

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Role střevního prvoka *Dientamoeba fragilis* v lidském zdraví a nemoci**

Bakalářská práce

**Andrea Růžičková**

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, PhD.

Školitel – specialista: RNDr. Milan Jirků

České Budějovice 2020

Růžičková A. (2020): Role střevního prvoka *Dientamoeba fragilis* v lidském zdraví a nemoci [The role of intestinal protist *Dientamoeba fragilis* in human health and disease. Bc. Thesis, in Czech] – 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

The main aim of this study was to summarize available information about the gut protist *Dientamoeba fragilis* with special focus on the influence of selected factors such as age, gender, travelling or lifestyle to its colonization. It was first described in 1918 by Jepps and Dobell. First, *D. fragilis* was classified as an amoeba but later, based on molecular studies, was revealed that it is closely related to the trichomonads. *Dientamoeba fragilis* has three life forms – cyst, precyst and trophozoite. Until recently, only trophozoite of *D. fragilis* stage was known and the way of transmission between individuals was not clear. Thus, it was hypothesized that *D. fragilis* trophozoites are transmitted with eggs of some worms colonizing gastrointestinal tract. Recently, the cyst and precyst stages were discovered. In addition to humans, the presence of *D. fragilis* has been observed in primates, pigs and some pets. Mice seem to be successful experimental models. In terms of age factor, *D. fragilis* is most common in young children. There have not been revealed any correlations between occurrence of *D. fragilis* and gender. Pathogenicity of *D. fragilis* is another controversial fact about this organism. In past, it was considered a pathogen causing gastrointestinal disorders, mainly in children. However, a few recent epidemiological studies focused on healthy human population highlighted that *D. fragilis* appears to be more common in people without no gastrointestinal problems. Despite of this, there is still a small number of epidemiological studies on people with no intestinal problems, thus, it is difficult to compare prevalence of *D. fragilis* between healthy populations and patients suffering from intestinal diseases. Occurrence of *D. fragilis* is more prevalent in developed countries in contrast to Western populations. RT-PCR was evaluated as the most optimal method of detection of this organism from stool samples. The role of this intestinal protist in health and disease remains the subject of scientific discussions. But according to some new studies this organism tends to commensal character in the human body. At the end of this theoretical work is a brief summary of the current experimental work, which will be presented in detail in the master thesis.

**Prohlášení:**

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

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

V Českých Budějovicích dne:

Podpis:

**Poděkování:**

Tímto bych ráda chtěla poděkovat Kateřině a Milanovi Jirků za velkou trpělivost, ochotu a odborné vedení, které mi během přípravy této bakalářské práce věnovali.

Dále také děkuji celému týmu Laboratoře parazitární terapie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v.v.i. za pomoc a přátelské prostředí.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala radě Studentské grantové agentury, která mi udělila studentský grant. Ten pomohl financovat experimentální práci, kterou jsem vypracovávala paralelně s touto rešeršní bakalářskou prací.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	1
<b>2. Cíle práce</b> .....	3
<b>3. Biologie prvoka <i>Dientamoeba fragilis</i></b> .....	4
3.1. Taxonomie .....	4
3.2. Morfologická stádia .....	4
3.2.1. Stádium trofozoita .....	5
3.2.2. Stádium cysty .....	7
3.2.3. Stádium precysty .....	8
3.3. Životní cyklus .....	8
3.4. Hostitelská specifita .....	10
3.4.1. Identifikace hostitelů na základě nálezu přirozených infekcí.....	10
3.4.2. Identifikace hostitelů na základě experimentálních studií.....	10
3.5. Genetická diverzita .....	11
<b>4. Diagnostika prvoka <i>Dientamoeba fragilis</i></b> .....	13
4.1. Nativní preparát .....	13
4.2. Metody barvení roztěrů.....	13
4.3. Kultivace .....	15
4.4. Molekulární diagnostika .....	16
4.4.1. PCR (polymerázová řetězová reakce) .....	16
4.4.2. Real Time-PCR (PCR v reálném čase).....	17
4.5. Imuno-diagnostika .....	17
<b>5. Epidemiologie prvoka <i>Dientamoeba fragilis</i></b> .....	19
5.1. Faktory ovlivňující kolonizaci člověka.....	19
5.1.1. Věk a pohlaví.....	19
5.1.2. Západní civilizace <i>versus</i> rozvojové země .....	20

5.1.3. Cestování .....	21
<b>6. Role <i>D. fragilis</i> ve zdraví a nemoci .....</b>	<b>23</b>
6.1. Klinická manifestace u lidí .....	23
6.2. Klinická manifestace u zvířat.....	24
6.3. Terapie .....	24
6.3.1. Metronidazol.....	24
6.3.2. Clioquinol .....	25
6.3.3. Paromomycin.....	26
6.4. Role prvoka <i>Dientamoeba fragilis</i> v mikrobiomu .....	27
<b>7. Experimentální část.....</b>	<b>28</b>
7.1. Materiál a metodika .....	28
7.1.1. Získávání vzorků .....	28
7.1.2. Diagnostické metody .....	28
7.2. Průběžné výsledky .....	32
<b>8. Závěr .....</b>	<b>33</b>
<b>9. Seznam citované literatury .....</b>	<b>34</b>

# 1. Úvod

Ačkoli je přítomnost různých organismů v lidském těle známá více než sto let, teprve na počátku 21. století vědci začali odhalovat rozsah osídlení a diverzitu mikroorganismů v lidském těle, a to díky širokému použití nových diagnostických metod. Velká pozornost je věnována střevnímu mikrobiomu, který se ukazuje jako velmi rozmanitý a dynamický ekosystém. Vzhledem k hlubšímu rozpoznávání jeho role ve zdraví i nemoci získal statut „nového orgánu“ (Baquero a Nombela, 2012). Je tvořen bakteriemi, viry, mikroskopickými houbami, řasami, archebakteriemi a eukaryotními organismy, jedno- i mnohobuněčnými (mezi ně patří prvoci a helminti).

Střevní mikrobiom má zásadní vliv na lidské zdraví v prvním půlroce života člověka, kdy se začíná formovat a vyvíjet imunitní systém a zároveň i jeho regulace (Lazar *et al.*, 2018). Hygienická hypotéza, kterou publikoval v roce 1989 D. P. Strachan říká, že snížená expozice jedince vůči environmentálním mikroorganismům, především v průběhu dětství, zvyšuje riziko manifestace imunitně zprostředkovaných onemocnění (Strachan, 1989). Později byla tato hypotéza přeformulována a rozvedena na tzv. „Old Friends“ hypotézu, která pojednává o významu mikroorganismů pro vývoj a regulaci imunitního systému (Rook, 2012). „Old Friends“ se stali součástí našeho mikrobiomu v průběhu první epidemiologické transmise (tj. období neolitické revoluce) a díky koevoluci se stali podstatnou komponentou pro lidské zdraví. Z důvodu jejich pozdějšího odstranění z prostředí člověka během druhé epidemiologické transmise (jehož počátek se datuje do průmyslové revoluce a přetrvává dodnes) došlo ke snižování diverzity střevního bakteriálního mikrobiomu. To má dopad na nastavení a fungování imunitního systému člověka a tím pádem přispívá k současnému vzestupu imunitně zprostředkovaných onemocnění v tzv. Západním světě (Rook, 2012; Rook *et al.*, 2014).

Skupina imunitně zprostředkovaných onemocnění zahrnuje hypersenzitivity, jakými jsou především různé alergie či alergické astma (Parker a Ollerton, 2013). Dále zahrnuje také autoimunitní onemocnění, například celiakii, roztroušenou sklerózu nebo nespecifické střevní záněty, jako je například Crohnova choroba. Skokový nárůst těchto nemocí byl dáván do souvislosti s moderním způsobem života, jehož součástí jsou vyšší hygienické návyky, přístup k chemicky upravované vodě a potravinám a v neposlední řadě nadměrné užívání antibiotik (Parker a Ollerton, 2013; Rook, 2012; Rook *et al.*, 2014; Rook *et al.*, 2017; Strachan, 1989). Vlivem všech těchto faktorů se postupně omezuje spektrum mikroorganismů

v našem prostředí a následně také snižuje množství „Old Friends“ ve střevním mikrobiomu člověka. Velké množství vědeckých poznatků získaných během posledního desetiletí přináší důkazy, že střevní mikroorganismy jsou nepostradatelné pro správný vývoj lidského imunitního systému a jeho regulaci. Důležitou roli hraje nejen rozmanitost jeho složení, ale i jeho stabilita a kompozice jednotlivých skupin mikroorganismů (Lazar *et al.*, 2018).

Výzkum střevního mikrobiomu se dosud zaměřoval především na bakteriální složku, zatímco ostatní organismy, například střevní prvoci, byli opomíjeni. Nedávný výzkum ale poukazuje na významný vliv střevních prvoků (zejména komezálních) ve zdraví a nemoci, ale i na to, že jejich role v rámci střevního mikrobiomu se teprve začíná objasňovat (Chabé *et al.*, 2017; Lukeš *et al.*, 2015). Proto jsou dnes prvoci *Blastocystis* spp., *Giardia intestinalis* nebo *Dientamoeba fragilis* předmětem mnoha recentních studií.

Tato práce si klade za cíl shrnout dosavadní poznatky o střevním prvoku *Dientamoeba fragilis*, o jehož roli a významu v lidském mikrobiomu se ve vědecké komunitě vedou dodnes spory.



## 2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce je shrnout dostupné a aktuální informace o prvoku *Dientamoeba fragilis*, jehož role v lidském zdraví a nemoci není dosud zcela jasná.

Pro splnění hlavního záměru byly vytyčeny následující dílčí cíle:

- shrnout základní poznatky o prvoku *D. fragilis*;
- aktualizovat informace o výskytu *D. fragilis* u zdravých lidí a pacientů trpících střevními onemocněními;
- srovnat údaje o výskytu *D. fragilis* u lidí v západní společnosti a zemích třetího světa;
- shrnout znalosti o faktorech, které mohou ovlivňovat výskyt *D. fragilis* u zdravých lidí (např. věk, pohlaví, životní styl, cestování apod.);

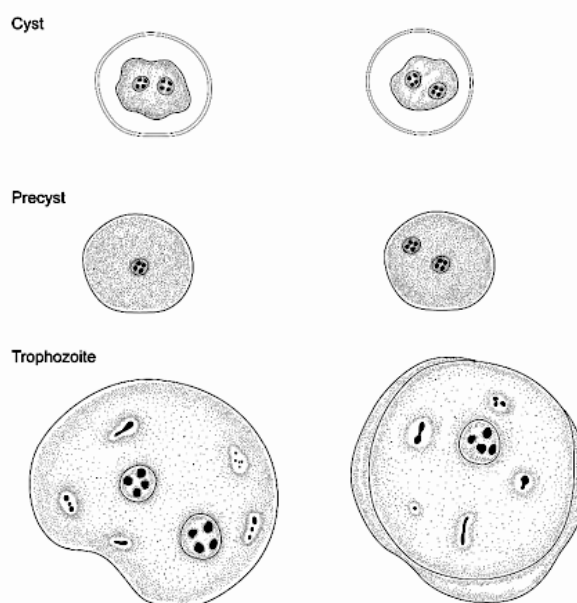
### 3. Biologie prvoka *Dientamoeba fragilis*

#### 3.1. Taxonomie

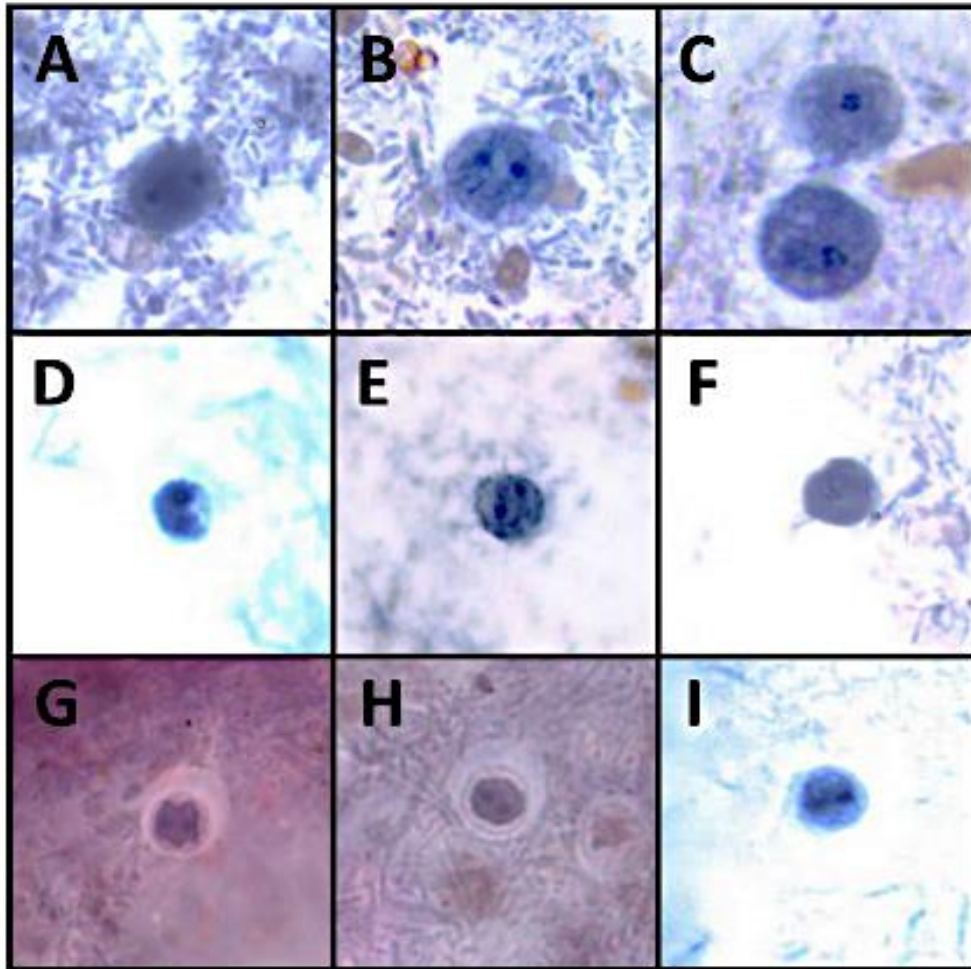
Prvok *Dientamoeba fragilis* byl objeven anglickým parazitologem Charlesem Wenyonem roku 1909, avšak popsali jej až v roce 1918 Margaret Jepps a Clifford Dobell (Jepps a Dobell, 1918). Ti zmíněný organismus zařadili na základě morfologie ve stádiu trofozoita (dvoujaderné formy) a absenci stádia cysty mezi améby. Později, při dalších pozorováních, byly objeveny struktury, které odpovídají složkám parabazálního aparátu známého u trichomonád (Camp *et al.*, 1974). Na základě výsledků pozorování pomocí elektronové mikroskopie a molekulárně-fylogenetických analýz se potvrdilo, že *D. fragilis* je s trichomonádami blízce příbuzná (Camp *et al.*, 1974; Dwyer, 1972; Silberman *et al.*, 1996; Talis, 1967). Dnes se tudíž i přes zavádějící pojmenování řadí mezi Parabasalia: Trichomonadida (Stark *et al.*, 2016).

#### 3.2. Morfologická stádia

V životním cyklu *D. fragilis* byla dlouho známá pouze forma trofozoita. Nedávné studie ale popisují i stádium cysty a precysty (Obr. 1 a 2) (Stark *et al.*, 2014).



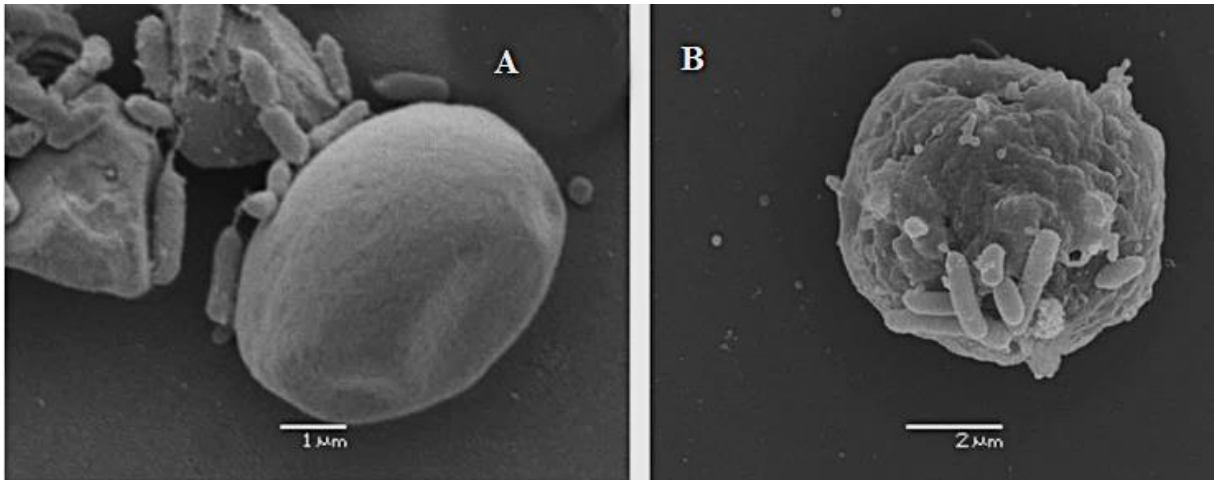
**Obr. 1:** Stádia prvoka *Dientamoeba fragilis*: cysta, precysta, trofozoit (adaptováno dle publikace Stark *et al.*, 2014).



**Obr. 2:** Stádia prvka *Dientamoeba fragilis*: (A-C) trofozoit, (D-F) precysta, (G-I) cysta, (adaptováno dle publikace Stark *et al.*, 2014).

### 3.2.1. Stádium trofozoita

Rozměry trofozoita *D. fragilis* se pohybují mezi 4 až 20  $\mu\text{m}$ , nejčastěji však v rozmezí 5 až 15  $\mu\text{m}$  (Dobell, 1940; Jepps a Dobell, 1918). Údaje získané měřením pomocí světelné mikroskopie byly také potvrzeny modernějšími zobrazovacími technikami, jako je například skenovací elektronová mikroskopie (SEM) nebo transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Ty potvrdily nejen průměrnou velikost trofozoita 4 až 10  $\mu\text{m}$ , ale odhalily i specifické povrchové struktury (Obr. 3). Na základě struktury buněčného povrchu byly klasifikovány hladké buňky (tzv. „smooth cells“) a tzv. zvlněné buňky („ruffled cells“), přičemž častěji se vyskytuje typ zvlněných buněk (Banik *et al.*, 2012). Statisticky významný rozdíl ve velikosti mezi těmito morfologickými formami nebyl zaznamenán.



**Obr. 3:** Fotografie ze skenovací elektronové mikroskopie zobrazující dva typy prvoka *D. fragilis* na základě různého buněčného povrchu: (A) hladká buňka, (B) zvlněná buňka (adaptováno dle publikace Banik *et al.*, 2012).

Typicky má trofozoit *D. fragilis* kulovitý nebo oválný tvar s granulovanou vakuovou cytoplazmou (Banik *et al.*, 2012). Trofozoité jsou ve většině případů dvoujaderné buňky, ale vyskytují se občas i v jednojaderné formě, v poměru 4:1. Tato čísla ovšem mohou kolísat v závislosti na stupni vývoje buňky v okamžiku sledování a dynamice populace (Tab. 1). V případě rychlého nárůstu populace se zvyšuje podíl mladých (jednojaderných) stádií (Dobell, 1940; Stark *et al.*, 2016).

**Tab. 1.:** Procentuální zastoupení jednojaderných (1N) a dvoujaderných (2N) forem prvoka *Dientamoeba fragilis* v mladé a starší kultuře (adaptováno dle publikace Dobell, 1940).

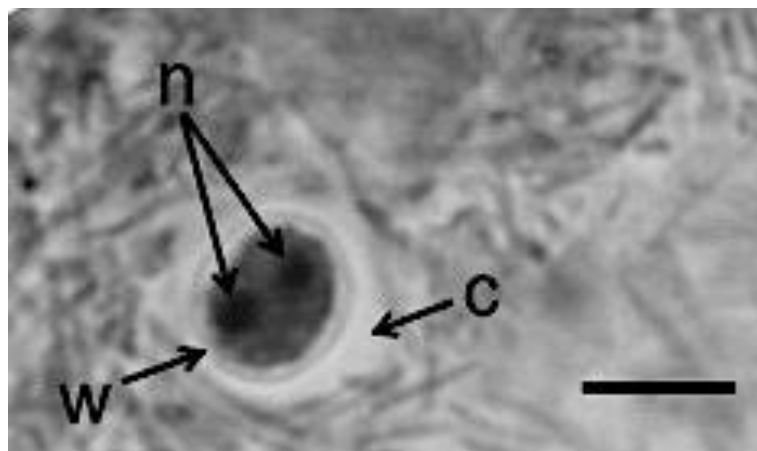
stáří kultury	celkový počet jedinců	množství 1N (%)	množství 2N (%)
40 hodin	500	52,2	47,8
7 dní	600	11,5	88,5

### 3.2.2. Stádium cysty

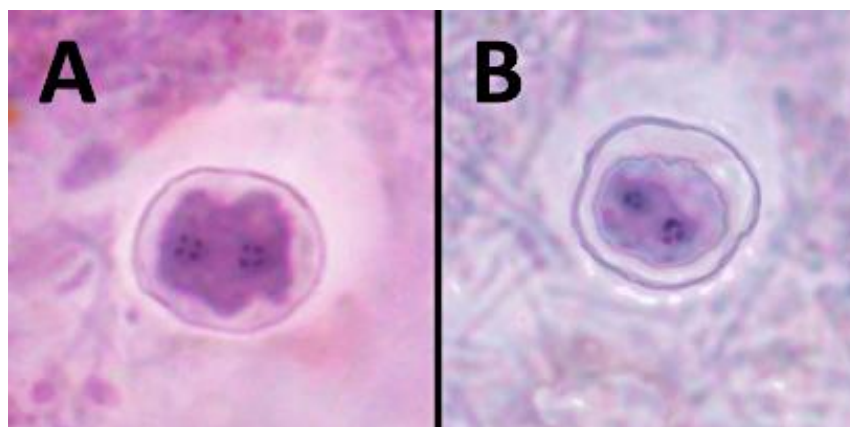
O možnosti existence cyst v životním cyklu dientaméby se spekulovalo již na počátku minulého století (Jepps a Dobell, 1918). Roku 1923 americký zoolog Charles Kofoid popsal stádium cysty (Kofoid, 1923), ale Dobell po dlouholetém sledování toho organismu stádium cysty zamítl (Dobell, 1940).

Jejich existence byla nakonec potvrzena se zavedením experimentálního modelu pro studium infekce a přenosu *D. fragilis* (Munasinghe *et al.*, 2013). Po orální inokulaci myši trofozoity *D. fragilis* z *in vitro* kultury byla v trusu infikovaných zvířat nalezena stádia cyst (Obr. 4).

Další studie poukázala na přítomnost cyst i v lidských vzorcích (Stark *et al.*, 2014). V rámci pátrání po stádiích cyst *D. fragilis* byl vyšetřen značný počet trvale barvených roztěrů od pacientů s využitím světelné mikroskopie. Celkem bylo nalezeno pouhých pět cyst u čtyř ze 47 pacientů (Stark *et al.*, 2014). Takto nízký výskyt stádia cysty je pravděpodobně důvodem, proč Dobell neuspěl při jejím hledání (Dobell, 1940). Morfologicky se cysty ve vzorcích lidí či zvířat neliší (Obr. 5).



**Obr. 4:** Dvoujaderná cysta prvoka *Dientamoeba fragilis* detekovaná v trusu infikovaných myši. Měřítka označuje velikost 5  $\mu\text{m}$ , n - jádra, w – buněčná stěna, c – „zone of clearance“ (adaptováno dle publikace Munasinghe *et al.*, 2013).



**Obr. 5:** Cysty *Dientamoeba fragilis* detekované (A) ve vzorcích trusu experimentálně kolonizovaných myši a (B) v lidském vzorku (adaptováno dle publikace Stark *et al.*, 2014).

### 3.2.3. Stádium precysty

Stádium precysty se vyznačuje kompaktním kulovým tvarem a velikostí 3,5 až 5  $\mu\text{m}$  v průměru (Jepps a Dobell, 1918; Kofoid, 1923). Vyskytuje se jednojaderná i dvoujaderná forma s jemně zrnitou cytoplazmou (Wenrich, 1936). Cytoplazma je homogenní a za použití barviva železitý hetamoxylin se zbarvuje sytěji, než cytoplazma zbylých dvou stádií. To naznačuje její hustší strukturu (Stark *et al.*, 2014).

## 3.3. Životní cyklus

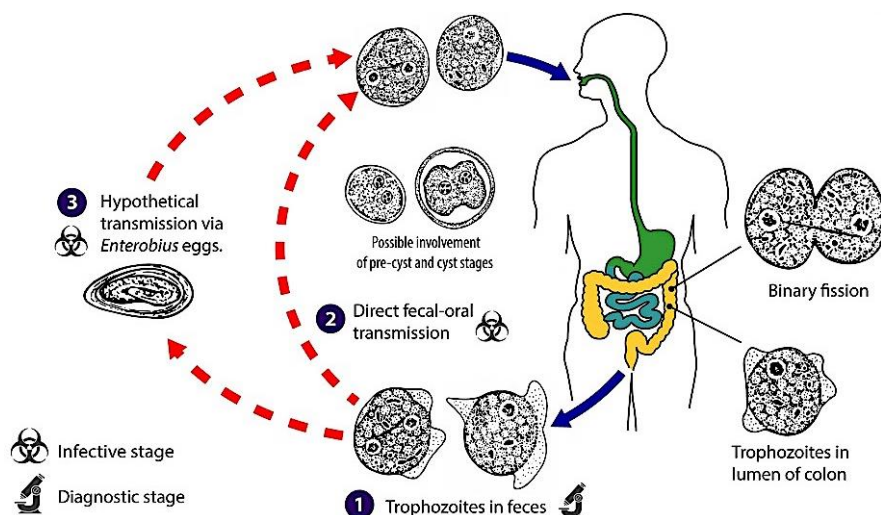
Na rozdíl od většiny ostatních střevních prvoků je o životním cyklu, přenosu a epidemiologii *D. fragilis* známo jen velmi málo. Obecně je možné říci, že prvoci osídlující střevo hostitele se přenáší fekálně-orální cestou a obvykle mají stádia cyst, která umožňují jejich přežití ve vnějším prostředí.

Životní cyklus *D. fragilis* a její přenos mezi hostiteli byl donedávna pro vědce záhadou. Důvodem byla znalost pouze jednoho jejího životního stádia – trofozoita, který je velmi nestabilní ve vnějším prostředí a v exkrementu hostitele se za přítomnosti kyslíku rozpadá do 48 hodin (Clark *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2004; Stark *et al.*, 2010b). Jak bylo ale uvedeno výše, jsou u *D. fragilis* dnes popsána už tři životní stádia, která kompletují životní cyklus mimo hostitelský organismus.

Ještě nedávná znalost jen jediného stádia – trofozoitů – v životním cyklu dientaméby logicky vyvolávala otázku, jak je přenášena (Obr. 6). Před objevením stádia cysty se uvažovalo o možnosti přenosu *D. fragilis* pomocí vajíček hlístic, zejména roupa dětského (*Enterobius vermicularis*), případně i tenkohlavce lidského (*Trichuris trichiura*) a škrkavky dětské (*Ascaris lumbricoides*) (sumarizováno v Barrat *et al.*, 2011). Tento způsob přenosu byl před tím prokázán u příbuzné trichomonády, *Histomonas meleagridis*, patogenním prvokem ze střeva drůbeže, zejména krůt (Gerbod *et al.*, 2001; Volf a Horák, 2007).

Způsob přenosu *D. fragilis* mezi hostiteli prostřednictvím vajíček hlístic byl zvažován na základě pozorování častých ko-infekcí dientaméby a *E. vermicularis* u dětí (Girginkardesler *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2004; Sukanahaketu 1977; Yang a Scholten, 1997b). Navíc trofozoité *D. fragilis* byly detekovány i uvnitř vajíček hlístic (Burrows, 1967; Röser *et al.*, 2013a; Sukanahaketu 1977). Tuto hypotézu podpořil Ockert (1990) ve své studii, kdy byli dobrovolníci infikováni *D. fragilis* požitím vajíček *E. vermicularis* odebraných od pacienta s ko-infekcí obou střevních parazitů.

S objevem stádia cysty se nabízí další možnosti přenosu *D. fragilis*, a to kontaminovanou vodou nebo potravou (tzv. „water- / food-borne disease“). Cysta vyloučená v exkrementech z těla hostitele přímo kontaminuje vodu, případně potravu, kterou potenciální hostitel pozře (Baquer *et al.*, 2018).



**Obr. 6:** Možný životní cyklus prvoka *Dientamoeba fragilis*

(<https://www.cdc.gov/dpdx/dientamoeba/index.html>).

### 3.4. Hostitelská specifita

#### 3.4.1. Identifikace hostitelů na základě nálezu přirozených infekcí

*Dientamoeba fragilis* je kosmopolitně rozšířený prvok (Barrat *et al.*, 2011; Stark *et al.*, 2016). Kromě člověka bylo dosud identifikováno jen málo zvířecích hostitelů. K dalším možným hostitelům zatím patří primáti, například gorily chované v zajetí (Cacciò *et al.*, 2012; Lankester *et al.*, 2010; Stark *et al.*, 2008). U volně žijících primátů byla *D. fragilis* objevena u dvou jedinců z celkem 44 sledovaných makaků (Hegner a Chu, 1930) a dále u dvou jedinců z celkem 106 paviánů anubi (Myers a Kuntz, 1968). Dále byla dientaméba detekována i u prasat, a to ve vysoké prevalenci (43,8 %) (Crotti *et al.*, 2007). Naopak, v rámci široké studie provedené v Austrálii, byla *D. fragilis* nalazena pouze u kočky a psa, a to pouze vždy v jednom vzorku. Celkově tedy byly pozitivní pouze dva vzorky z celkových 420 testovaných vzorků trusu od 37 druhů zvířat (Chan *et al.*, 2016).

#### 3.4.2. Identifikace hostitelů na základě experimentálních studií

V rámci zjišťování hostitelské specifity *D. fragilis*, a také hledání vhodného experimentálního modelu v laboratorních podmínkách, byly provedeny infekční pokusy na několika druzích zvířat (Stark *et al.*, 2016). O první pokusy ustanovení experimentálního modelu se pokusil Dobell již v roce 1940 s makaky (*Macacus sinicus*, *Macacus rhesus*) a kuřaty (Dobell, 1940). Při následné analýze vzorků trusu na přítomnost *D. fragilis* byla všechna zvířata negativní. Roku 1945 se Knoll a Howell pokusili o perorální a perrektální inokulaci *D. fragilis* u koťat (Knoll a Howell, 1945). Ani tento experiment nebyl úspěšný, protože nebyla prokázána žádná infekce dientamébou a neobjevily se ani žádné symptomy. Vhodným zvířecím experimentálním modelem pro studium *D. fragilis* se ukázaly být myši (El-Gayar *et al.*, 2016; Munasinghe *et al.*, 2013). Studie byly zaměřeny na studium patogenního potenciálu *D. fragilis*. Autoři studie El-Gayar *et al.* (2016) infikovali skupiny myši třemi různě vysokými dávkami trofozoitů *D. fragilis* z kultury. Úspěšně se podařilo nainfikovat dvě skupiny, přičemž se jednalo o nejvyšší dávky v rámci experimentu, a to  $10^5$  a  $4 \times 10^6$  trofozoitů / 0,5 ml kultury.



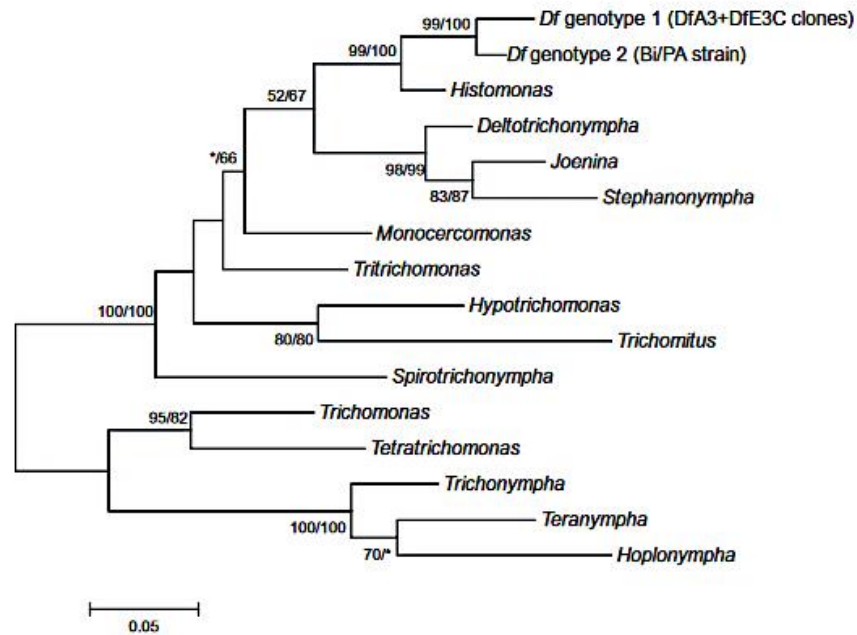
### 3.5. Genetická diverzita

Většina střevních prvoků vykazuje vnitrodruhovou genetickou variabilitu, která je popisována formou genotypů, subtypů, linií či asambláží na základě molekulárně-fylogenetických analýz (např. *Entamoeba* spp., *Blastocystis* spp., *Giardia intestinalis*) (Einarsson *et al.*, 2016; Paulos *et al.*, 2018; Stensvold *et al.*, 2011). Všeobecně se dá konstatovat, že zkoumání této variability je důležité, protože jednotlivé genotypy se mohou lišit svým působením na hostitelský organismus, jako je tomu například u různých asambláží *G. intestinalis* (Ryan a Cacciò, 2013). Navíc znalost vnitrodruhové variability do určité míry umožňuje zhodnocení míry případného zoonotického potenciálu.

V porovnání s dalšími prvoky (např. *Blastocystis* spp. či *G. intestinalis*), u *D. fragilis* byla prozatím odhalena nízká vnitrodruhová variabilita (Ryan a Cacciò, 2013). Analýza genů na základě polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) odhalila dva genotypy, přičemž stupeň divergence malé ribozomální podjednotky mezi těmito variantami činí 2 % (Stensvold *et al.*, 2013). Jedná se o genotyp 1 a genotyp 2 (také známý jako kmen Bi / PA), přičemž genotyp 1 je zatím nejběžnějším podtypem diagnostikovaným u lidí (Greigert *et al.*, 2018; Stark *et al.*, 2016; Stensvold *et al.*, 2013). I další rozsáhlé studie potvrdily existenci dvou genotypů a také velice malé rozdíly mezi jejich geny (Johnson a Clark, 2000; Peek *et al.*, 2004; Windsor *et al.*, 2004).

V nedávné molekulárně-fylogenetické studii Stensvold *et al.* (2013) byly analyzovány tři geny pro každý genotyp *D. fragilis*, a to malá ribozomální podjednotka (SSU rRNA), aktin a elongační faktor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Výsledky ukázaly variabilitu v rámci všech genů do 3 %. Autoři studie Hussein *et al.* (2009) zkoumali genetickou variabilitu *D. fragilis* v několika izolátech pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání (High Resolution Melting, HRM) po polymerázové řetězové reakci (PCR). Do této studie bylo zahrnuto 30 vzorků od pacientů pozitivních na *D. fragilis*. Tito pacienti trpěli syndromem dráždivého tračníku (IBS – Irritable Bowel Syndrome), který byl doprovázen akutním či chronickým průjmem. Konečné výsledky odhalily čtyři varianty *D. fragilis*, přičemž varianta 1 byla nalezena u 50 % testovaných pacientů, varianta 2 byla přítomna u 20 %, varianta 3 u 16,7 % a varianta 4 u 13,3 %. Mezi vzorky nebyly detekovány žádné smíšené varianty. Korelace mezi jednotlivými variantami a typy průjmů prokázala, že většina pacientů s variantou 1 nebo 4 měla chronický průjem. Všichni pacienti s variantou 2 trpěli akutním průjmem, zatímco u pacientů s variantou 3 se vyskytoval průjem střídavě se zácpou. Dále autoři studie Windsor *et al.* (2006) studovali ITS

oblast v obou genotypech *D. fragilis*. Na rozdíl od většiny organismů identifikovali u dientaméby rozsáhlé rozdíly mezi sekvencemi v rámci stejného genotypu. ITS se vyskytuje ve dvou hlavních formách v každém genotypu, ale v každé formě je také přítomna další heterogenita.



**Obr. 7:** Fylogenetická analýza *D. fragilis* na základě sekvencí aktinu a EF-1 $\alpha$  představujících kmen Bi / PA a klonové sekvence DfA3 / DfE3C spolu s referenčními sekvencemi z databáze GenBank. *Df* = *D. fragilis* (adaptováno dle publikace Stensvold *et al.*, 2013).

## 4. Diagnostika prvoka *Dientamoeba fragilis*

Diagnostika dientaméby je velmi složitá vzhledem k fragilní povaze jejího trofozoita (ve vnějším prostředí přežijí v řádech hodin) a velmi malé velikosti cyst (3 až 5  $\mu\text{m}$ ). Úspěšnost diagnostiky *D. fragilis* závisí na mnoha faktorech, jako například čerstvost vzorku nebo podmínky skladování, či fixace před jeho zpracováním. K nejčastěji používaným metodám pro detekci trofozoitů patří barvení roztěrů stolice, kultivace a molekulární diagnostika. Tyto metody budou podrobně rozebrány v následujících kapitolách. Využití koncentračních metod, které se běžně používají k diagnostice dalších střevních prvoků (například flotace či sedimentace), by bylo u *D. fragilis* velmi obtížné, spíše nemožné.

### 4.1. Nativní preparát

V případě rychlé detekce trofozoitů *D. fragilis* (i jiných parazitů) se často používá nativní preparát. Jedná se o kousek exkrementu rozmíchaný ve fyziologické roztoku či vodě, dobarvovaný Lugolovým roztokem s následnou diagnostikou s využitím světelné mikroskopie (El-Gayar *et al.*, 2016; Hamidi *et al.*, 2018; Pietilä *et al.*, 2019). Použitím Lugolova roztoku se obarví stěny či případně vnitřní struktury detekovaných organismů. Tím dojde k jejich zviditelnění ve světelné mikroskopii a snadnější diagnostice. Lugolův roztok se připraví rozpuštěním jodu draselného ve vodě (Burrows, 1965). Značnou nevýhodou diagnostiky s použitím nativního preparátu je však nízká citlivost.

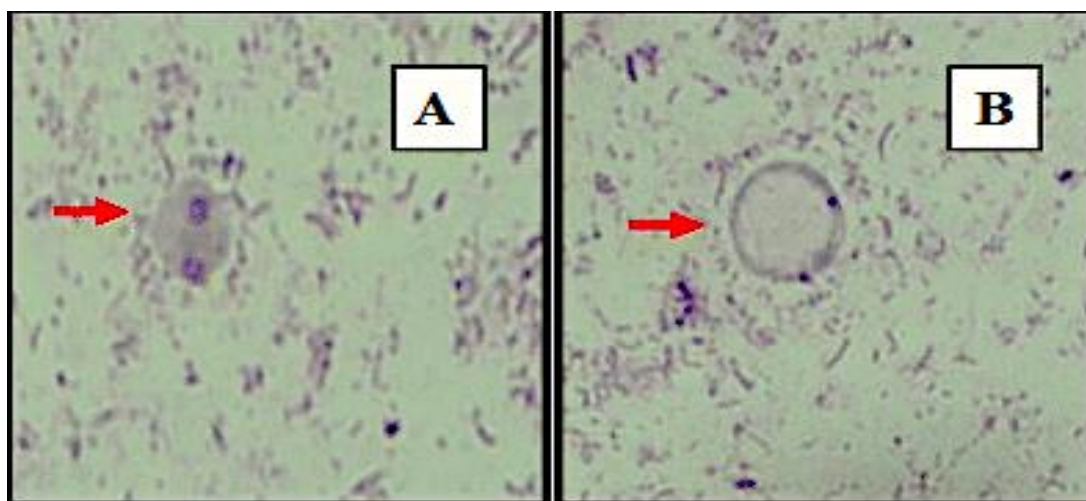
### 4.2. Metody barvení roztěrů

V koprologické diagnostice kombinované se světelnou mikroskopií se používá celá řada barvení roztěrů exkrementů. V případě *D. fragilis* použili autoři nedávné studie modifikované Fieldovo barvení (MF) za účelem jejího odlišení od stádií *Blastocystis* ve vzorcích pacientů (Ragavan a Govind, 2015). Toto barvení se skládá ze dvou činidel (A, B). Část A je vytvořena z ethylenové modři, bezvodého hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu draselného. Část B se skládá z 2% roztoku eosinu rozpuštěného v metanolu (Afzan *et al.*, 2010). Na základě tohoto barvení je snadnější odlišit životní stádia *D. fragilis* a *Blastocystis*, protože obojí dosahují velikosti řádově několika mikrometrů a je obtížné odlišit vnitřní struktury (Obr. 8). Modifikované Fieldovo barvení se používá zejména k rychlé diagnostice

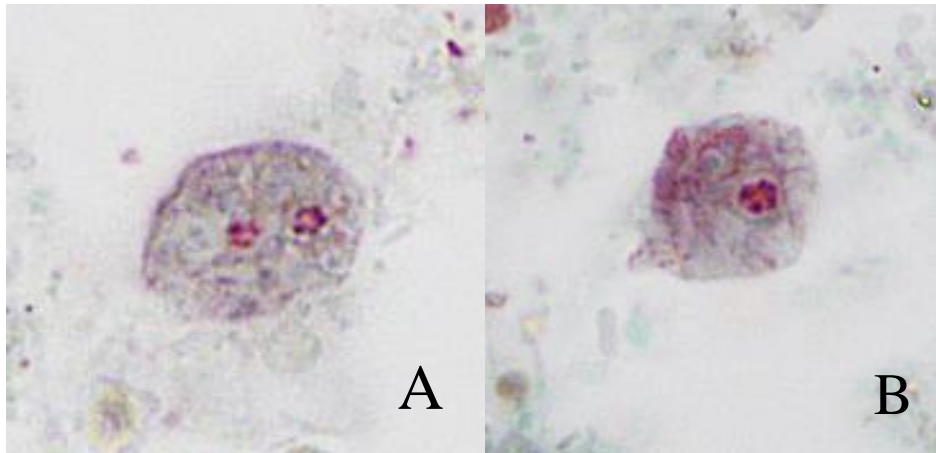
malárie z krve, nicméně autoři ho považují za vhodné i k barvení permanentních roztěrů stolice za účelem diagnostiky například střevních améb (Moody a Fleck, 1985).

Pro barvení trvalých roztěrů se nejčastěji využívá metoda Gomoriho trichromu (Obr. 9) a Weigertův železitý hematoxylin. Gomoriho trichrom je široce používán pro rychlou diagnostiku améb a bičíkovic (Burrows, 1965). Připraví se smícháním směsi chromotropu 2R, „light green SF“, „fast green FCF“ a kyseliny fosfowolframové s kyselinou octovou. Barvení metodou železitý hematoxylin využívá hematoxylin jakožto barvení jader buněk (Burrows, 1965; Stark *et al.*, 2016; Windsor a Johnson 1999).

Nejlépeších diagnostických výsledků lze dosáhnout použitím trvalého barvení v kombinaci s vhodnou fixací vzorku. Jak již bylo zmíněno, trofozité *D. fragilis* jsou fragilní a na vzduchu se velmi rychle rozpadají. Potom je jejich rozpoznání velice obtížné. Proto by pro optimální výsledky měly být vzorky exkrementů co možná nejdříve zafixovány (Stark *et al.*, 2016). Vhodná fixační činidla pro střevní prvky, včetně *D. fragilis*, jsou například polyvinylalkohol (Goldman a Brooke, 1953), modifikovaný Schaudinnův fixační prostředek (Scholten, 1972), látky na bázi formalínu, jako například fenol-alkohol-formalin (Burrows, 1967), octan sodný-kyselina octová-formalín (Yang a Scholten, 1977a) nebo formalin ethylacetát (Pietilä *et al.*, 2019).



**Obr. 8:** *Dientamoeba fragilis* (A) a *Blastocystis* spp. (B) obarvené Fieldovým barvením. (adaptováno dle publikace Ragavan a Govind, 2015).



**Obr. 9:** Dvoujaderná (A) a jednojaderná (B) forma trofozoita prvoka *Dientamoeba fragilis*. Barvení pomocí Gomoriho trichromu (adaptováno dle publikace Stark *et al.*, 2014).

### 4.3. Kultivace

Před zavedením citlivých molekulárních metod byla pro svou spolehlivost často pro diagnostiku *D. fragilis* využívána kultivace (Diamond, 1982; Dobell, 1940; Sawangjaroen *et al.*, 1993). Tato metoda se používá i dnes (Kurt *et al.*, 2019). Nevýhoda tohoto diagnostického přístupu spočívá v jeho časové náročnosti. Nejčastěji se používají dvoufázová média.

K detekci *D. fragilis* byla použita celá řada kultivačních systémů, jako například Boeck – Drbohlavovo médium (BD) (Sawangjaroen *et al.*, 1993, Stark *et al.*, 2010b), Robinsonovo médium (Kurt *et al.*, 2019; Windsor *et al.*, 2003), Dobell – Laidlawovo médium (Greigert *et al.*, 2018; Kurt *et al.*, 2019; Sawangjaroen *et al.*, 1993), TYGM-9 (Diamond, 1982; Stark *et al.*, 2010b), Loefflerovo médium (Banik *et al.*, 2012). V minulosti bylo porovnáváno několik různých kultivačních médií ve snaze najít optimální podmínky pro růst trofozoitů *D. fragilis* (např. upravené médium BD, TYGM-9, Loefflerovo médium, Robinsonovo médium) a podmínky pro růst trofozoitů *D. fragilis*. Účinnost jednotlivých médií byla hodnocena na základě několika faktorů, jako je množství narostlých buněk, či kultivační teplota. Loefflerovo médium podporovalo výrazně lépe růst buněk ve srovnání s jinými médii (Barratt *et al.*, 2010). *Dientaméba* se běžně kultivuje při teplotě 37 °C (Windsor *et al.*, 2003), ale zdařila se i při teplotách 41 °C a 42 °C (Barratt *et al.*, 2010; Dobell, 1940). Autoři nedávné studie porovnávali senzitivitu a efektivitu tří nejčastěji používaných dvoufázových kultivačních médií pro detekci *D. fragilis*, a to Robinsonsonovo médium (RM), Dobellovo médium (DM)

a Talisovo médium (TM). Trofozoité *D. fragilis* byly detekovány v 11 ze 101 kultivovaných vzorků, což bylo potvrzeno doplňujícím vyšetřením pomocí trichromem zbarvených nátěrů stolice. Všechny 11 vzorků bylo pozitivních v Robinsonově médiu, zatímco Dobbellovo médium poskytlo pouze tři pozitivní výsledky a Talisovo médium čtyři. Vzorky z posledních dvou zmíněných kultivačních médií byly navzájem odlišné, avšak v souladu s výsledky z Robinsonova média (Kurt *et al.*, 2019). Jako jedno z prvních dvoufázových kultivačních médií bylo použito Dobbellovo médium, které bylo vytvořeno stejnojmenným autorem, jelikož všechny předchozí pokusy s běžnými médii vedly k přerůstání *Blastocystis* (Dobell, 1940).

#### 4.4. Molekulární diagnostika

Metody molekulární biologie se jeví jako vysoce citlivé a specifické alternativy k tradičním diagnostickým přístupům, jako je mikroskopie. Molekulární detekce *D. fragilis* je založena na konvenční nebo real-time PCR (RT-PCR) s použitím specifických primerů a sond a je vhodná pro analýzu vzorků od pacientů v diagnostických laboratořích. Molekulární metody založené na principu PCR téměř nahradily mikroskopickou diagnostiku díky vysoké senzitivitě, např. právě RT-PCR (Hamidi *et al.*, 2018; Stark *et al.*, 2016). Výsledkem zavedení molekulární diagnostiky byla častější detekce *D. fragilis* v populaci zdravých lidí (Pietilä *et al.*, 2019; Sarafraz *et al.*, 2013). Dosud ne zcela objasněná role *D. fragilis* ve střevním ekosystému

a zjevné zvýšení jejího výskytu ve zdravé populaci na základě molekulární diagnostiky přispělo k otevření diskuse mezi lékaři a mikrobiology o nutnosti případné léčby (van Gestel *et al.*, 2018).

##### 4.4.1. PCR (polymerázová řetězová reakce)

Konvenční PCR se sestává ze dvou kroků, z nichž prvním je amplifikace DNA v blokovém termocykleru a druhým krokem je elektroforéza pro vizualizaci DNA. Tyto dva kroky se na rozdíl od RT-PCR (viz kap. 4.3.2.) provádějí ve dvou různých přístrojích. Jako ideální úseky pro PCR se zdají být oblasti ribozomální DNA (rDNA) (Stark *et al.*, 2005; Stensvold *et al.*, 2013). Některé studie se zabývají srovnáním senzitivity mezi molekulární detekcí a mikroskopickou diagnostikou. Například ve švédské studii Ögren *et al.* (2015) bylo vyšetřeno 388 pacientů jak mikroskopickými metodami, tak zároveň pomocí PCR. Všechny

mikroskopicky vyšetřené vzorky pozitivní na *D. fragilis* byly pozitivní i za použití PCR. Molekulární diagnostika odhalila celkem o 20 % více jedinců s *D. fragilis*. Autoři další studie Hamidi *et al.* (2018) detekovali *D. fragilis* pomocí roztěru a barvením železitým hematoxylinem pouze v 5 %, kdežto PCR na základě amplifikace genů SSU rRNA odhalila *D. fragilis* u 6 % a 13,5 %.

#### 4.4.2. Real Time-PCR (PCR v reálném čase)

V RT-PCR se oba kroky, amplifikace a vizualizace PCR produktu, provádějí současně v jednom přístroji. Nespornou výhodou této metody je, že umožňuje kvantifikaci hledané DNA (Gough *et al.*, 2019). Ve srovnání s konvenčními PCR a / nebo mikroskopickým vyšetřením má RT-PCR vyšší citlivost a specifitu při detekci různých střevních prvoků obecně, včetně *D. fragilis* (Brands *et al.*, 2019; Menu *et al.*, 2019; Stark *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2016; Stensvold a Nielsen, 2012; Verweij *et al.*, 2007).

### 4.5. Imuno-diagnostika

Pro analýzu přítomnosti různých prvoků (*Cryptosporidium*, *G. intestinalis* a *E. histolytica*) ve vzorcích stolice je dostupná imunofluorescenční mikroskopie za použití komerčně dostupných monoklonálních protilátek, několik enzymů a imunochromatografické testy (McHardy *et al.*, 2014). Bohužel u *D. fragilis* takových metod dosud testováno a rutinně používáno mnoho není (van Gestel *et al.*, 2018).

V případě imunodiagnostiky *D. fragilis* ve vzorcích exkrementů byla testována esej s využitím nepřímé fluorescenční protilátky (Indirect Fluorescent Antibody test – IFA). Pro IFA test bylo použito králičí antisérum. Celkem bylo testováno 155 klinických vzorků od lidí, a to 42 negativních, devět pozitivních na *D. fragilis* a 104 vzorků s ostatními parazity (např. *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *G. intestinalis*, *E. vermicularis*, *Hymenolepis nana*, *Strongyloides stercoralis* a *T. trichiura*). IFA test odhalil přítomnost trofozoitů *D. fragilis* u sedmi vzorků. Dva vzorky s pochybnými hodnotami IFA testu vykazovaly velmi malá množství trofozoitů *D. fragilis* na obarvených nátěrech. Nebyly zjištěny žádné falešně pozitivní hodnoty. IFA test se jevil jako slibná metoda díky jeho rychlosti při diagnostickém screeningu vzorků lidí (Chan *et al.*, 1993). Tento druh diagnostiky

byl použit i později ve studii Chan *et al.* (1996). Zde bylo ze 189 zdravých dětí 172 (91%) pozitivních. Ve všech pozitivních vzorcích séra byl následně molekulárním přístupem identifikován 39 kDa amplikon *D. fragilis*.

Během experimentální studie *D. fragilis* na myších zaměřené na zkoumání její patogenity (více informací v kapitolách 3.4.1. a 6.2.) byly zaznamenány vyšší počty populací eosinofilů, neutrofilů a makrofágů ve střevní sliznici (El-Gayar *et al.*, 2016). Pokud by došlo k podobné imunitní reakci v lidském střevě v důsledku kolonizace *D. fragilis*, mělo by být možné změřit zvýšení kalprotektinu ve stolici pacientů (Brands *et al.*, 2019). Kalprotektin je peptid uvolňovaný neutrofily a také makrofágy a monocytocyty, které se vyskytují ve střevní sliznici během zánětlivé reakce (Munasinghe *et al.*, 2013; Røseth *et al.*, 1992). Skupina myší, které byly inokulovány trofozoity *D. fragilis*, měla průměrnou fekální koncentraci kalprotektinu 69 ng/ml, což je dvakrát vyšší ve srovnání s 33 ng/ml u kontrolních myší (Munasinghe *et al.*, 2013).

V nedávné studii zaměřené na výzkum prevalence dientaméby u dětí (ve věku od 5 do 19 let) byly srovnány výsledky získané z RT-PCR diagnostiky s koncentrací fekálního kalprotektinu (Brands *et al.*, 2019). Koncentrace kalprotektinu byla zjišťována ze vzorků stolice pomocí metody ELISA. Střední koncentrace kalprotektinu u pacientů a zdravých dětí s pozitivním výsledkem RT-PCR se nelišila od výsledků pacientů s negativním PCR. Jednalo se o hodnoty 40 (40–55) µg/g vs. 40 (40–75) µg/g. V pozdější studii (Aykur *et al.*, 2020) zkoumali hladinu kalprotektinu u dvou skupin pacientů a jedné kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků. V první skupině byla potvrzena přítomnost dientaméby a pacienti trpěli střevními potížemi, jako například zvracení, průjem a bolest břicha. Hladina kalprotektinu byla v dané skupině 33,40 ng/mg. V druhé skupině pacienti trpěli obdobnými zažívacími obtížemi, nicméně byli negativní na *D. fragilis*, ale nebyla vyloučena přítomnost jiného střevního prvoka. Zde byla hladina zkoumaného proteinu 15,99 ng/mg. Poslední skupina zahrnovala zdravé dobrovolníky a koncentrace kalprotektinu byla 1,54 ng/mg. Mezi první a třetí skupinou byl na rozdíl od předchozí studie (Brands *et al.*, 2019) nalezen statisticky významný rozdíl.



## 5. Epidemiologie 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). Tento prvok byl diagnostikován jak v zemích třetího světa, tak v moderní společnosti. Většinou se jednalo o diagnostiku u osob stěžujících si na zažívací obtíže, ale v poslední době přibývá i studií, které se zaměřují na zdravé jedince, za účelem objasnění role tohoto prvoka v lidském mikrobiomu.

Míra prevalence může být ovlivněna volbou diagnostické metody a také typem studované kohorty, například pacienti se střevními potížemi versus zdraví jedinci (Cacciò, 2018; Cengiz *et al.*, 2009; Krogsgaard *et al.*, 2015). Dále může být výskyt *D. fragilis* pravděpodobně ovlivněn různými faktory, jako je životní styl či věk apod.

### 5.1. Faktory ovlivňující kolonizaci člověka

#### 5.1.1. Věk a pohlaví

Recentní studie založené na molekulární diagnostice prvoka *D. fragilis* se shodují na jeho vyšší prevalenci u dětí (de Boer *et al.*, 2020; Fletcher *et al.*, 2014; Menéndez *et al.*, 2019), přičemž se jedná až o 70 % (Maas *et al.*, 2014; Röser *et al.*, 2013b). Sérologická studie provedená u zdravých dětí udává prevalenci dientaméby 91 % (Chan *et al.*, 1996).

V kohortě lidí vykazujících příznaky střevní parazitózy, jako například průjem a bolesti břicha, byl zjištěn nejvyšší výskyt *D. fragilis* u jedinců ve věku 16 až 20 let (Stensvold *et al.*, 2007). V této práci byla použita metoda permanentního barvení, konkrétně Gomoriho trichrom. Podobně autoři studie Lagacé-Wiens *et al.* (2006) zjistili, že dientaméba byla nejčastěji pozorována u mladých mužů ve věku 16 až 20 let, a to s prevalencí 11,5 %. Naproti tomu u žen stejného věku, byla prevalence výrazně nižší (1,1 %). V tomto případě se jednalo o zdravé jedince nevykazující onemocnění trávicího traktu. Ve výzkumu v Libanonu, který zjišťoval přítomnost prvoků u lidí pracujících v sektoru s potravinami, bylo 37,5 % pracovníků pozitivní na *D. fragilis* (Naja a Mallat, 2008). Později byla v dané lokalitě obdobná studie provedena u dětí ve věku od 3 do 16 let (Osman *et al.*, 2016). Prevalence dientaméby byla druhá nejvyšší (vyšší byla jen u *Blastocystis* spp.), a to s celkovou prevalencí 60,6 %. Ze všech

dětí pozitivních na *D. fragilis* bylo 47 % asymptomatických. Zbytek měl potíže, jako například zvracení, průjem či bolest břicha.

V epidemiologické studii v Austrálii byly testovány vzorky symptomatických pacientů z několika nemocnic v Sydney, kteří byli v letech 2007 až 2010 pozitivní na přítomnost střevních protist. Nejvyšší prevalence *D. fragilis* (28,1 %) byla pozorována u mladistvých ve věku od 13 do 24 let (Fletcher *et al.*, 2014). Jedna z nejrozsáhlejších studií zaměřená na výskyt střevních prvoků v západní společnosti proběhla v Dánsku v letech 2007 až 2011 (Röser *et al.*, 2013b). Sledovaná kohorta čítala bezmála 10 000 jedinců, od kterých bylo vyšetřeno přes 22 400 vzorků. V případě většího množství vzorků od jednoho pacienta, byl považován za pozitivního, pakliže alespoň jeden vzorek vykazoval přítomnost dientaměby. Aby byl negativní, musely by být všechny vzorky od něj negativní. Prevalence se pohybovala v závislosti na věkové skupině od 12 % do 71 %. Nejvyšší byla pozorována u dětí ve věku sedmi let bez rozdílu pohlaví a druhá nejvyšší u žen ve věku 40 let. K podobnému závěru došla i studie provedená ve Španělsku na kohortě 163 jedinců, která odhalila nejčastější výskyt *D. fragilis* u žen okolo věku 34 let a u dětí do 14 let (Menéndez *et al.*, 2019). Dánská studie zabývající se výskytem prvoků u dětí v dětských pečovatelských centrech zjistila prevalenci 68,3 %. Jednalo se o děti nejčastěji ve věku 2,8 let (Jokelainen *et al.*, 2017). Výsledky svědčí o tom, že *D. fragilis* je běžným komenzálem v této populaci. Obdobný průzkum se uskutečnil mezi dětmi ve věku 5 až 19 let z Nizozemí a Belgie. U dětí, které si stěžovaly na bolest břicha a průjem, činila prevalence 45 % (z 200 zúčastněných) a u zdravých dětí 71 % (z celkového počtu 122) (Brands *et al.*, 2019).

Vzhledem k nižším hygienickým návykům u dětí se zdá být vyšší prevalence *D. fragilis* logická. Nicméně v návaznosti na to, může být zvýšení výskytu tohoto prvoka u dospělých v rodičovském věku také možné, kvůli častému kontaktu s dětmi.

### 5.1.2. Západní civilizace versus rozvojové země

V posledním desetiletí vědecká komunita došla k závěrům, že někteří komenzální prvoci mnohem častěji kolonizují střevo zdravých lidí než jedinců s gastrointestinálními příznaky. Nejvíce studovaným prvokem v těchto kontextech je *Blastocystis* spp., kdežto u *D. fragilis* je zatím informací o jejím výskytu v kohortách zdravých lidí mnohem méně. Zatímco u prvoka *Blastocystis* spp. prevalence v kohortách zdravých lidí v moderní společnosti průměrně dosahuje cca 25 % (de Boer *et al.*, 2020; Lhotská, 2019), v případě *D. fragilis* může být možná

prevalence i o něco vyšší. Jedna ze studií, které se zaměřily jak na pacienty se symptomy gastroenteritidy, tak na zdravé jedince, se konala například v Nizozemí, kde byla *D. fragilis* pozorována u 37,6 % lidí ze zdravé kontrolní skupiny a u 25,8 % u pacientů (de Boer *et al.*, 2020). V Dánsku byla výsledná prevalence napříč zdravými účastníky výzkumu velice podobná, a to 35 % (Krogsgaard *et al.*, 2015). Oproti tomu ve studii na zdravých lidech ve Vietnamu, ve městě s dobrou sanitární úrovní, byla detekována prevalence u zdravých lidí jen 2,3 % (Ögren *et al.*, 2016). Obdobný výsledek byl zaznamenán i ve studii ve Francii, kde byla taktéž celková prevalence 2,3 % (Menu *et al.*, 2019). Testování byli pacienti ve věku od jednoho roku po 97 let během běžné lékařské prohlídky. Ve všech výše zmíněných studiích byla použita molekulární diagnostika.

Autoři studie provedené v Íránu na vzorcích pacientů trpících průjmem, prokázali prevalenci 2,1 % (Sarafraz *et al.*, 2013). I v tomto případě byla použita molekulární diagnostika. Jak již bylo zmíněno, v Libanonu se uskutečnil průzkum přítomnosti prvoků u dospělých a později u dětí školního věku, kde byla dientaméba zastoupena v 37,5 % a 60,6 % případů (Naja a Mallat, 2008; Osman *et al.*, 2016). U 85 % dětí bylo zjištěno, že jsou pozitivní na minimálně jednu střevní parazitární infekci (*Blastocystis* spp., *G. intestinalis* nebo *Cryptosporidium* spp.). Kromě toho byla v této studii nalezena významná souvislost mezi ko-infekcí *Blastocystis* spp. a *D. fragilis*. Tato souvislost byla také pozorována u dětí s gastrointestinálními příznaky v jiné studii v Nizozemsku (Maas *et al.*, 2014) a u asymptomatických lidí ve dvou rurálních komunitách v Brazílii, kde byla prevalence 13,6 % a 18,4 % (David *et al.*, 2015). Zde se jednalo o jedince bez trávicích obtíží, jako je například průjem. Epidemiologická studie, která se zajímala o výskyt střevních parazitů u lidí na Madagaskaru, odhalila prevalenci *D. fragilis* 9,4 % (Greigert *et al.*, 2018). Jednalo se o dospělé ve věku 18 až 47 let převážně v oblastech se špatnou sanitární infrastrukturou.

### 5.1.3. Cestování

Cestování je faktorem, který pravděpodobně významně ovlivňuje diverzitu střevního mikrobiomu jako takového, ale nejspíš také výskyt střevních prvoků. Například v případě střevního prvoka *Blastocystis* spp. bylo zjištěno, že cestovatelsky zaměřením jedinci (jak po Evropě, tak i mimo Evropu) jsou častěji kolonizováni tímto prvokem než lidé, kteří necestují vůbec (Lhotská, 2019). Faktor cestování se zdá být důležitý i v případě *D. fragilis*. Během dánské studie (Jokelainen *et al.*, 2017) zaměřené na možné faktory ovlivňující výskyt

prvoka *D. fragilis* byl nalezen rozdíl v prevalenci u dětí, které v uplynulých dvou měsících cestovaly do zahraničí, a dětmi, které v dané době neopustily Dánsko. Jednalo se o 81,5 % vs. 64,3 %. V rámci Evropy cestovalo 19 dětí (Rakousko, Bulharsko, Německo, Řecko, Norsko, Španělsko, Švédsko a Spojené království), zatímco sedm cestovalo mimo Evropu (Egypt, Izrael, Tanzanie, Thajsko a Spojené arabské emiráty). Nejběžnějším cílem bylo sousední Švédsko, které navštívilo 11 dětí a 10 z nich bylo pozitivních. Nicméně rozdíl mezi dětmi, které cestovaly, a které ne, nebyl statisticky významný ( $P = 0,09$ ).

## 6. Role *D. fragilis* ve zdraví a nemoci

Přestože se *D. fragilis* vyskytuje u pacientů s různým onemocněním trávicího traktu, je také často detekována u zdravých jedinců bez jakýchkoliv symptomů. V důsledku toho je patogenní potenciál *D. fragilis* předmětem dlouhodobé diskuze ve vědecké a lékařské komunitě. Ta vede k otázce, zda by se měly provádět rutinní diagnostické testy a jak k nálezu přistupovat.

### 6.1. Klinická manifestace u lidí

Klinická manifestace dientamébové kolonizace se u některých pacientů projevuje bolestí břicha, nadýmáním a průjmem, přičemž tyto příznaky někdy trvají tři až sedm dní (Stark *et al.*, 2010a). Dříve se uvádělo, že po této akutní fázi mohou pacienti přejít do chronického stavu, který trvá jeden měsíc až dva roky, případně může vyústit v syndrom dráždivého tračníku (IBS – Irritable Bowel Syndrome) (Stark *et al.*, 2007). Chronický průběh byl pozorován u 2 % až 32 % pacientů (Banik *et al.*, 2011; Stark *et al.*, 2005). Klinický průběh je častěji popisován u dětí, než u dospělých (např. Holtman *et al.*, 2016; Jokelainen *et al.*, 2017; Stark *et al.*, 2010a). Studie provedená ve Španělsku na kohortě 163 jedinců odhalila nejčastější výskyt *D. fragilis* u žen okolo věku 34 let a u dětí do 14 let (Menéndez *et al.*, 2019), přičemž většina zúčastněných si stěžovala na problémy s trávicím traktem. Jednalo se například o bolest břicha, chronický průjem nebo zvracení. Naproti tomu studie, zabývající se výskytem prvoků u dětí provedená v Dánsku v dětských denních pečovatelských centrech, nezjistila statistickou souvislost mezi nedávnou anamnézou gastrointestinálních příznaků a pozitivním testováním na *D. fragilis* (Jokelainen *et al.*, 2017). Stejně tak v nizozemské studii nebyl u dětí pozorován prevalenční rozdíl mezi dětmi s průjmem a bolestí břicha, oproti zdravým dětem (Holtman *et al.*, 2016). Dále i ve švédském výzkumu byla zaznamenána prevalence *D. fragilis* vyšší u dětí s gastrointestinálními příznaky oproti asymptomatickým dětem (Ögren *et al.*, 2015). Při zkoumání klinických příznaků pacientů účastnících se studie v Turecku byl průjem častější u pacientů kolonizovaných *D. fragilis*. V tomto případě nebyl považován za komenzála, ale patogenního parazita (Aykur *et al.*, 2019). Během finské studie zaměřující se výhradně na pacienty, u kterých byla potvrzena přítomnost *D. fragilis*, se v 85 % případů (270 z 319) vyskytovaly obtíže, jako například bolest břicha (Pietillä *et al.*, 2019).

## 6.2. Klinická manifestace u zvířat

Klinická manifestace infekce *D. fragilis* byla často popisována u goril. Jedním z případů byla infekce *D. fragilis* u gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*) chované v zajetí (Lankester *et al.*, 2010). Gorila trpěla průjmami, ztrátou chuti k jídlu a později i váhy a celkově působila velmi apaticky. Následné podání metronidazolu vedlo k eliminaci tohoto prvoka z trusu a následnému vymizení klinických příznaků.

Klinická manifestace *D. fragilis* může záviset na intenzitě infekce. Během studie patogenického potenciálu *D. fragilis* u zvířat (viz kap. 3.4.1.) byly myši infikovány různými dávkami kultury *D. fragilis*, a to  $10^5$  a  $4 \times 10^6$  trofozoitů *D. fragilis*/0.5 ml kultury (El-Gayar *et al.*, 2016). Během následné pitvy byl zkoumán vliv tohoto prvoka na stěnu střev. Histopatologické vyšetření tlustého a slepého střeva vysoce infikované skupiny ukázalo aktivní kolitidu s infiltrací smíšených zánětlivých buněk, jako jsou eosinofily, neutrofilové a lymfocyty do střevní stěny.

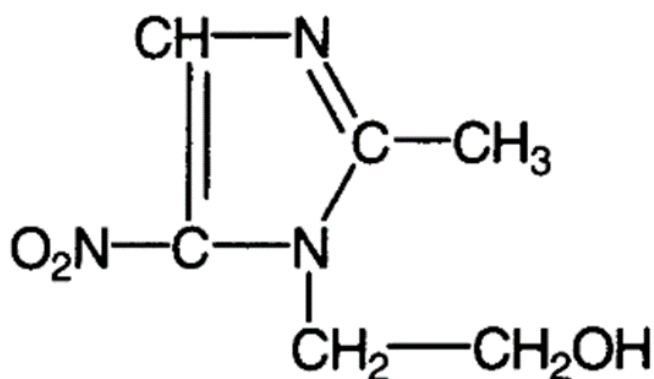
## 6.3. Terapie

Dříve byl prvek *D. fragilis* považován za patogena a některé studie jej tak klasifikují i nadále, a proto doporučují terapii (např. Stark *et al.*, 2016). V některých případech klinické manifestace infekce *D. fragilis* vedla terapie tohoto prvoka ke zlepšení zdravotního stavu pacientů (Stark *et al.*, 2010a). V současnosti existuje několik přípravků určených k odstranění *D. fragilis* z těla hostitele.

### 6.3.1. Metronidazol

Metronidazol patří do třídy nitroimidazolů a je jedním z nejčastěji předepisovaných antiparazitik pro léčbu infekcí *D. fragilis* (Engsbro *et al.*, 2012; van Gestel *et al.*, 2018). Inhibuje syntézu nukleových kyselin narušením DNA mikrobiálních buněk (Freeman *et al.*, 1997). K této funkci dochází pouze tehdy, je-li metronidazol částečně redukován, a protože k této redukci obvykle dochází pouze u anaerobních bakterií a prvoků, má relativně malý účinek na lidské buňky nebo aerobní bakterie (Schaechter *et al.*, 2006). Používá se nejen pro léčbu dientaméby, ale také proti *T. vaginalis*, *G. lamblia* nebo *E. histolytica* (Freeman *et al.*, 1997). Výhoda použití tohoto přípravku spočívá v tom, že je zapotřebí malého množství

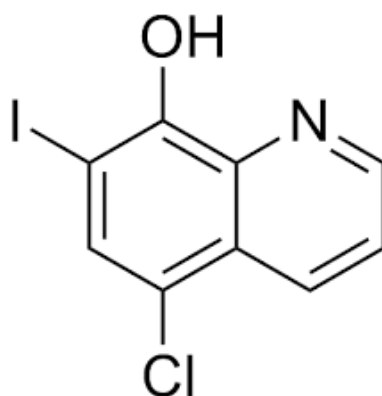
(Nagata *et al.*, 2012). Autoři studie Preiss *et al.* (1990) byli první, kdo podal zprávu o používání metronidazolu ve větší skupině (123) dětských pacientů infikovaných *D. fragilis*. Účinnost léčby dosahovala až 70 % za použití jedné dávky, nicméně u 30 % pacientů vyžadovalo až tři další dávky k odstranění střevních potíží. Metronidazol se také používá u zvířat, například u goril (Lankester *et al.*, 2010) a je dostupný po celém světě pod názvem Metronidazol nebo také Flagyl (Stark *et al.*, 2016). Nicméně během studie nevedla metronidazolová terapie ke klinickému zlepšení u dánských dětí ve věku 3 až 12 let, které trpěly chronickými gastrointestinálními příznaky (Röser *et al.*, 2014). Jsou popisovány vedlejší účinky, jako je nevolnost, sucho v ústech a kovová chuť (Kurt *et al.*, 2008).



**Obr. 10:** Chemická struktura metronidazolu (adaptováno dle Freeman *et al.*, 1997).

### 6.3.2. Clioquinol

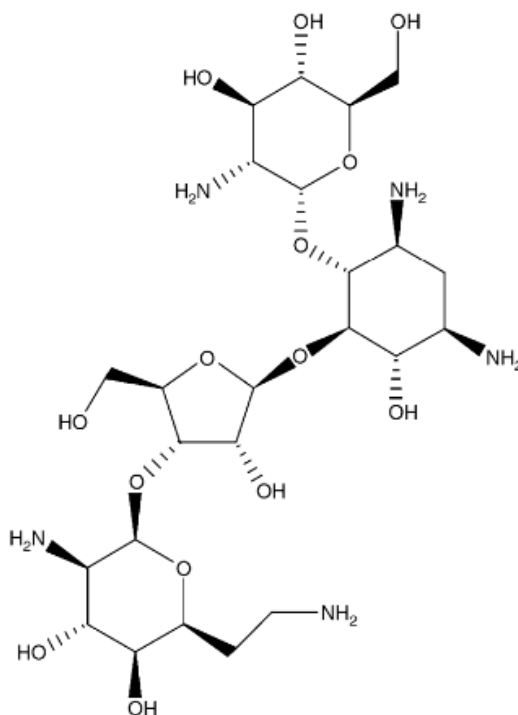
Clioquinol je antimykotikum a antiparazitikum. Patří do rodiny léčiv nazývaných hydroxychinoliny, které inhibují určité enzymy související s replikací DNA. Bylo zjištěno, že tyto léky působí proti virovým infekcím i infekcím způsobených prvoky (Rohde *et al.*, 1976). Jedná se o antiparazitární lék používaný k léčbě nejen *D. fragilis*, ale také například *E. histolytica* (van Gestel *et al.*, 2018). Retrospektivní analýza z Nizozemska v roce 2013 studovala děti infikované *D. fragilis*, kde bylo 151 pacientů léčeno pomocí clioquinolu (15 mg/kg/den ve třech denních dávkách, po dobu 5–10 dnů) a 39 pomocí metronidazolu (30 mg/kg/den ve třech denních dávkách, po dobu 3-10 dnů). Clioquinol měl významně lepší klinický účinek ve srovnání s metronidazolem (Schure *et al.*, 2013). Je dostupný pod svým názvem nebo jako Synalar-C.



**Obr. 11:** Chemická struktura clioquinolu (<https://focusbio.com.au/products/clioquinol/>).

### 6.3.3. Paromomycin

Paromomycin je antimikrobiální látka, patřící do skupiny aminoglykosidů, která se používá k léčbě řady parazitárních infekcí, jako například amebiázy, giardiázy nebo leishmaniózy (Davidson *et al.*, 2009). Způsobuje mikrobiální smrt zastavením tvorby bakteriálních proteinů. Tento aminoglykosid byl poprvé uveden jako látka pro léčbu dientamoebiázy v roce 1967, kdy všechny případy reagovali na léčbu (Simon *et al.*, 1967). V holandské studii byly děti léčeny paromomycinem, který měl i v tomto případě výborné výsledky (Vandenberg *et al.*, 2006, 2007). Mimo svého názvu je dostupný také pod názvy Catenulin nebo Aminosidine.



**Obr. 12:** Chemická struktura paromomycinu (adaptováno dle Davidson *et al.*, 2009).



#### 6.4. Role prvoka *Dientamoeba fragilis* v mikrobiomu

Rozvoj molekulárních a sekvenačních technologií umožnil nahlédnout do diverzity střevního mikrobiomu, včetně střevních prvoků. V souvislosti s těmito studii se začala poodkrývat i fakta o výskytu *Blastocystis* spp. a *D. fragilis* v moderní společnosti. Tito prvoci jsou ve zdravé populaci lidí v moderní společnosti mnohem běžnější, než se původně očekávalo (např. Johnson a Clark, 2000; Krogsgaard *et al.*, 2015; Lhotská, 2019; Stensvold a van der Giezen, 2018). Například v případě nejvíce studovaného prvoka v těchto souvislostech *Blastocystis* spp. bylo také zjištěno, že jeho kolonizace koreluje s vyšší diverzitou mikrobiomu a nižším „Body Mass“ indexem (BMI) (Andersen *et al.*, 2015). Data z této studie podporují hypotézu, že výskyt *Blastocystis* spp. samotný nebo ko-infekce s *D. fragilis* koreluje s optimální diverzitou střevních bakteriálních populací. V těchto souvislostech byl zaznamenán nižší poměr bakterií skupiny *Bacteroidetes* a vyššími poměry bakterií rodu *Prevotella*. Epidemiologické studie zaměřené na diverzitu lidského střevního mikrobiomu také ukázaly, že diverzita střevních organismů u pacientů s chronickými střevními nemocemi (např. Crohnova choroba či ulcerózní kolitida = Inflammatory Bowel Disease / IBD) se liší od zdravých jedinců (de Boer *et al.*, 2020; Ni *et al.*, 2017).

Je známo, že koncentrace kyslíku v ekosystému nemocí narušeného střeva roste (Stensvold a van der Giezen, 2018), nicméně molekulární mechanismus byl objasněn teprve nedávno (Byndloss *et al.*, 2017). Ve zdravém střevě produkují anaerobní bakterie butyrát (Vital *et al.*, 2014). Ten je používán epitelálními buňkami tlustého střeva v oxidační reakci. Použití například antibiotik potlačuje oxidační metabolismus vlivem snížení množství bakterií a zvyšuje množství kyslíku v lidském střevě (Donohoe *et al.*, 2012). To by mohlo částečně vysvětlit, proč jsou prvoci, jako například *Dientamoeba* nebo *Blastocystis* méně častí u pacientů s onemocněním střev, oproti zdravým jedincům (de Boer *et al.*, 2020; Krogsgaard *et al.*, 2015). Oba tyto organismy jsou anaerobní (Jepps a Dobell, 1918; Zierdt, 1986), a jejich schopnost přetrvávat v mikroaerofilním prostředí je omezená.

## 7. Experimentální část

Paralelně s vypracováním této rešeršní bakalářské práce probíhá na Parazitologickém ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích i experimentální epidemiologická studie, jejíž cílem je zjistit prevalenci prvoka *D. fragilis* ve zdravé populaci lidí v České republice, porovnat citlivost několika diagnostických metod a pokusit se objasnit, zda mají na přítomnost dientaméby vliv i jiné vnější faktory, jako je dieta, věk, životní styl nebo kontakt se zvířaty. Výsledky této studie budou shrnuty v diplomové práci.

### 7.1. Materiál a metodika

#### 7.1.1. Získávání vzorků

Vzorky stolice byly získávány neinvazivní cestou od dobrovolníků, kterým byla nabídnuta dobrovolná účast v projektu. Kromě vzorků lidských byly v případě zájmu přijímány také vzorky trusu zvířat, se kterými jsou účastníci v častém kontaktu. Všechny tyto vzorky stolice či trusu a z nich vyizolovaná DNA, jsou uchovávány při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Všichni zúčastnění dobrovolníci vyplnili formulář s informacemi nezbytnými pro náš výzkum, zahrnující informace o dietě (např. vegetarián, vegan), kontaktu se zvířaty, cestování, případně diagnózou některého ze zánětlivých onemocnění střev. Veškerá data jsou striktně anonymizována a zpracovávána dle zákona č. 101/2000 Sb. O ochraně osobních údajů. Daný projekt je zároveň součástí větší studie, která byla posouzena jako eticky přípustná a odpovídající rozsahu Etické komise Biologického centra AV ČR v. v. i. V Českých Budějovicích (číslo rozhodnutí 1/2017).

#### 7.1.2. Diagnostické metody

Vzorky vyizolované DNA byly analyzovány pomocí konvenční polymerázové řetězové reakce s následnou vizualizací na elektroforéze s agarózovým gelem. Pro ověření pozitivity vzorků byla zvoleno sekvenování získaných PCR úseků (amplikonů). Tento postup bude podrobněji rozepsán dále (viz kap. 7.1.2.1.). V případě vzorků s nejasným výsledkem se přistoupilo k dalším metodám, a to klonování a Southern blotu s následnou hybridizací s vhodnou sondou (viz kap. 7.1.2.2. a 7.1.2.3.).

### 7.1.2.1. Molekulární detekce

Celková DNA byla izolována s použitím komerčního kitu PSP Stool Kit DNA (Stratec, Německo). Chemie PCR probíhala za podmínek již optimalizovaných pro tento typ amplifikace za použití přístroje T100™ Thermal Cycler, (Biorad). Jednalo se o gradientovou PCR, tj. 1. krok je 5 minut při 95°C, 2. krok 1 minuta při 94°C, 3. krok 1 a půl minuty při 58°C, 4. krok 2 minuty při 72°C, pak se kroky 2 až 4 34x opakují. Poté je poslední krok 10 minut při 72°C. Po následné elektroforéze na agarózovém gelu byly DNA produkty purifikovány komerčním kitem Elute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, USA) a následně sekvenovány u firmy GATC – A Eurofins Genomics Company. Výsledné sekvence byly otypovány v platformě BLAST. Zbytek DNA byl použit v rámci dalších projektů a pro detekci jiných prvoků, jako jsou například *Blastocystis* nebo *G. intestinalis*.

### 7.1.2.2. Klonování

Některé diagnosticky „podezřelé“ vzorky, které po sekvenování obsahovaly více překrývajících se signálů, byly klonovány pro odhalení případné přítomnosti *D. fragilis*.

Vlastní metoda zahrnovala několik kroků. Nejprve extrakci DNA z PCR po proběhnutí elektroforézy z agarového gelu pomocí Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, USA). Pro samotné klonování byl použit pGEM®-T Easy Vector Systém I (Promega, USA). V tabulce (Tab. 2) je sepsáno použité množství jednotlivých složek pro klonování jednoho vzorku. Připravená směs byla inkubována přes noc při teplotě 12°C.

**Tab. 2:** 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
PCR produkt (DNA)	2,3
DNA T4 Ligase	1
voda pro PCR	0,7

Další fází byla transformace připraveného vektoru do vhodných bakterií. Ta sestává z dílčích kroků jako je smíchání klonovacího vektoru s kompetentními buňkami *E. coli* XL-1. Směs byla ponechána 10 min na ledu, a poté byl proveden tzv. „heat shock“ zahřátím směsi v termobloku Bio TDB-100 (Biosan, Lotyšsko) na 42°C po dobu 40 sekund, při kterém se vektor dostane do buněk bakterií. Následovalo ochlazení na ledu po dobu asi 1 minuty. Ke směsi bylo přidáno 150 µl SOC média (2% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> a 20 mM glukóza) přehřátého na 37°C. Takto připravené zkumavky se nechaly třepat po dobu 40 minut při 37°C. Další fází byl výsev buněk na předem připravené agarové plotny, ošetřené ampicilinem. Ampicilin byl použit pro zamezení růstu nežádoucích organismů. Před vlastním výsevem buněk bylo na každou Petriho misku nanášeno a rovnoměrně rozetřeno pomocí bakteriologické hokejky 35 µl X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid, Amresco, USA) a 5 µl IPTG (izopropyl-β-D-thiogalaktosid, Amresco, USA). Po výsevu buněk se Petriho misky nechaly přes noc (cca 12 hodin) inkubovat při teplotě 37°C.

Po skončení inkubace byly z každé misky odebrány tři bílé kolonie pomocí čisté pipetovací špičky a přeneseny do připravených zkumavek se 4 ml tekutého LB média (trypton, kvasničný extrakt a NaCl) s přidaným ampicilinem. Tato směs byla opět inkubována 12 hodin v třepačce při 37°C. Narostlá buněčná směs byla odstředěna a získaný bakteriální sediment byl použit pro izolaci plazmidové DNA za použití komerčního kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Švýcarsko).

Po izolaci plazmidové DNA následovalo restriční štěpení pro ověření, jakou velikost zaklonovaného fragmentu plazmid nese. DNA byla štěpena pomocí vhodného restričního enzymu, v našem případě EcoRI (New England Biolabs, USA). Reakční směs obsahovala 3,5 µg plazmidové DNA, 1 µl pufru (10x koncentrovaného) s 2 jednotkami enzymu EcoRI a 5,5 µl vody pro PCR. Takto připravená směs byla inkubována 30 minut při teplotě 37°C.

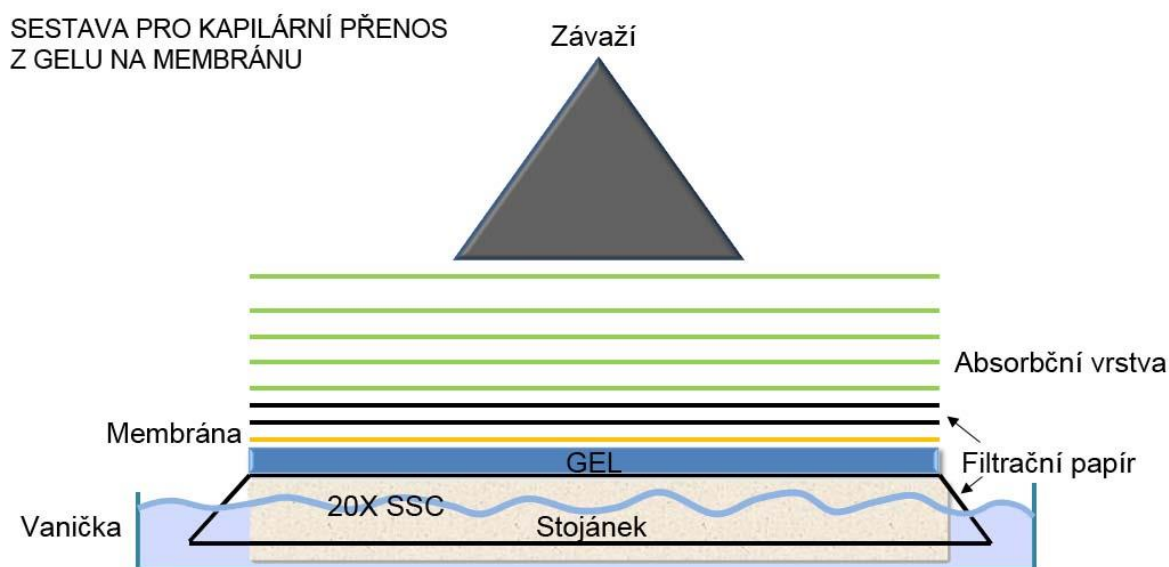
Pomocí elektroforézy se ověřila úspěšnost klonování a zároveň kontrola velikosti zaklonovaného fragmentu. DNA vybraných klonů byla odeslána na sekvenování komerční firmou Eurofins GATC Biotech.

### **7.1.2.3. Southern blot a hybridizace s radioaktivně značenou sondou**

Další možnou metodou pro zvýšení senzitivity diagnostiky prvoka *D. fragilis* byl zvolen Southern Blot s následnou hybridizací.

Prvním krokem před samotným přenosem DNA z gelu na membránu bylo provedení PCR s následnou elektroforézou. Jednalo se o vybrané vzorky, ve kterých byl fragment DNA odpovídající velikosti velice slabý. Poté následovala příprava DNA v gelu pro přenesení. To zahrnovalo depuracii v depurinačním roztoku (0,25 M HCl) po dobu 20 minut za účelem rozlámání příliš dlouhých fragmentů DNA. Následovalo opláchnutí gelu v destilované vodě. Poté byl gel ponořen do denaturačního roztoku (0,5 M NaOH, 1,5M NaCl) po dobu 20 minut a znovu opláchnut v destilované vodě. Posledním krokem před přenosem DNA z gelu na membránu byla neutralizace v neutralizačním roztoku (0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl) s následným promytím v destilované vodě.

Následně byla sestavena aparatura pro kapilární přenos DNA z gelu na membránu (Obr. 13).



**Obr. 13:** Sestava pro kapilární přenos DNA z gelu na membránu (Southern Blot). (<https://labguide.cz/631-2/>).

Jako přenosový pufr byl použit 20X SSC (Saline-sodium citrate, 3M NaCl, 0,3M  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ , dH<sub>2</sub>O).

Puftr se v takto složené aparatuře nechal vzlínat přes noc při 10 °C. Potom byla soustava rozebrána, membrána kvůli správné orientaci označena a DNA pomocí UV na crosslinkeru zafixována.

Hybridizace membrány s následným promýváním v hybridizační peci (Labnet, USA) byla provedena dle protokolu Zeta-Probe® Blotting Membranes (Biorad). Prehybridizace probíhala při 65 °C po dobu 2 hodin za použití standardního zeta probe hybridizačního roztoku. Samotná hybridizace s próbou probíhala přes noc při stejné teplotě. Druhý den byla membrána celkem čtyřikrát promyta standardním promývacím roztokem.

Takto ošetřená membrána s navázanou radioaktivní sondou byla přes noc exponována v kazetě. Druhý den se pomocí Typhoon Scanner (GE Healthcare, USA) zobrazily výsledky hybridizačního procesu.

## 7.2. Průběžné výsledky

Dosud bylo získáno 424 vzorků, ze kterých je 288 lidských a 136 od různých zvířat (se kterými jsou účastníci v častém kontaktu). Vzorky byly získávány z různých částí celé České republiky. V dotazníku účastníci uvedli své zaměstnání, věk, typ diety, cestování a kontakt se zvířaty.

Při zpracování dat jsme byli nuceni odstoupit od záměru analyzovat vliv diety na přítomnost *D. fragilis*, jelikož se nám nepodařilo nashromáždit dostatečné množství vzorků od dobrovolníků stravujících se alternativně (vegetarián, vegan).

Na všech vzorcích proběhla PCR a pozitivní pak byly sekvenovány. Z 288 lidských vzorků je zatím 17 pozitivních, což znamená, že prevalence u lidí je 5,9 %. Všechny zvířecí vzorky se ukázaly být negativní.

Dosavadní shrnutí výsledků vychází zatím pouze z PCR metodiky. Během klonování se nám nepodařilo prokázat přítomnost dientaméby u žádných z podezřelých vzorků.

Metoda založená na použití radioaktivity (Southern Blot s následnou hybridizací), se ukazuje být slibnější, nicméně výsledky budou kompletně shrnuty až v diplomové práci. Dále se také uskuteční diagnostika pomocí RT-PCR.

## 8. Závěr

*Dientamoeba fragilis* je kosmopolitně rozšířený prvok, o jehož roli v lidském zdraví a nemoci se ve vědecké sféře stále vedou diskuze. Bylo sepsáno mnoho prací, které považují dientamébu za neškodného komenzála, ale i takové, které ji spojují se střevními nemocemi, jako je například syndrom dráždivého tračníku (IBS) nebo gastroenteritida, v lehčím případě průjem a bolesti břicha. Nesoulad výsledků může být způsoben různými subtypy *D. fragilis*. Jsou udávány dva různé genotypy, které se od sebe liší pouze v řádu jednotkách procent. Objevila se i práce, která popsala dokonce čtyři subtypy tohoto prvoka, přičemž všechny měly patogenní charakter. Tato studie ovšem nebyla potvrzena žádnými novějšími poznatky, proto je nutné brát tuto informaci s rezervou. Další možná příčina nesouladu ohledně patogenity může být zapříčiněna odlišnými morfologickými formami z hlediska povrchu buňky (hladké, zvlněné buňky). Avšak, jejich genetická odlišnost není zatím známá a mohla by být předmětem nových studií.

Ohledně diagnostiky *D. fragilis* se jako nejideálnější jeví molekulární metody, a to pro svou vysokou citlivost a specifitu konkrétně RT-PCR. To je v současné době nejpoužívanější cesta k odhalení přítomnosti tohoto prvoka v lidském organismu.

V rámci dílčího cíle zaměřeného na objasnění vlivu několika vybraných faktorů na kolonizaci tímto prvokem bylo zjištěno, že vyšší pravděpodobnost výskytu dientaméby mají děti ve věku od 7 do 11 let. Pohlaví v tomto případě nehrálo žádnou roli. Dále nebyl zaznamenán výrazný rozdíl mezi dětmi cestujícími po Evropě, mimo Evropu ani těmi, které v posledních měsících neopustily danou zem.

Dalším dílčím cílem bylo porovnání výskytu *D. fragilis* u zdravých lidí žijících v rozvinutých zemích a v zemích třetího světa. Jelikož je jen málo studií, které se zaměřují na zdravé jedince (tzn. lidí bez gastrointestinálních problémů) v souvislosti s prvoky, tak bylo obtížné porovnat výskyt a prevalenci *D. fragilis* mezi těmito populacemi. Z dostupných informací ovšem vyplývá, že kolonizace tímto prvokem je ve vyspělých zemích běžnější než se očekávalo.

Nejen tento prvok, ale i další, jako je například *Blastocystis*, postupně přecházejí od statutu patogen k označení komenzál. Dokonce nedávné studie naznačují, že se spíše řadí k „prospěšným“ organismům v těle.

## 9. Seznam citované literatury

1. **Afzan MY, Sivanandam S, Kumar GS (2010).** Modified Field's staining - a rapid stain for *Trichomonas vaginalis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 68: 159–162.
2. **Andersen LOB, Bonde I, Nielsen HB, Stensvold CR (2015).** A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiology Ecology*. 91: 50–75.
3. **Aykur M, Armagan G, Vardar R, Dagci H (2020).** Fecal calprotectin as a factor that supports the pathogenicity of *Dientamoeba fragilis*. *Microbial pathogenesis*. 139: e103868.
4. **Aykur M, Kurt C, Erdogan D, Vardar AR, 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.
5. **Banik GR, Barratt JLN, Marriott D, Harkness J, Ellis JT, Stark D (2011).** A case-controlled study of *Dientamoeba fragilis* infections in children. *Parasitology*. 138: 819–823.
6. **Banik GR, Birch D, Stark D, Ellis JT (2012).** A microscopic description and ultrastructural characterisation of *Dientamoeba fragilis*: an emerging cause of human enteric disease. *International Journal for Parasitology*. 42: 139–153.
7. **Baquer NN, Hammood AH, Hassan KF, Hassan ESA (2018).** Detection of water-borne parasites in drinking water of Baghdad, Iraq. *African Journal of Infectious Diseases*. 12: 21–36.
8. **Baquero F, Nombela C (2012).** The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection*. 18: 2–4.
9. **Barratt JL, Banik GR, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D (2010).** Newly defined conditions for the in vitro cultivation and cryopreservation of *Dientamoeba fragilis*: new techniques set to fast track molecular studies on this organism. *Parasitology*. 137: 1867–1878.
10. **Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D (2011).** The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology*. 138: 557–572.



11. **Brands MR, Van de Vijver E, Haisma SM, Heida A, van Rheenen PF (2019).** No association between abdominal pain and *Dientamoeba* in Dutch and Belgian children. *Archives of disease in childhood*. 104: 686-689.
12. **Burrows RB (1965).** Microscopic diagnosis of the parasites of man. USA. Hartford: Connecticut Printers, Inc., 328 p.
13. **Burrows RB (1967).** A new fixative and technics for the diagnosis of intestinal parasites. *Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists*. 37: 208-212.
14. **Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos S., Lokken KL, Torres TP, Byndloss AJ, Faber F, Gao Y, LitvakY, Lopez CA, Xu G, Napoli E, GiuliviC, Tsolis RM, Revzin A, Lebrilla CB, Bäumler AJ (2017).** Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science*. 357: 570-575.
15. **Cacciò SM (2018).** Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis*. *Acta Tropica*. 184: 73–77.
16. **Cacciò SM, Sannella AR, Manuali E, Tosini F, Sensi M, Crotti D, Pozio E (2012).** Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans emergency infected disease. *Emerging Infectious Diseases*. 18: 838–841.
17. **Camp RR, Mattern CFT, Honigberg BM (1974).** Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell I. Electron microscopic observations of the binucleate stages II. Taxonomic position and revision of the genus. *Journal of Protozoology*. 21: 69–82.
18. **Cengiz ZT, Akbayram S, Cicek M, Yilmaz H (2009).** Intestinal parasitoses detected in primary schoolchildren in the Van province. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 33: 289-293.
19. **Clark CG, Röser D, Stensvold CR (2014).** Transmission of *Dientamoeba fragilis*: pinworm or cysts? *Trends in Parasitology*. 39: 136-140.
20. **Crotti D, Sensi M, Crotti S, Grelloni V, Manuali E (2007).** *Dientamoeba fragilis* in swine population: a preliminary investigation. *Veterinary Parasitology*. 145: 349–351.
21. **David EB, Guimaraes S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Bittencourt NG, Nardi ARM, Ribolla PEM, Franco RMB, Branco N, Tosini F, Bella A, Pozio E, Cacciò SM (2015).** Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasites & vectors*. 8: 103.
22. **Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K (2009).** Paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 103: 653–660.
23. **de Boer MD, Schuurs TA, Ruijs VM, van der Zanden AG, Weel JF, Bruijnesteijn van Copenraet LES (2020).** Distribution and relevance of *Dientamoeba fragilis* and

- Blastocystis* species in gastroenteritis: results from a case-control study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 39: 197–203.
24. **Diamond L (1982)**. A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen-dwelling protozoa. *Journal of Parasitology*. 68: 958-959.
  25. **Dobell C (1940)**. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. X. The life history of *Dientamoeba fragilis*: Observations, experiments, and speculations. *Journal of Parasitology*. 32: 417-461.
  26. **Donohoe DR, Wali A, Brylawski BP, Bultman SJ (2012)**. Microbial regulation of glucose metabolism and cell-cycle progression in mammalian colonocytes. *PloS One*. 7: e46589.
  27. **Dwyer DM (1972)**. Analysis of the antigenic relationship among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. II. Gel diffusion methods. *Journal of Protozoology*. 19: 326–332.
  28. **Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG (2016)**. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*. 34: 47-52.
  29. **El-Gayar, EK, Amira BM, Wael AH (2016)**. Study of the pathogenic potential of *Dientamoeba fragilis* in experimentally infected mice. *Parasite epidemiology and control*. 12: 136-143.
  30. **Engsbro A, Stensvold C, Nielsen H (2012)**. Treatment of *Dientamoeba fragilis* in patients with irritable bowel syndrome. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 87: 1046–1052.
  31. **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: 298.
  32. **Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC (1997)**. Metronidazole. *Drugs*. 54: 679–708.
  33. **Gerbod D, Edgcomb VP, Noel C, Zenner L, Wintjens R, Delgado-Viscogliosi P, Holder ME, Sogin ML, Viscogliosi E (2001)**. Phylogenetic position of the trichomonad parasite of Turkeys, *Histomonas meleagridis*, inferred from small subunit rRNA sequence. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 48: 498–504.
  34. **Girginkardesler N, Kurt Ö, Kilimcioğlu AA, Ülgen Z (2008)**. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. *Parasitology International*. 57: 72-75.
  35. **Goldman, M, Brooke MM (1953)**. Protozoans in stools unpreserved and preserved in PVA fixative. *Public Health Reports Journal*. 68: 703-706.

36. **Gough R, Ellis J, Stark D (2019).** Comparison and recommendations for use of *Dientamoeba fragilis* real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 57: e01466-18.
37. **Greigert V, Abou-Bacar A, Brunet J, Nourrisson C, Pfaff AW, Benarbia L, Morel E (2018).** Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa. *PloS One*. 13: e0204576.
38. **Hamidi N, Meamar AR, Akhlaghi L, Rampisheh Z, Razmjou E (2018).** *Dientamoeba fragilis* diagnosis by fecal screening: relative effectiveness of traditional techniques and molecular methods. *Journal of Infection in Developing Countries*. 12: 52-59.
39. **Hegner R, Chu HJ (1930).** A comparative study of the intestinal protozoa of wild monkeys and man. *American Journal of Hygiene*. 12: 62-108.
40. **Holtman GA, Kranenberg JJ, Blanker MH, Ott A, Lisman-van Leeuwen Y, Berger MY (2016).** *Dientamoeba fragilis* colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level. *Family practice*. 34: 25-29.
41. **Hussein EM, Al-Mohammed HI, Hussein AM (2009).** Genetic diversity of *Dientamoeba fragilis* isolates of irritable bowel syndrome patients by high-resolution melting-curve (HRM) analysis. *Parasitology Research*. 105: 1053–1060.
42. **Chabé M, Lokmer A, Ségurel L (2017).** Gut protozoa: friends or foes of the human gut microbiota? *Trends in parasitology*. 33: 925-934.
43. **Chan D, Barrat J, Roberts T, Philips O, Šlapeta J, Ryan U, Marriott D, Harness J, Elis J, Stark D (2016).** Detection of *Dientamoeba fragilis* in animal faeces using species specific real time PCR assay. *Veterinary Parasitology*. 227: 42–47.
44. **Chan F, Stewart N, Guan M, Robb I, Fuite L, Chan I, Diaz-Mitoma F, King J, MacDonald D, 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 & Infectious Diseases*. 15: 950-954.
45. **Chan FT, Guan MX, Mackenzie AM (1993).** Application of indirect immunofluorescence to detection of *Dientamoeba fragilis* trophozoites in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 1710-1714.
46. **Jepps MW, Dobell C (1918).** *Dientamoeba fragilis* n.g., n.sp., a new intestinal amoeba from man. *Parasitology*. 10: 352–367.
47. **Johnson EH, Windsor JJ, Clarck CG (2004).** Emerging of obscurity: Biological, clinical and diagnostics aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clinical Microbiology Review*. 17: 553-570.

48. **Johnson JA, Clark CG (2000).** Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 4653–4654.
49. **Jokelainen P, Hebbelstrup JB, Andreassen BU, Petersen AM, Röser D, Krogfelt KA, Nielsen HV, Stensvold CR (2017).** *Dientamoeba fragilis*, a commensal in children in Danish day care centers. *Journal of Clinical Microbiology*. 55: 1707-1713.
50. **Knoll EW, Howell KM (1945).** Studies on *Dientamoeba fragilis*; its incidence and possible pathogenicity. *American Journal of Clinical Pathology*. 15: 178–183.
51. **Kofoed CA (1923).** Amoeba and man. University of California Press, Berkeley, CA.
52. **Krogsgaard LR, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, Bytzer P (2015).** The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 13: 507-513.
53. **Kurt O, Girginkardeşler N, Balcioglu IC, Özbilgin A, Ok UZ (2008).** A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of dientamoebiasis. *Clinical Microbiology and Infection*. 14: 601–604.
54. **Kurt O, Girginkardeşler N, Özbilgin A, Ok UZ (2019).** The effectiveness of the culture for *Dientamoeba fragilis* from the stool. *Infectious Diseases and Clinical Microbiology*. 1: 34-41.
55. **Lagacé-Wiens PR, VanCaesele PG, Koschik C (2006).** *Dientamoeba fragilis*: an emerging role in intestinal disease. *Canadian Medical Association Journal*. 175: 468-468.
56. **Lankester F, Kiyang JA, 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*. 41: 350-352.
57. **Lazar V, Ditu LM, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, Picu A, Petcu L, Chifiriuc MC (2018).** Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology and cancer. *Frontiers in Immunology*. 9: 1830.
58. **Lhotská Z (2019).** Study of *Blastocystis* in human microbiome. 64 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
59. **Lukeš J, Stensvold CR, Jirků-Pomajbíková K, Wegener Parfrey L (2015).** Are human intestinal eukaryotes beneficial or commensals? *PloS Pathogens*. 11: e1005039.
60. **Maas L, Dorigo-Zetsma JW, de Groot CJ, Bouter S, Plotz FB, van Ewijk BE (2014).** Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*. 20: 545–550.

61. **McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM (2014).** Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 52: 712–720.
62. **Menéndez C, Fernández-Suarez J, Ribeiro JAB, Rodríguez-Pérez M, Vázquez F, Gonzalez-Sotorrios N, Rodríguez-Guardado A (2019).** Epidemiological and clinical characteristics of *Dientamoeba fragilis* infection. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 37: 290-295.
63. **Menu E, Mary C, Toga I, Raoult D, Ranque S, Bittar F (2019).** A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France. *Epidemiology and Infection*. 147: e100.
64. **Moody AH and Fleck SL (1985).** Versatile Field's stain. *Journal of Clinical Pathology*. 38: 842-843.
65. **Munasinghe VS, Vella NG, Ellis JT, Windsor PA, 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.
66. **Myers BJ, Kunitz RE (1968).** Intestinal protozoa of the baboon *Papio doguera Pucheran*, 1856. *Journal of Protozoology*. 15: 363–365.
67. **Nagata N, Marriott D, Harkness J, Ellis JT and Stark D (2012).** *In vitro* susceptibility testing of *Dientamoeba fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56: 487–494.
68. **Naja M, Mallat H (2008).** Biological analysis of workers in the food sector in north Lebanon. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 14: 1425-1434.
69. **Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT (2017).** Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 14: 573-584.
70. **Ockert G (1990).** Symptomatology, pathology, epidemiology, and diagnosis of *Dientamoeba fragilis*. Trichomonads parasitic in humans. Springer Publications, New York, N.Y. p. 394-410.
71. **Ögren J, Dienus O, Löfgren S, Einemo IM, 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 & Infectious Diseases*. 34: 1995–1998.
72. **Ögren J, Van Nguyen S, Nguyen MK, Dimberg J, Matussek A (2016).** Prevalence of *Dientamoeba fragilis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica/dispar* and *Cryptosporidium* spp. in Da Nang, Vietnam, detected by a multiplex realtime PCR. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 124: 529-533.

73. **Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, Wawrzyniak I (2016).** Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PloS Neglected Tropical Diseases*. 10: e0004496.
74. **Parker W, Ollerton J (2013).** Evolutionary biology and anthropology suggest biome reconstitution as a necessary approach toward dealing with immune disorders. *Evolution, medicine and public health*. 2013: 89-103.
75. **Paulos S, Köster PC, de Lucio A, de-Mingo MH, Cardona GA, Fernández-Crespo JC, Stensvold CR, Carmena D (2018).** Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis sp.* in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonoses Public Health*. 65: 993-1002.
76. **Peek R, Reedecker FR, van Gool T (2004).** Direct amplification and genotyping of from human stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 631–5.
77. **Pietilä JP, Meri T, Siikamäki H, Tyyni E, Kerttula AM, Pakarinen L, Jokiranta TS, Kantele A (2019).** *Dientamoeba fragilis* – the most common intestinal protozoan in the Helsinki Metropolitan Area, Finland, 2007 to 2017. *Eurosurveillance*. 24: e1800546.
78. **Preiss U, Ockert G, Bromme S, Otto A (1990).** *Dientamoeba fragilis* infection, a cause of gastrointestinal symptoms in childhood. *Klinical Padiatry*. 202: 120 –123.
79. **Ragavan AD, Govind SK (2015).** Modified Fields’ stain: ideal to differentiate *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis spp.* *Parasitology Research*. 114: 1163–1166.
80. **Rohde W, Mikelens P, Jackson J, Blackman J, Whitcher J, Levinson W (1976).** Hydroxyquinolines inhibit ribonucleic acid-dependent deoxyribonucleic acid polymerase and inactivate Rous sarcoma virus and herpes simplex virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 10: 234–40.
81. **Rook G, Bäckhed F, Levin BR., McFall-Ngai MJ, McLean AR (2017).** Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *The Lancet*. 390: 521-530.
82. **Rook GA (2012).** Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clinical reviews in allergy & imunology*. 42: 5-15.
83. **Rook GA, Raison CL, Lowry CA (2014).** Microbial ‘Old Friends’, immunoregulation and socioeconomic status. *Clinical & Experimental Immunology*. 177: 1-12.
84. **Röser D, Nejsum P, Carlsgart AJ, Nielsen HV, Stensvold CR (2013a).** DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. *Experimental Parasitology*. 133: 57–61.

85. **Röser D, Simonsen J, Nielsen HV, Stensvold CR, Mølbak K (2013b).** *Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*. 32: 1303–1310.
86. **Röser D, Simonsen J, Stensvol, CR, Olsen KE, Bytzer P, Nielsen HV, 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.
87. **Røseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjønsby H (1992).** Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 27: 793–8.
88. **Ryan U, Cacciò SM (2013).** Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*. 43: 943–956.
89. **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: 113-8.
90. **Sawangjaroen N, Luke R, Prociv P (1993).** Diagnosis by faecal culture of *Dientamoeba fragilis* infections in Australian patients with diarrhoea *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 87: 163–165.
91. **Schaechter M, Engleberg NC, Rita VJ, Dermody TS (2006).** Schaechter's mechanisms of microbial disease. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. 784 p.
92. **Scholten T (1972).** An improved technique for the recovery of intestinal protozoa. *Journal of Parasitology*. 58: 633-634.
93. **Schure JMAT, de Vries M, Weel JFL, van Roon EN, Faber TE (2013).** Symptoms and treatment of *Dientamoeba fragilis* infection in children, a retrospective study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 32: 148–150.
94. **Silberman JD, Clark CG, Sogin ML (1996).** *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 76: 311–314.
95. **Simon M, Shookhoff HB, Terner H, Weingarten B, Parker JG (1967).** Paromomycin in the treatment of intestinal amebiasis; a short course of therapy. *American Journal of Gastroenterology*. 48: 504–511.
96. **Stark D, Barratt J, Chan D, Ellis JT (2016).** *Dientamoeba fragilis*, the neglected trichomonad of the human bowel. *Clinical Microbiology Reviews*. 29: 553–580.

97. **Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J (2010a).** A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 82: 614–619.
98. **Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J (2010b).** Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 29: 411–416.
99. **Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J (2005).** Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *International Journal for Parasitology*. 35: 57-62.
100. **Stark D, Garcia LS, Barratt JL, Phillips O, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis JT (2014).** Description of *Dientamoeba fragilis* cyst and precystic forms from human samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 52: 2680–2683.
101. **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.
102. **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.
103. **Stensvold CR, Arendrup MC, Molbak K, Nielsen HV (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.
104. **Stensvold CR, Clark CG, Röser D (2013).** Limited intra-genetic diversity in *Dientamoeba fragilis* housekeeping genes. *Infection, Genetics and Evolution*. 18: 284–286.
105. **Stensvold CR, Lebbad M, Victory EL, Verweij JJ, Tannich E, Alfellani M, Legarraga P, Clark CG (2011).** Increased sampling reveals novel lineages of *Entamoeba*: Consequences of genetic diversity and host specificity for taxonomy and molecular detection. *Protist*. 162: 525-541.
106. **Stensvold CR, Nielsen HV (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.
107. **Stensvold, CR, van der Giezen M (2018).** Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends in Parasitology*. 34: 369-377.



108. **Strachan DP (1989)**. Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal*. 299: 1259.
109. **Sukanahaketu S (1977)**. The presence of *Dientamoeba fragilis* in the *Ascaris lumbricoides* ova: The first report from Thailand. *Journal of the Medical Association*. 60: 265-268.
110. **Talis B (1967)**. Antigenic relationships among strains of *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis* and *Entamoeba invadens*. *Journal of Protozoology*. 14: 44.
111. **van Gestel RS, Kusters JG, Monkelbaan JF (2018)**. A clinical guideline on *Dientamoeba fragilis* infections. *Parasitology*. 146: 1–9.
112. **Vandenberg O, Peek R, Souayah H, Dediste A, Buset M, Scheen R, Retore P, Zissis G, van Gool T (2006)**. Clinical and microbiological features of dientamoebiasis in patients suspected of suffering from a parasitic gastrointestinal illness: a comparison of *Dientamoeba fragilis* and *Giardia lamblia* infections. *International Journal of Infected Diseases*. 10: 255–261.
113. **Vandenberg O, Souayah H, Mouchet F, Dediste A, van Gool T (2007)**. Treatment of *Dientamoeba fragilis* infection with paromomycin. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 26: 88–90.
114. **Verweij JJ, Mulder B, Poell B, van Middelkoop D, Brienen EAT, van Lieshout L (2007)**. Real-time PCR for detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. *Molecular and Cellular Probes*. 21: 400-404.
115. **Vital M, Howe AC, Tiedje JM (2014)**. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *mBio*. 5: e00889-14.
116. **Volf P, Horák P (2007)**. Paraziti a jejich biologie. Vyd. 1. Praha: Triton. 318 s.
117. **Wenrich D (1936)**. Studies on *Dientamoeba fragilis* (Protozoa). I. Observations with special reference to nuclear structure. *Journal of Parasitology*. 22: 76–83.
118. **Windsor JJ, Clark CG, Macfarlane L (2004)**. Molecular typing of *Dientamoeba fragilis*. *British Journal of Biomedical Science*. 61: 153–155.
119. **Windsor JJ, Johnson EH (1999)**. *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. *British Journal of Biomedical Science*. 56: 293–306.
120. **Windsor JJ, Macfarlane L, Clarck CG (2006)**. Internal transcribed spacer dimorphism and diversity in *Dientamoeba fragilis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53: 188-192.
121. **Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SKA, Whiteside TM (2003)**. Detection of *Dientamoeba fragilis* by culture. *British Journal of Biomedical Science*. 60: 79-83.

122. **Yang J, Scholten TH (1977a)**. A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. *American Journal of Clinical Pathology*. 67: 300-304.
123. **Yang J, Scholten TH (1977b)**. *Dientamoeba fragilis*: a review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission and diagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 26: 16-22.
124. **Zierdt CH (1986)**. Cytochrome-free mitochondria of an anaerobic protozoan - *Blastocystis hominis*. *Journal of Protozoology*. 33: 67-69.