis* spp.

7. Seznam použité literatury

Aykur, M., Calıskan Kurt, C., Dirim Erdogan, D., Biray Avcı, C., Vardar, R., Aydemir, S., Girginkardeşler, N., Gündüz, C., Dagci, H. (2019). Investigation of *Dientamoeba fragilis* prevalence and evaluation of sociodemographic and clinical features in patients with gastrointestinal symptoms. *Acta Parasitologica*, 64: 162–170.

Banik, G. R., Barratt, J. L. N., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J. T., Stark, D. (2011). A case-controlled study of *Dientamoeba fragilis* infections in children. *Parasitology*, 138: 819–823.

Banik, G. R., Birch, D., Stark, D., Ellis, J. T. (2012). A microscopic description and ultrastructural characterisation of *Dientamoeba fragilis*: An emerging cause of human enteric disease. *International Journal for Parasitology*, 42: 139–153.

Baqer, N. N., Hammood, A. H., Hassan, K. F., Hassan, E. (2018). Detection of water-borne parasites in drinkung water of Baghdad, Iraq. *African Journal of Infectious Diseases*, 12: 1–6.

Barratt, J. L. N., Harkness, J. M., Ellis, J. T. Stark, D. (2011). The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis* : the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology*, 138: 557–572.

Barratt, J. L. N., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T., Stark, D. (2011). 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: 7-19.

Bosman, D. K., Benninga, M. A., van de Berg, P., Kooijman, G. C., van Gool, T. (2004). *Dientamoeba fragilis*: possibly an important cause of persistent abdominal pain in children. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 148: 575–579.

Brands, M. R., Van De Vijver, E., Haisma, S. M., Heida, A., Van Rheenen, P. F. (2019). No association between abdominal pain and *Dientamoeba* in Dutch and Belgian children. *Archives of Disease in Childhood*, 104: 686–689.

Brožová, K. (2021). Průzkum výskytu oportunního prvoka, *Giardia intestinalis*, u zdravých lidí a jejich zvířat v ČR s použitím qPCR.

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. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21: 592.e9-19.

Burgaña, A., Abellana, R., Yordanov, S. Z., Kazan, R., Pérez Ortiz, A. M., Ramos, C. C., Hernández, C. G., Rivero, M. M., Gonçalves, A. Q., Padilla, E., Pérez, J., García-Puig, R., Perez-Porcuna, T. M. (2019). Paromomycin is superior to metronidazole in *Dientamoeba fragilis* treatment. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 11: 95–100.

Burrows, R. B., Swerdlow, M. A. (1956). *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *5*: 258–265.

Cacciò, S. M. (2018). Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis*. *Acta Tropica*, 184: 73–77.

Cacciò, S. M., Sannella, A. R., Bruno, A., Stensvold, C. R., David, E. B., Guimarães, S., Manuali, E., Magistrali, C., Mahdad, K., Beaman, M., Maserati, R., Tosini, F., Pozio, E. (2016). Multilocus sequence typing of *Dientamoeba fragilis* identified a major clone with widespread geographical distribution. *International Journal for Parasitology*, 46: 793–798.

Cacciò, S. M., Sannella, A. R., Manuali, E., Tosini, F., Sensi, M., Crotti, D., Pozio, E. (2012). Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 18: 838–841.

Calderaro, A., Gorrini, C., Montecchini, S., Peruzzi, S., Piccolo, G., Rossi, S., Gargiulo, F., Manca, N., Dettori, G., Chezzi, C. (2010). Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67: 239–245.

Camp, R. R., Mattern, C. F. T., Honigberg, B. M. (1974). Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell I. Electronmicroscopic observations of the binucleate stages II. Taxonomic position and revision of the genus. *The Journal of Protozoology*, 21: 69–82.

Cengiz, Z., Akbayram, S., Ciçek, M., Yilmaz, H. (2009). Intestinal parasitoses detected in primary schoolchildren in the Van province. *Turkiye parazitolojii dergisi*, 33: 289–293.

Chan, D., Barratt, J., Roberts, T., Phillips, O., Šlapeta, J., Ryan, U., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J., Stark, D. (2016). Detection of *Dientamoeba fragilis* in animal faeces using species specific real time PCR assay. *Veterinary Parasitology*, 227: 42–47.

Chan, F., Stewart, N., Guan, M., Robb, L., Fuite, L., Chan, I., Diaz-Mitoma, F., King, J., MacDonald, N., Mackenzie, A. (1996). Prevalence of *Dientamoeba fragilis* antibodies in children and recognition of a 39 kDa immunodominant protein antigen of the organism. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15: 950–954.

Clark, C. G., Röser, D., Stensvold, C. R. (2014). Transmission of *Dientamoeba fragilis*: Pinworm or cysts? *Trends in Parasitology*, 30: 136–140.

Clemente, L., Pasut, M., Carlet, R., Ruscio, M., Fontana, F. (2021). *Dientamoeba fragilis* in the North-East of Italy: Prevalence study and treatment. *Parasitology International*, 80: 102227.

Crotti, D., Sensi, M., Crotti, S., Grelloni, V., Manuali, E. (2007). *Dientamoeba fragilis* in swine population: a preliminary investigation. *Veterinary Parasitology*, 145: 349–351.

David, É. B., Guimarães, S., de Oliveira, A. P., Goulart de Oliveira-Sequeira, T. C., Nogueira Bittencourt, G., Moraes Nardi, A. R., Martins Ribolla, P. E., Bueno Franco, R. M., Branco, N., Tosini, F., Bella, A., Pozio, E., Cacciò, S. M. (2015). Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasites & Vectors*, 8: 103.

de Boer, M. D., Schuurs, T. A., Vermeer, M., Ruijs, G. J. H. M., van der Zanden, A. G. M., Weel, J. F., Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S. (2020). Distribution and relevance of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis species* in gastroenteritis: results from a case-control study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 39: 197–203.

de Jong, M. J., Korterink, J. J., Benninga, M. A., Hilbink, M., Widdershoven, J., Deckers-Kocken, J. M. (2014). *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: a case-control study. *Archives of Disease in Childhood*, 99: 1109–1113.

Dobell, C. (1940). Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man: X. The life-history of *Dientamoeba fragilis*: observations, experiments, and speculations. *Parasitology*, 32: 417–461.

Engsbro, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V, Bytzer, P. (2012). Treatment of *Dientamoeba fragilis* in patients with irritable bowel syndrome. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 1046–1052.

Fletcher, S., Caprarelli, G., Merif, J., Andresen, D., Van Hal, S., Stark, D., Ellis, J. (2014). Epidemiology and geographical distribution of enteric protozoan infections in Sydney, Australia. *Journal of Public Health Research*, 3: 83–91.

Girginkardeşler, N., Coşkun, S., Cüneyt Balcioğlu, I., Ertan, P., Ok, U. Z. (2003). *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9: 110–113.

Girginkardeşler, N., Kurt, O., Kilimcioğlu, A. A., Ok, U. Z. (2008). Transmission of *Dientamoeba fragilis*: evaluation of the role of *Enterobius vermicularis. Parasitology International*, 57: 72–75.

Greigert, V., Abou-Bacar, A., Brunet, J., Nourrisson, C., Pfaff, A. W., Benarbia, L., Pereira, B., Randrianarivelojosia, M., Razafindrakoto, J. L., Rakotomalala, R. S., Morel, E., Candolfi, E., Poirier, P. (2018). Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa. *PLoS ONE*, 13: 1–17.

Hegner, R., Chu, H. J. (1930). A comparative study of the intestinal protozoa of wild monkeys and man. *American Journal of Hygiene*, 12: 3-10.

Helenbrook, W. D., Wade, S. E., Shields, W. M., Stehman, S. V, Whipps, C. M. (2015). Gastrointestinal parasites of ecuadorian mantled howler monkeys (*Alouatta palliata aequatorialis*) based on fecal analysis. *The Journal of Parasitology*, 101: 341–350.

Heusinkveld, M., Mughini-Gras, L., Pijnacker, R., Vennema, H., Scholts, R., van Huisstede-Vlaanderen, K. W., Kortbeek, T., Kooistra-Smid, M., van Pelt, W. (2016). Potential causative agents of acute gastroenteritis in households with preschool children: prevalence, risk factors, clinical relevance and household transmission. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 35: 1691–1700.

Hiatt, R. A., Markell, E. K., Ng, E. (1995). How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 36–39.

Holtman, G. A., Kranenberg, J. J., Blanker, M. H., Ott, A., Lisman-van Leeuwen, Y., Berger, M. Y. (2017). *Dientamoeba fragilis* colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level. *Family Practice*, 34: 25–29.

Hurych, J., Vodolanova, L., Vejmelka, J., Drevinek, P., Kohout, P., Cinek, O., Nohynkova, E. (2022). Freezing of faeces dramatically decreases the viability of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis*. In *European journal of gastroenterology & hepatology* 34: 242–243.

Hussein, E. M., Al-Mohammed, H. I., Hussein, A. M. (2009). Genetic diversity of *Dientamoeba fragilis* isolates of irritable bowel syndrome patients by high-resolution melting-curve (HRM) analysis. *Parasitology Research*, 105: 1053–1060.

Jepps, M. W., Dobell, C. (1918). *Dientamoeba fragilis* n. g., n. sp., a new intestinal amoeba from man. *Parasitology*, 10: 352–367.

Jirků, M., Kašparová, A., Lhotská, Z., Oborník, M., Brožová, K., Petrželková, K. J., Samaš, P., Kadlecová, O., Stensvold, C. R., Jirků, K. (2022). A cross-sectional study on the occurrence of the intestinal protist, *Dientamoeba fragilis*, in the gut-healthy volunteers and their animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 15407.

Johnson, E. H., Windsor, J. J., Clark, C. G. (2004). Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 553–570.

Jokelainen, P., Hebbelstrup Jensen, B., Andreassen, B. U., Petersen, A. M., Röser, D., Krogfelt, K. A., Nielsen, H. V, Stensvold, C. R. (2017). *Dientamoeba fragilis*, a commensal in children in danish day care centers. *Journal of Clinical Microbiology*, 55: 1707–1713.

Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257–260.

Kofoid, C. A. (1923). Amoeba and man. *Amoeba and Man.*

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

Kurt, O., Girginkardeşler, N., Balcioğlu, I. C., Ozbilgin, A., Ok, U. Z. (2008). A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of dientamoebiasis. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14: 601–604.

Lagacé-Wiens, P. R., VanCaeseele, P. G., Koschik, C. (2006). *Dientamoeba fragilis:* an emerging role in intestinal disease. In *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 175: 468–469.

Lankester, F., Kiyang, J. A., Bailey, W., Unwin, S. (2010). *Dientamoeba fragilis:* initial evidence of pathogenicity in the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine : Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 41: 350–352.

Lhotská, Z., Jirků, M., Hložková, O., Brožová, K., Jirsová, D., Stensvold, C. R., Kolísko, M., Jirků 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. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 544335.

Maloney, J. G., Molokin, A., Santin, M. (2020). Use of Oxford nanopore MinION to generate full-length sequences of the *Blastocystis* small subunit (SSU) rRNA gene. *Parasites & Vectors*, 13: 595.

Menéndez, C., Fernández-Suarez, J., Boga Ribeiro, J. A., Rodríguez-Pérez, M., Vázquez, F., Gonzalez-Sotorrios, N., Rodríguez-Guardado, A. (2019). Epidemiological and clinical characteristics of *Dientamoeba fragilis* infection. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 37: 290–295.

Menu, E., Davoust, B., Mediannikov, O., Akiana, J., Mulot, B., Diatta, G., Levasseur, A., Ranque, S., Raoult, D., Bittar, F. (2021). Occurrence of ten protozoan enteric pathogens in three non-human primate populations. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10: 280.

Munasinghe, V. S., Vella, N. G. F., Ellis, J. T., Windsor, P. A., Stark, D. (2013). Cyst formation and faecal-oral transmission of *Dientamoeba fragilis* - The missing link in the life cycle of an emerging pathogen. *International Journal for Parasitology*, 43: 879–883.

Myers, B. J., Kuntz, R. E. (1968). Intestinal protozoa of the baboon *Papio doguera pucheran*, 1856. *The Journal of Protozoology*, 15: 363–365.

Noble, G. A., Noble, E. R. (1952). Entamoebae in farm mammals. *The Journal of Parasitology*, 38: 571–595.

Norberg, A., Nord, C. E., Evengård, B. (2003). *Dientamoeba fragilis*-a protozoal infection which may cause severe bowel distress. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9: 65–68.

Ockert, G. (1990). Symptomatology, pathology, epidemiology, and diagnosis of *Dientamoeba fragilis*. *Trichomonads Parasitic in Humans*, 394–410.

Ockert, G., Schulz, U. (1972). Pathogenetic role of *Dientamoeba fragilis*. *Das Deutsche Gesundheitswesen*, 27: 1156–1158.

Ögren, J., Dienus, O., Löfgren, S., Einemo, I. M., Iveroth, P., Matussek, A. (2015). *Dientamoeba fragilis* prevalence coincides with gastrointestinal symptoms in children less than 11 years old in Sweden. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34: 1995–1998.

Ögren, J., Dienus, O., Löfgren, S., Iveroth, P., Matussek, A. (2013). *Dientamoeba fragilis* DNA detection in *Enterobius vermicularis* eggs. *Pathogens and Disease*, 69: 157–158.

Piubelli, C., Soleymanpoor, H., Giorli, G., Formenti, F., Buonfrate, D., Bisoffi, Z., Perandin, F. (2019). *Blastocystis* prevalence and subtypes in autochthonous and immigrant patients in a referral centre for parasitic infections in Italy. *PloS One*, 14: e0210171.

Preiss, U., Ockert, G., Broemme, S., Otto, A. (1991). On the clinical importance of *Dientamoeba fragilis* infections in childhood. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology*, 35: 27–34.

Röser, D., Simonsen, J., Nielsen, H. V., Stensvold, C. R., Mølbak, K. (2013). *Dientamoeba fragilis* in Denmark: Epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32: 1303–1310.

Röser, D., Simonsen, J., Stensvold, C. R., Olsen, K. E. P., Bytzer, P., Nielsen, H. V, Mølbak, K. (2014). Metronidazole therapy for treating dientamoebiasis in children is not associated with better clinical outcomes: a randomized, double-blinded and placebo-controlled clinical trial. *Clinical Infectious Diseases*, 58: 1692–1699.

Růžičková, A. (2020). Role střevního prvoka *Dientamoeba fragilis* v lidském zdraví a nemoci.

Ryan, U., Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43: 943–956.

Sarafraz, S., Farajnia, S., Jamali, J., Khodabakhsh, F., Khanipour, F. (2013). Detection of *Dientamoeba fragilis* among diarrheal patients referred to Tabriz health care centers by nested PCR. *Tropical Biomedicine*, 30: 113–118.

Sarzhanov, F., Dogruman-Al, F., Santin, M., Maloney, J. G., Gureser, A. S., Karasartova, D., Taylan-Ozkan, A. (2021). Investigation of neglected protists *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in immunocompetent and immunodeficient diarrheal patients using both conventional and molecular methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15: 1–23.

Silberman, J. D., Clark, C. G., Sogin, M. L. (1996). *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 76: 311–314.

Šloufová, M., Lhotská, Z., Jirků, M., Petrželková, K. J., Stensvold, C. R., Cinek, O., Pomajbíková, K. J. (2022). Comparison of molecular diagnostic approaches for the detection and differentiation of the intestinal protist *Blastocystis* sp. in humans. *Parasite (Paris, France)*, 29: 30.

Stark, D., Barratt, J., Chan, D., Ellis, J. T. (2016). *Dientamoeba fragilis*, the neglected trichomonad of the human bowel. *Clinical Microbiology Reviews*, 29: 553–580.

Stark, D., Barratt, J., Roberts, T., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J. (2010). A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 614–619.

Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., Harkness, J. (2005a). Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *International Journal for Parasitology*, 35: 57–62.

Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., Harkness, J. (2005b). Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an Australian population. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 2718–2723.

Stark, D., Garcia, L. S., Barratt, J. L. N., Phillips, O., Roberts, T., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J. T. (2014). Description of *Dientamoeba fragilis* cyst and precystic forms from human samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 52: 2680–2683.

Stark, D., Phillips, O., Peckett, D., Munro, U., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J. (2008). Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: an update on the life cycle and host distribution. *Veterinary Parasitology*, 151: 21–26.

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

Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Mølbak, K., Nielsen, H. V. (2007). The prevalence of *Dientamoeba fragilis* in patients with suspected enteroparasitic disease in a metropolitan area in Denmark. *Clinical Microbiology and Infection*, 13: 839–842.

Stensvold, C. R., Clark, C. G., Röser, D. (2013). Limited intra-genetic diversity in *Dientamoeba fragilis* housekeeping genes. *Infection, Genetics and Evolution*, 18: 284–286.

Stensvold, C. R., Nielsen, H. V. (2012). Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. *Journal of clinical microbiology*, 50: 540–541.

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

Tolba, M. M., Allam, A. F., Khalil, S. S., Elshouki, W. M., Shehab, A. Y. (2022). Evaluation of microscopy and PCR for detection of *Dientamoeba fragilis. Tropical Parasitology*, 12: 87–93.

Unalan-Altintop, T., Vahabov, C., Ergunay, K., Kurt, O., Kav, T., Akyon, Y., Erguven, S. (2022). Investigation of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* in patients from Turkey with ulcerative colitis and irritable bowel syndrome: Any relation with genotypes? *Acta Tropica*, 231: 106451.

Van Gestel, R. S. F. E., Kusters, J. G., Monkelbaan, J. F. (2019). A clinical guideline on *Dientamoeba fragilis* infections. *Parasitology*, 146: 1131–1139.

Verweij, J. J., Mulder, B., Poell, B., van Middelkoop, D., Brienen, E. A. T., van Lieshout, L. (2007). Real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. *Molecular and Cellular Probes*, 21: 400–404.

Verweij, J. J., Stensvold, C. R. (2014). Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27: 371–418.

Wenrich, D. H. (1936). Studies on *Dientamoeba fragilis* (protozoa). I. Observations with special reference to nuclear structure. *The Journal of Parasitology*, 22: 76–83.

Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M. A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., Khan, R. (2010). *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitology Research*, 107: 679–684.

Yetismis, G., Yildirim, A., Pekmezci, D., Duzlu, O., Ciloglu, A., Onder, Z., Simsek, E., Ercan, N., Pekmezci, G. Z., Inci, A. (2022). First report and genotyping of *Dientamoeba fragilis* in pet budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), with zoonotic importance. *Zoonoses and Public Health*, 69: 572–578.

Yildiz, İ., Aynur, Z. (2022). First detection and molecular characterization of *Dientamoeba fragilis* in cattle. *Zoonoses and Public Health*, 69: 897–903.