

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

qPCR diagnostika střevního prvoka
***Blastocystis* sp. v souboru vzorků od zdravých lidí**

Diplomová práce

Bc. Martina Šloufová

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Milan Jirků

Konzultant: RNDr. Zuzana Lhotská, prof. MUDr. Ondřej Cinek Ph.D.

České Budějovice 2022

Bc. Šloufová, M., 2022: qPCR diagnostika střevního prvoka *Blastocystis* sp. v souboru vzorků od zdravých lidí. [qPCR diagnostics of the intestinal protist *Blastocystis* sp. in a set of samples from healthy people. Mgr. Thesis, in Czech] – 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main aim of this study was to introduce and optimize the qPCR diagnostic protocol for detection of intestinal protist, *Blastocystis* sp. We compared the sensitivity of conventional PCR (cPCR) and real-time PCR (qPCR) in a set of 288 human samples from gut-healthy individuals and subtype diversity as detected by *Next-generation* sequencing (NGS) versus Sanger sequencing. The overall prevalence of *Blastocystis* sp. was 29 %. Based on the results, we found out that qPCR is a more sensitive method than cPCR. In subtype detection, NGS was completely in agreement with Sanger sequencing but showed higher sensitivity for mixed subtype colonization within one host. A combination of these two approaches could be beneficial for future epidemiological studies.

Prohlášení:

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

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: 12. 4. 2022

Podpis.....

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce MVDr. Kateřině Jirků, Ph.D. a odbornému školiteli RNDr. Milanovi Jirků za cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi během přípravy této diplomové práce věnovali. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře parazitární terapie za pomoc a přátelské prostředí. V neposlední řadě také prof. MUDr. Ondřejovi Cinkovi Ph.D. za identifikaci subtypů, Mgr. Kláře Petrželkové, Ph.D. za pomoc se statistickým vyhodnocením dat a Studentské grantové agentuře za udělení studentského grantu.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Životní cyklus.....	1
1.2	Výskyt a prevalence.....	3
1.3	Genetická diverzita.....	5
1.3.1	Diverzita subtypů <i>Blastocystis</i> sp. u člověka.....	5
1.3.2	Geografická distribuce subtypů.....	6
1.3.3	Směsné kolonizace subtypů <i>Blastocystis</i> sp.	7
1.4	Klinický význam <i>Blastocystis</i> sp.	8
1.5	<i>Blastocystis</i> sp. ve střevním mikrobiomu.....	9
1.5.1	Prospěšný vliv <i>Blastocystis</i> sp. na střevní mikrobiom.....	10
1.5.2	Nepříznivý vliv <i>Blastocystis</i> sp. na střevní mikrobiom.....	11
1.6	Diagnostika.....	11
1.6.1	Molekulární metody.....	12
1.6.1.1	Konvenční PCR (cPCR).....	12
1.6.1.2	Real-time PCR (qPCR).....	13
1.6.1.3	<i>Next-generation</i> sequencing (NGS).....	14
2	Cíle práce.....	16
3	Materiál a metodika.....	17
3.1	Molekulární detekce.....	17
3.1.1	qPCR diagnostika.....	17
3.1.2	Optimalizace kvantifikační křivky.....	18
3.1.3	Kontrola vnitřní inhibice.....	18
3.2	Statistické srovnání citlivosti dvou diagnostických přístupů.....	19
3.3	Určení jednotlivých subtypů metodou <i>Next-generation</i> sekvenování.....	19
4	Výsledky.....	20
4.1	Prevalence <i>Blastocystis</i> sp. na základě qPCR.....	20
4.2	Vyhodnocení intenzity kolonizace.....	20
4.3	Testování vnitřní inhibice.....	22
4.4	Porovnání citlivosti dvou diagnostických metod qPCR a cPCR.....	22
4.5	Diverzita subtypů na základě NGS a srovnání s výsledky ze Sanger sekvenování.....	23
5	Diskuze.....	26
6	Závěr.....	32
7	Seznam použitých zdrojů a literatury.....	33

1 Úvod

Blastocystis sp. je anaerobní prvek kolonizující střevní trakt člověka a mnoha druhů zvířat (Alfellani et al., 2013a; Clark et al., 2013). Fylogeneticky je řazen do heterogenní skupiny Stramenopiles (Silberman et al., 1996). V současné době je považován za jednoho z nejběžnějších střevních prvků člověka a celosvětově se vyskytuje u více než 1 miliardy lidí (Andersen a Stensvold, 2016). Ačkoliv byl popsán před více než 100 lety (Alexeieff 1911), jeho vliv na lidské zdraví a role ve střevním mikrobiomu zůstává stále ještě nevyjasněná a kontroverzní (Scanlan et al., 2014; Krogsgaard et al., 2015). Dříve byl pokládán za patogenní organismus způsobující gastrointestinální onemocnění (Poirier et al., 2012; El Safadi et al., 2013; Petersen et al., 2013; Nourrisson et al., 2014). V současné době se však mnozí odborníci přiklánějí spíše k názoru, že se jedná o komenzála, který je nedílnou složkou vyváženého střevního mikrobiomu a je také spojován s vyšší bakteriální diverzitou (Andersen et al., 2015; Audebert et al., 2016; Nieves-Ramirez et al., 2018).

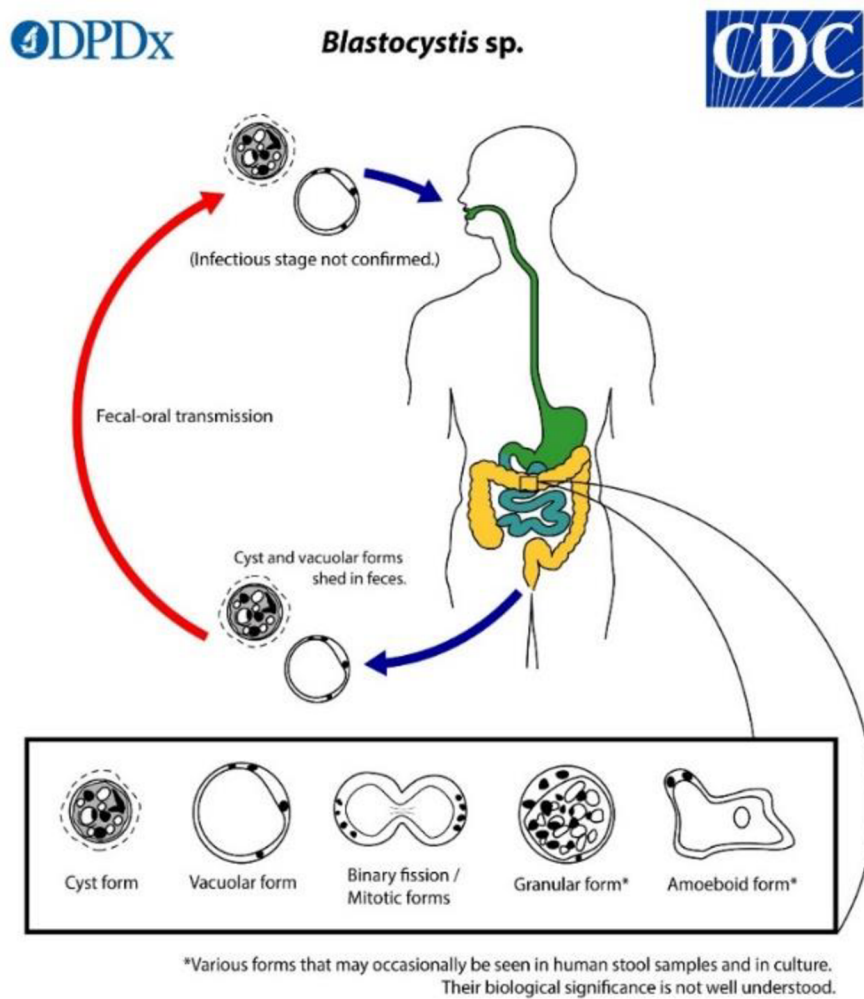
1.1 Životní cyklus

V životním cyklu *Blastocystis* sp. byla popsána čtyři základní morfologická stádia, konkrétně vakuolární, granulární, améboidní a cysta (Zierdt et al., 1967; Stenzel a Boreham, 1991). Experimentální studie u potkanů prokázaly, že přenos je zprostředkován stádiem cysty (Yoshikawa et al., 2004a; Clark et al., 2013). Cysty mohou být dvojího druhu. Tenkostěnné cysty se podílejí na autoinfekci ve střevním traktu člověka i zvířat. Naopak silnostěnné cysty umožňují přenos blastocyst ve vnějším prostředí (Singh et al., 1995).

Přenos *Blastocystis* sp. mezi jedinci probíhá fekálně-orální cestou. Cesty přenosu mohou být buď přímé (tj. mezi jedinci kontaktem) nebo nepřímé (např. požitím kontaminované vody nebo potravin) (Yoshikawa et al., 2004a; Anuar et al., 2013). Zvažována je také možnost zoonotického přenosu (Parkar et al., 2007; Abe et al., 2003a; Wang et al., 2014; Greige et al., 2018; Cian et al., 2017).

Po konzumaci kontaminované potravy postupují cysty trávicím traktem až do tlustého střeva, kde dochází k excystaci a uvolnění vakuolární formy do střevního prostředí. Vakuolární formy se posléze množí pomocí binárního dělení a mohou se případně transformovat na améboidní nebo granulární stádium. Podrobnosti ohledně jejich vývoje však nebyly prokazatelně stanoveny. V tlustém střevě dochází také k encystaci a nově vzniklé cysty jsou exkrementy vyloučeny do vnějšího prostředí, kde jsou schopny dalšího přenosu (Moe et al., 1997; Tan, 2008). Životní cyklus znázorňuje obrázek (Obr. 1).

Obr. 1: Životní cyklus *Blastocystis* sp. (převzato z <https://www.cdc.gov/parasites/blastocystis/biology.html>).



1.2 Výskyt a prevalence

Blastocystis sp. je rozšířen po celém světě a odhaduje se, že se vyskytuje u více než jedné miliardy lidí (Andersen a Stensvold, 2016). Celková prevalence může být ovlivněna různými faktory, jako je imunitní systém hostitele, věk, stravovací návyky, druh diagnostické metody, geografická poloha a podobně (Tab. 1) (Clark et al., 2013; Popruk et al., 2021). Právě diagnostická metoda je jeden z hlavních faktorů, který může ovlivnit zjištěnou prevalenci *Blastocystis* sp. v souboru vzorků (Clark et al., 2013). Obecně jsou molekulární diagnostické přístupy více senzitivní než mikroskopie nebo kultivace (Lhotská et al., 2020; Stensvold et al., 2007a; Roberts et al., 2011) a kombinace těchto metod může poskytnout přesnější výsledky. Například ve studii El Safadi et al. (2014) provedené v Senegalů byla pomocí kombinace molekulárních metod konvenční PCR a real-time PCR zjištěna nejvyšší prevalence vůbec, a to 100 % (93/93).

V rozvojových zemích je pozorována mnohem vyšší prevalence než ve vyspělých zemích a dosahuje v některých případech až 100 % (El Safadi et al., 2014; Osman et al., 2016; Poulsen et al., 2016). Například studie v severovýchodní Argentíně se zaměřovala na výskyt střevních prvoků v domorodých komunitách. *Blastocystis* sp. byla s využitím molekulární diagnostiky konvenční PCR detekována u 57 % obyvatel (125/218) (Candela et al., 2021). K vyšší prevalenci zde přispívají zejména nízké hygienické standardy, kontakt se zvířaty a konzumace kontaminované vody či potravy (Tan, 2008; Leelayoova et al., 2008). Vysoká prevalence na základě konvenčního PCR byla zaznamenána také u asymptomatických dětí v Nigérii, kde dosahovala 84 % (167/199) (Poulsen et al., 2016). V Egyptě u dětí s akutními průjmy byly vzorky vyšetřeny mikroskopicky a celková prevalence činila 54 % (67/125) (Hamdy et al., 2020). Prevalence *Blastocystis* sp. byla sledována také v různých oblastech Íránu. U asymptomatických jedinců bylo na základě konvenčního PCR odhaleno 71 % pozitivních vzorků (60/194) (Mardani Katakí et al., 2019). Autoři jiných studií v Íránu vyšetřovali vzorky pouze mikroskopicky a zjistili tak velmi nízkou prevalenci 5 % (39/802) a 17 % (21/122), což bylo způsobeno nízkou senzitivitou použité metody pro diagnostiku blastocyst (Haghighi et al., 2020; Khademvatan et al., 2017).

Z hlediska závislosti na geografické oblasti byla nejvyšší prevalence zaznamenána v Austrálii a Oceánii (52 %) (Tab. 1), nicméně zde bylo provedeno pouze několik studií, z toho se dvě z nich zabývaly prevalencí *Blastocystis* sp. u chovatelů prasat a ošetřovatelů zvířat v zoologických zahradách (Parkar et al., 2010; Wang et al., 2014; Popruk et al., 2021). V rozvinutých zemích dosahuje prevalence *Blastocystis* sp. 7–50 % (Scanlan et al., 2014; El Safadi et al., 2016; Seyer et al., 2017; Lhotská et al., 2020). V některých studiích se výskyt

blastocyst často spojuje s informacemi o cestování do tropických a subtropických oblastí. Z toho lze usuzovat, že i cestování je důležitý faktor, který může mít vliv na kolonizaci blastocyst (Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016; van Hattem et al., 2019; Lhotská et al., 2020).

Z pohledu použití různých diagnostických přístupů byly zjištěny rozdílné prevalence ve stejné oblasti. Například v Brazílii byla u asymptomatických jedinců zjištěna prevalence blastocyst s použitím mikroskopické metody pouze u 28 % případů (216/766) (Seguí et al., 2018), zatímco s využitím konvenčního PCR byla odhalena prevalence vyšší, a to 42 % (76/181) (Oliveira-Arbex et al., 2018).

V Evropě se prevalence *Blastocystis* sp. pohybuje okolo 34 % (Popruk et al., 2021) (Tab. 1). Ve Španělsku byla k detekci *Blastocystis* sp. použita mikroskopická diagnostika, pomocí které bylo odhaleno 17 % pozitivních vzorků (724/4174) (Hidalgo et al., 2019). V Belgii byla pomocí konvenční PCR ve zdravé populaci zjištěna prevalence 30 % (186/616) (Tito et al., 2019). Autoři další studie provedené u asymptomatických lidí v Irsku odhalili s využitím konvenční PCR prevalenci 56 % (59/105) (Scanlan et al., 2014). Ve Francii byly provedeny dvě studie, přičemž v obou byla pro detekci *Blastocystis* sp. zvolena molekulární diagnostika real-time PCR. Výsledné prevalence byly dost podobné, a to 14 % (27/186) (Poirier et al., 2011) a 18 % (143/788) (El Safadi et al., 2016).

V České republice byly provedeny pouze dvě studie. První z nich se zabývala prevalencí a diverzitou subtypů *Blastocystis* sp. v souboru zdravých dobrovolníků a pomocí dvou diagnostických přístupů konvenční PCR a xenické *in vitro* kultivace detekovala prevalenci 24 % (71/288) (Lhotská et al., 2020). Druhá studie porovnávala prevalenci a souvislost mezi *Blastocystis* sp. a bakterií u dětí ve věkové kategorii 8–14 let, které pocházely z šesti různých zemí. K detekci byla použita metoda real-time PCR a výsledná prevalence byla 36 % (88/244) (Cinek et al., 2021).

Tab. 1: Celková prevalence *Blastocystis* sp. u lidí dle geografické oblasti (Popruk et al., 2021).

Geografická oblast	Prevalence %
Afrika	41 %
Amerika	44 %
Austrálie a Oceánie	52 %
Evropa	34 %
Asie	22 %

1.3 Genetická diverzita

Blastocystis sp. byl poprvé popsán na počátku 20. století (Alexeieff, 1911). Druhé jméno tohoto prvka se vztahovalo k hostiteli, ze kterého byl izolován (např. *Blastocystis hominis* u lidí či *Blastocystis ratti* u krys) (Noël et al., 2005). Až později bylo zjištěno, že rod *Blastocystis* vykazuje značnou genetickou diverzitu a že se může vyskytovat i u řady dalších hostitelů, např. savců, ptáků, obojživelníků, ryb, plazů a v menší míře i u hmyzu (Clark et al., 2013; Stensvold a Clark, 2020). Na základě fylogenetických studií bylo navrženo jednotné označení *Blastocystis* sp. (Stensvold et al., 2007b). Zároveň se zjistilo, že hostitelská specificita koreluje se sekvenční variabilitou genu malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA). Na základě těchto variant je rod *Blastocystis* klasifikován do velkého počtu subtypů (ST) (Noël et al., 2005). V rámci každého subtypu lze navíc pozorovat různé varianty alel, tzv. intra-subtypovou variabilitu (Stensvold et al., 2012a; Lhotská et al., 2020; Alinaghizade et al., 2017).

U savců (včetně člověka) a ptáků bylo dosud identifikováno celkem 22 subtypů (ST1–17, ST21 a ST23–26) (Stensvold a Clark, 2020) a dá se očekávat, že budou v budoucnu popsány další subtypy (Jiménez et al., 2019; Maloney et al., 2019; Stensvold a Clark, 2020). Předpoklad pro zavedení nového subtypu je odlišnost jeho sekvence SSU rDNA ve 4 % nebo více od již existujících subtypů. Subtypy ST18–ST20 a ST22 byly z klasifikace vyňaty z důvodu, že se ve skutečnosti jedná o tzv. molekulární chiméry (Stensvold a Clark, 2020). Tyto chiméry vznikají v důsledku dvou odlišných subtypů přítomných ve střevě hostitele a jeho vzorku a následně vlivem neúplné amplifikace DNA při molekulární PCR diagnostice. V průběhu PCR cyklu a fáze denaturace vzniká jedno-vláknový řetězec DNA, který se v další fázi může připojit k jinému jedno-vláknovému řetězci, avšak z odlišného subtypu. Výsledkem tohoto procesu je pak PCR produkt, který kombinuje sekvence ze dvou různých subtypů.

1.3.1 Diverzita subtypů *Blastocystis* sp. u člověka

U lidí rozeznáváme zatím celkem deset subtypů (ST1–ST9 a ST12). Nejčastějším nálezem (až v 95 %) jsou subtypy ST1–ST4, naopak subtypy ST5–ST9 a ST12 jsou v epidemiologických studiích zastoupeny výrazně méně (Alfellani et al., 2013a; Ramírez et al., 2016, 2017). Tyto subtypy (ST5–ST9 a ST12) byly primárně detekovány u domestikovaných i volně žijících zvířat (Alfellani et al., 2013a), a proto autoři různých epidemiologických studií předpokládají, že tyto u člověka méně časté subtypy by mohly být zoonotického původu (Yan et al., 2007; Greige et al., 2018; Pintong et al., 2018). Například subtyp ST5 je častý u kopytníků,

ST6 a ST7 u ptáků a ST8 u nehumánních primátů. Dokladem možného zoonotického přenosu mohou být studie ze zoologických zahrad v Austrálii a Velké Británii, kde byl zaznamenán subtyp ST8 u nehumánních primátů a jejich ošetřovatelů (Parkar et al., 2010; Stensvold et al., 2009). Podobně také subtyp ST5, typický pro prasata, který byl detekován u chovatelů prasat v Austrálii (Wang et al., 2014). Výjimkou se zdá být subtyp ST9, který dosud nebyl nalezen, kromě člověka, v žádném jiném hostiteli (Stensvold a Clark, 2016a).

1.3.2 Geografická distribuce subtypů

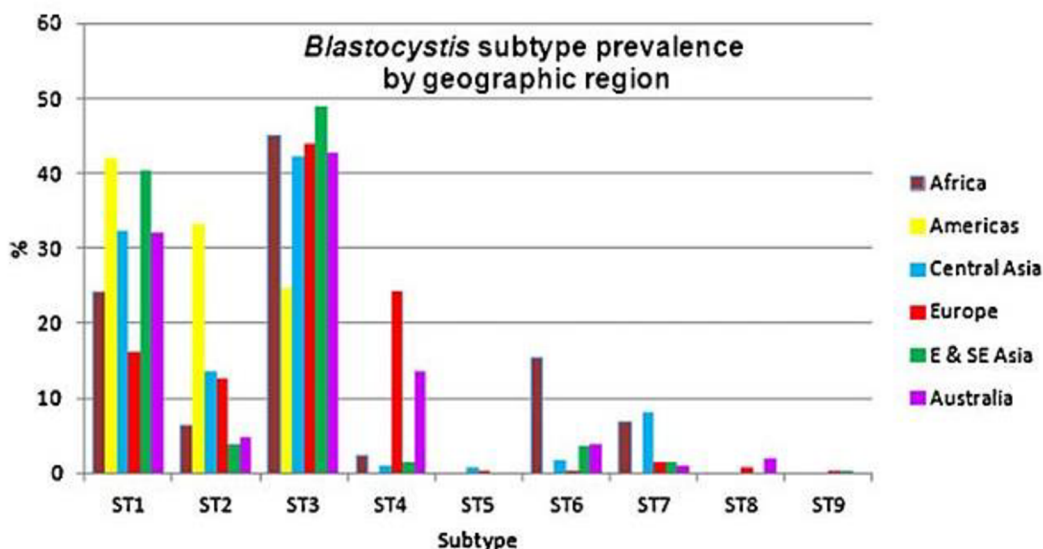
Distribuce subtypů je odlišná napříč kontinenty a také státy (Obr. 2). Například v Evropě jsou nejčastěji detekovány subtypy ST1–ST4 (Forsell et al., 2012; Bart et al., 2013; Scanlan et al., 2014; El Safadi et al., 2016; Mattiuci et al., 2016). V České republice ve studii Lhotská et al. (2020) byl nejčastějším subtypem ST3, poté následoval subtyp ST1, ST2 a ST4. Detekovány byly také méně časté subtypy spojované se zoonotickým původem, konkrétně ST5–ST8. Podobná diverzita subtypů byla pozorována také v Polsku ve studii Rudzińska et al. (2019), nicméně subtyp ST4 zde nebyl vůbec detekován. Oproti tomu v Itálii byl subtyp ST4 druhým nejpočetnějším po subtypu ST3 (Mattiuci et al., 2016).

Zatímco subtyp ST4 je běžný v Evropě, v oblasti Jižní Ameriky, Středního východu a Severní Afriky je jeho výskyt vzácný (Alfellani et al., 2013b; Ramírez et al., 2016; Jiménez et al., 2019; Clark et al., 2013). V Severní a Jižní Americe byla sledována diverzita subtypů v devíti různých zemích, konkrétně v USA, Mexiku, Kolumbii, Brazílii, Ekvádoru, Peru, Bolívii, Argentině a Chile. Ve všech zemích zcela převažovaly subtypy ST1 a ST2. Poté následoval subtyp ST3 (Jiménez et al., 2019).

V Africe je častý výskyt subtypů ST1–ST3 (Souppart et al., 2010; El Safadi et al., 2014; Forsell et al., 2016; Abda et al., 2017; Dacal et al., 2018). Například v Tanzánii a Nigérii byl nejčastějším subtypem ST1, ST2 a poté ST3 (Forsell et al., 2016; Poulsen et al., 2016). Výjimkou jsou studie El-Badry et al. (2018) a El Deeb a Khodeer (2013) z Egypta, kde nebyl zjištěn subtyp ST2.

V asijské oblasti převládá subtyp ST3 (Li et al., 2007; Das et al., 2016; Nithyamathi et al., 2016; Gong et al., 2019; Qi et al., 2020). V Malajsii a na Filipínách byl navíc detekován subtyp ST4 (Belleza et al., 2016; Nithyamathi et al., 2016; Noradilah et al., 2017). V Thajsku byly zastoupeny též méně časté subtypy ST6 a ST7 (Jantermtor et al., 2013; Yowang et al., 2018).

Obr. 2: Diverzita subtypů *Blastocystis* sp. dle geografické oblasti (Alfellani et al., 2013b).



1.3.3 Směsné kolonizace subtypů *Blastocystis* sp.

V epidemiologických studiích se nejčastěji setkáváme s identifikací jednoho subtypu v hostiteli. Nicméně byl zaznamenán i výskyt více subtypů blastocyst v jednom hostiteli. Ty jsou nazývány jako „směsné kolonizace subtypů“ (Ramírez et al., 2017). Výskyt takových směsných kolonizací se celosvětově pohybuje v průměru okolo 6 % (Alfellani et al., 2013b).

Například v Evropě bylo v rámci pěti studií identifikováno 97 případů směsných kolonizací (Piubelli et al., 2019; Scanlan et al., 2015; El Safadi et al., 2016; Rudzińska et al., 2019; van Hattem et al., 2019). Z toho velmi vysoká frekvence směsných kolonizací byla zaznamenána v italské studii Piubelli et al. (2019), a to 36 % (80/221). Ve studii byli zahrnuti lidé pocházející z různých kontinentů, konkrétně z Afriky, Jižní Ameriky, Asie a Evropy (především Italové). Nejvíce byly zastoupeny směsné kolonizace subtypů ST1 a ST3, a to téměř ve všech analyzovaných geografických oblastech. V menší míře byla pozorována kolonizace tří subtypů, a to kombinace ST1+ST2+ST3 a ST1+ST3+ST4.

Směsné kolonizace subtypů jsou v molekulárních studiích často přehlíženy a jejich výskyt je pravděpodobně daleko častější než se předpokládalo (Scanlan et al., 2015). Obecně se má za to, že přesná diagnostika směsných kolonizací je obtížná kvůli omezení používaných metod, které přednostně amplifikují převládající subtypy přítomné ve vzorku (Maloney et al., 2019).

1.4 Klinický význam *Blastocystis* sp.

Vliv střevního prvoka *Blastocystis* sp. na zdraví člověka je stále velmi diskutované téma a zatím na něj neexistuje jednoznačná odpověď (Andersen a Stensvold, 2016). Důvodem je především fakt, že se tento prvek vyskytuje jak u zdravých lidí (tj. bez střevních potíží), tak i u pacientů s nespécifickými gastrointestinálními symptomy (Scanlan a Stensvold, 2013; Wawrzyniak et al., 2013; Roberts et al., 2014; Andersen a Stensvold, 2016; Stensvold a van der Giezen, 2018).

V případech klinické manifestace přítomnosti blastocysty se v minulosti za hlavní příznaky považovaly průjem, bolest břicha, nadýmání nebo nevolnost (Roberts et al., 2014; Tan, 2008). Kromě toho byly také popsány některé kožní poruchy jako například kopřivka (Hameed et al., 2011; Casero et al., 2015). Dříve byl prvek *Blastocystis* sp. označován výhradně jako patogenní organismus a předpokládalo se, že přispívá k rozvoji zánětlivého onemocnění střev (*Inflammatory Bowel Disease* - IBD) (Dogruman-Al et al., 2009) a syndromu dráždivého tračníku (*Inflammatory Bowel Syndrome* - IBS) (Poirier et al., 2012; Rostami et al., 2017). Definitivní příčinná souvislost mezi uvedeným onemocněním a tímto prvokem však nebyla dosud zjištěna a jeho patogenní působení zůstává předmětem diskuzí (Yakoob et al., 2010; Poirier et al., 2012; Lukeš et al., 2015; Khademvatan et al., 2017; Jiménez et al., 2019).

Potenciální patogenní mechanismus prvoka *Blastocystis* sp. pravděpodobně spočívá v poškození střevních epiteliálních buněk nebo degradaci proteinů *tigh junctions* (okludinu a ZO1) (Puthia et al., 2006; Mirza et al., 2012). Následkem těchto procesů se může zvýšit permeabilita střeva (Dagci et al., 2002). Kolonizace střeva blastocystami je také spojena s imunitní odpovědí hostitele. Byla zaznamenána indukce některých cytokinů IL-8, GM-CSF, IL-1 β , IL-6 a faktor nádorové nekrózy (TNF- α) (Long et al., 2001; Lim et al., 2014).

Autoři několika studií se navíc domnívají, že by mohla existovat určitá asociace mezi některými subtypy blastocyst a klinickým projevem gastrointestinálních příznaků u člověka, tzn. že by některé subtypy měly patogenní působení na hostitelský organismus. Jako takový příklad může sloužit subtyp ST7, který je s patogenními projevy spojován (Mirza et al., 2011; Wu et al., 2014; Ajjampur et al., 2016; Yason et al., 2019). Genomová analýza odhalila, že kóduje faktory virulence jako jsou hydrolázy nebo cysteinové proteázy, které narušují epiteliální buňky střeva (Denoëud et al., 2011). Nicméně většina dalších studií neprokázala žádnou souvislost ostatních subtypů s gastrointestinálním onemocněním (Ramírez et al., 2016; Alinaghizade et al., 2017; Dogan et al., 2017; Mardani Katakaki et al., 2019; Rudzińska et al., 2019). V posledních letech se naopak ukazuje, že je prvek *Blastocystis* sp. detekován daleko častěji u zdravých jedinců (tj. bez střevních potíží) než u pacientů se zánětlivým onemocněním

střev (Scanlan et al., 2014; Krogsgaard et al., 2015; Rossen et al., 2015; Nieves-Ramirez et al., 2018; Stensvold a van der Giezen, 2018; Lhotská et al., 2020; Mardani Katakaki et al., 2019; Tito et al., 2019). Tyto výsledky podporují hypotézu, že jsou blastocysty zřejmě běžnou součástí gastrointestinální mikroflóry a měly by být považovány spíše za komenzála než patogena (Scanlan a Stensvold, 2013; Scanlan et al., 2014).

Rozdílné názory ohledně vlivu *Blastocystis* sp. na lidské zdraví jsou založeny především na tom, že dřívější studie byly prováděny u pacientů, kteří trpěli střevními příznaky, a proto u nich byl tento prvok detekován častěji. Některé recentní studie dokonce naznačují, že blastocysty mohou být indikátorem zdravého střevního traktu i celkového zdraví (Andersen et al., 2016; Chabé et al., 2017). Příznivé účinky prvoka *Blastocystis* sp. na střevo hostitele byly zaznamenány také ve studii naší laboratoře (Billy et al., 2021). Výsledky ukázaly, že u potkanů s indukovanou kolitidou a dlouhodobou kolonizací subtypu ST3 došlo k mnohem rychlejšímu zmírnění střevního zánětu oproti kontrolní skupině.

1.5 *Blastocystis* sp. ve střevním mikrobiomu

Střevní mikrobiom je komplex bakterií, hub, virů a jednobuněčných eukaryot (Cani, 2018). Má zásadní vliv na lidské zdraví, hraje důležitou roli v metabolismu hostitele a regulaci imunitního systému (Michaudel a Sokol, 2020). Homeostáza ve střevě je udržována prostřednictvím interakcí s těmito mikroorganismy. Porucha symbiotického vztahu mezi střevní mikrobiotou a hostitelem vede k dysbióze (Das a Nair, 2019), která může zásadně přispět k rozvoji gastrointestinálních onemocnění jako např. IBD a IBS (Glassner et al., 2020; Menees a Chey, 2018; Wang et al., 2019; Aden a Reindl, 2019; Nishida et al., 2017).

Složení střevního mikrobiomu úzce souvisí s kolonizací střevních prvoků. V posledních letech je velmi intenzivně zkoumán právě vztah mezi *Blastocystis* sp. a střevními bakteriemi (Audebert et al., 2016; Beghini et al., 2017; Forsell et al., 2017; Nieves-Ramirez et al., 2018; Nagel et al., 2016; Andersen et al., 2016; Billy et al., 2021). Blastocysty jsou schopny přímo i nepřímo ovlivňovat svého hostitele působením na střevní mikrobiom (Deng et al., 2021). To znamená, že ovlivňují jak diverzitu, tak i kompozici bakteriální střevní mikroflóry (Billy et al., 2021; Even et al., 2021; Gabrielli et al., 2020; Krogsgaard et al., 2018; Nieves-Ramirez et al., 2018). Vzhledem k vysoké genetické diverzitě *Blastocystis* sp., intra-subtypové variabilitě a odlišným modulačním účinkům nebylo zatím jednoznačně prokázáno, zda jsou tyto účinky pro hostitele prospěšné nebo škodlivé (Deng et al., 2021). Některé studie spojují

přítomnost prvoka *Blastocystis* sp. s optimální diverzitou střevního mikrobiomu, zatímco jiné s jeho dysbiózou a gastrointestinálními chorobami (Scanlan a Stensvold, 2013).

1.5.1 Prospěšný vliv *Blastocystis* sp. na střevní mikrobiom

Řada studií zabývajících se spojením mezi *Blastocystis* sp. a střevním mikrobiomem prokázala v jeho přítomnosti vyšší diverzitu obligátně anaerobních skupin bakterií, jejichž výskyt je spojován se zdravým střevem (Audebert et al., 2016; Beghini et al., 2017; Forsell et al., 2017; Nieves-Ramirez et al., 2018; Tito et al., 2019; Castañeda et al., 2020; Defaye et al., 2020).

Například ve studii Andersen et al. (2015) bylo za použití metagenomického přístupu zjištěno, že u lidí s *Blastocystis* sp. dominují enterotypy *Prevotella* a *Ruminococcus*, všeobecně asociované se zdravím a s nízkým rizikem zánětlivých onemocnění (Loh a Blaut, 2012). Naopak u hostitelů *Blastocystis* sp. je méně častý enterotyp *Bacteroides*, asociovaný s nižší diverzitou bakterií ve střevě (Costea et al., 2018), kolorektálním karcinomem (Sobhani et al., 2011; Ou et al., 2013), celiakií (De Palma et al., 2010) a zánětlivým onemocněním gastrointestinálního traktu (Le Chatelier et al., 2013). Stejný trend byl pozorován i ve studii Tito et al. (2019).

Autoři studie Audebert et al. (2016) u lidí s *Blastocystis* sp. našli vyšší bakteriální diverzitu třídy *Clostridia*. Naopak čeleď *Enterobacteriaceae*, zahrnující gramnegativní bakterie typicky zjišťované u pacientů s IBD, převažovala u jedinců bez *Blastocystis* sp. Vztah mezi *Blastocystis* sp. a střevní bakteriální mikroflórou sledovali také autoři studie Kodio et al. (2019). Ti zjistili, že u jedinců s *Blastocystis* sp. byl nárůst bakteriálních rodů *Faecalibacterium prausnitzii* a *Roseburia*. Tyto rody se podílejí na produkci butyrátu, který je jedním z nejdůležitějších metabolitů zajišťujících homeostázu tlustého střeva a hlavní zdroj energie pro jeho epitelální buňky (Tan et al., 2014).

Deng a Tan (2022) zkoumali interakci mezi střevními bakteriemi a subtypem ST4. Konkrétně se jednalo o sedm druhů střevních bakterií, a to *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium longum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* a *Lactobacillus brevis*. Tyto bakteriální druhy byly posléze *in vitro* kultivovány společně se subtypem ST4. Výsledky ukázaly, že *Blastocystis* ST4 má příznivý vliv na většinu těchto bakterií. Výjimkou byl pouze *B. vulgatus*, jehož růst byl v přítomnosti *Blastocystis* ST4 výrazně inhibován. Jde o gramnegativní obligátně anaerobní bakterii, která může přispívat ke zhoršení kolitidy (Bloom et al., 2011). Zároveň bylo zjištěno, že subtyp ST4 hrál určitou roli v ochraně střevní epitelální bariéry před poškozením *B. vulgatus* (Deng

a Tan, 2022). V naší recentní experimentální studii jsme zjistili, že dlouhodobá kolonizace *Blastocystis* ST3 není spojena se zvýšením střevní bakteriální diverzity, ale přítomnost těchto prvků může fungovat jako „stabilizátor“ střevního ekosystému a vede k rychlejšímu zotavení po indukci kolitidy (Billy et al., 2021).

1.5.2 Nepříznivý vliv *Blastocystis* sp. na střevní mikrobiom

Autoři některých studií jsou naopak přesvědčeni, že přítomnost *Blastocystis* sp. může mít nepříznivý vliv na složení střevního mikrobiomu (Yason et al., 2019; Nourrisson et al., 2014). *In vitro* studie na myším modelu Yason et al. (2019) v souvislosti s izolátem ST7 uvádí, že kolonizace *Blastocystis* sp. může způsobovat změny v bakteriálních populacích, které následně vedou k nerovnováze střevní mikroflóry. Ve studii je konkrétně zmiňována redukce bakteriálních populací *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Autoři jiné studie Nourrisson et al. (2014) sledovali možný dopad *Blastocystis* sp. na bakteriální populaci u skupiny pacientů s IBS typu C (IBS pacienti trpící zácpou) a u kontrolní skupiny (lidé bez jakékoli gastrointestinální poruchy). Výsledky studie naznačují, že u pacientů s IBS-C došlo k významnému poklesu *Bifidobacterium* sp. Je zajímavé, že u kontrolní skupiny byla snížena populace obligátně anaerobních bakterií druhu *Faecalibacterium prausnitzii*.

1.6 Diagnostika

Pro detekci prvoka *Blastocystis* sp. byla vyvinuta již řada diagnostických přístupů (Skotarczak, 2018). Jedny z dříve používaných metod jsou například mikroskopické vyšetření nativních vzorků stolice nebo *in vitro* xenická kultivace (Stenzel a Boreham, 1996; Stensvold et al., 2007a; Tan, 2008). Obě metody však mají své nedostatky. Vzhledem k tomu, že tento prvek má více morfologických forem, může být jejich mikroskopické odlišení značně obtížné, obzvláště pak stádium cysty (Stenzel a Boreham, 1996). Přesto jsou tyto metody rozšířené a v některých laboratořích stále používanou metodou (Asfaram et al., 2019; Hidalgo et al., 2019; Hussain et al., 2019). Kultivace blastocyst je zase časově náročná a výsledky jsou k dispozici nejdříve za 48 až 72 hodin (Roberts et al., 2011).

Údaje o prevalenci *Blastocystis* sp. mohou být mnohdy zkreslené v důsledku nižší senzitivity výše popsanych technik. Z tohoto důvodu došlo k širšímu používání molekulárních metod založených na polymerázové řetězové reakci (Abe et al., 2003a, 2003b; Yoshikawa et al., 2004b; Scicluna et al., 2006; Stensvold et al., 2006; Stensvold et al., 2007a; Santín et al., 2011; Poirier et al., 2011).

1.6.1 Molekulární metody

V současné době je laboratorní diagnostika *Blastocystis* sp. založena převážně na molekulárních metodách jako je konvenční PCR (cPCR) nebo real-time PCR (qPCR). Nově používaným přístupem je také *Next-generation* sekvenování (Maloney et al., 2019; Rojas-Velázquez et al., 2019; Cinek et al., 2021). Obecně řečeno molekulární metody patří mezi nejspolehlivější diagnostické přístupy pro detekci blastocyst především díky vysoké senzitivitě a také specifitě (Skotarczak, 2018; Roberts et al., 2011). Velkým přínosem je navíc možnost identifikace jednotlivých subtypů díky sekvenční analýze ampliconů (Stensvold et al., 2012b).

1.6.1.1 Konvenční PCR (cPCR)

V rámci metod založených na cPCR jsou nejčastěji využívány dva přístupy (Stensvold, 2013). První přístup zahrnuje STS-primery komplementární k *sequence-tagged-sites* (STS), což jsou krátké sekvence DNA specifické pro jednotlivé subtypy blastocyst (Yoshikawa et al., 2004b). Pro každý vzorek je třeba udělat několik samostatných PCR reakcí dle dostupných párů STS-primerů, přičemž v každé reakci je možné identifikovat daný subtyp. Není tedy nutné sekvenování PCR ampliconů. Zároveň je možné touto metodou odhalit i směsné kolonizace subtypů. Velkou nevýhodou STS-primerů je to, že jsou dosud cíleny pouze na prvních sedm subtypů, tj. ST1–ST7 (Skotarczak, 2018; Rudzińska et al., 2020).

Druhý přístup cPCR je využíván v převážné většině epidemiologických studií a spočívá v amplifikaci části genu kódujícího podjednotku SSU rDNA, která je také známa jako *barcode* region. *Barcode* region je vysoce variabilní oblast SSU rDNA o velikosti 600 bp, která je amplifikována pomocí specifických primerů označovaných RD5 a BhRDr (Sciicluna et al., 2006). Výhodou tohoto přístupu je, že stačí provést pouze jednu amplifikační reakci pro každý vzorek. PCR produkt je následně osekvenován (Sangerovo sekvenování) a výsledné sekvence jsou otypovány do subtypů ve specifické barkódovací platformě pro *Blastocystis* sp. (<http://pubmlst.org/blastocystis/>) (Stensvold a Clark, 2016b). Na rozdíl od STS-metody tento přístup umožňuje detekci všech dosud identifikovaných a případně i nových subtypů *Blastocystis* sp. Nicméně není ideální pro detekci směsných kolonizací subtypů (Skotarczak, 2018; Rudzińska et al., 2020). V takovém případě je potřeba jej doplnit metodou klonování (Lhotská et al., 2020).

1.6.1.2 Real-time PCR (qPCR)

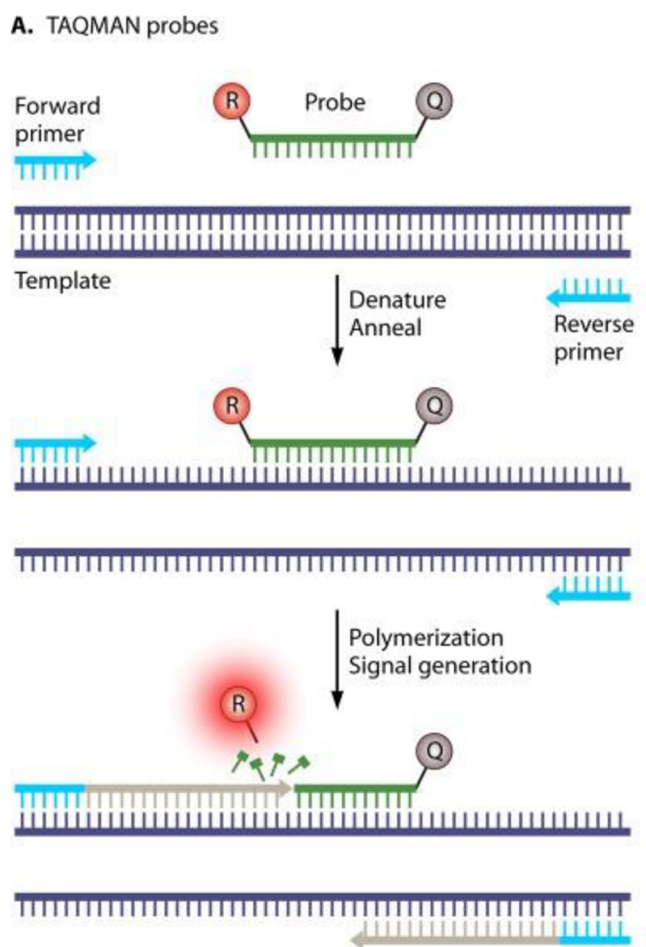
Na rozdíl od cPCR monitoruje real-time (qPCR) nárůst množství ampliconu v reálném čase (Klein, 2002). Jednoduchou analýzou Ct hodnot (threshold cycle) lze navíc kvantifikovat množství DNA přítomné v analyzovaném vzorku. Hodnota Ct odkazuje na konkrétní amplifikační cyklus, při kterém úroveň fluorescenčního signálu převyšuje fluorescenci pozadí a přímo tedy koreluje s množstvím DNA ve vzorku. Čím je Ct hodnota nižší, tím větší množství templátové DNA je přítomno v reakci a naopak. Tyto údaje jsou přínosné především v epidemiologických studiích, protože by mohly přispět k objasnění role *Blastocystis* sp. ve střevním ekosystému při porovnání intenzit kolonizací mezi IBD/IBS pacienty a zdravými jedinci (Verweij a Stensvold, 2014).

Úplně první qPCR protokol pro *Blastocystis* sp. byl uveden v roce 2008, nicméně měl určité nedostatky. Například pomocí tohoto protokolu byla umožněna amplifikace DNA blastocyst pouze subtypů ST1, ST3 a ST4 (Jones et al., 2008). Z tohoto důvodu byly posléze vyvinuty další dva qPCR protokoly.

Druhý qPCR protokol využívá systém *SYBR Green* a popsal ho ve své studii Poirier et al. (2011). Tento protokol je specifický pro rod *Blastocystis* sp. a cílí na gen malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA). Nevýhodou tohoto protokolu je dlouhý PCR amplicon (339 bp), který může snižovat citlivost testu. Zároveň má i nižší specifitu, tj. 95 %.

Další qPCR protokol, který využívá systém *TaqMan* sondy, byl optimalizován ve studii Stensvold et al. (2012b). Tento protokol zavádí specifické primery FWD F5 a R F2, které amplifikují krátký fragment SSU rDNA o velikosti 118 bp. Vizualizace fragmentů je umožněna díky oligonukleotidové hydrolyzační *TaqMan* sondě, která má na 5'konci navázanou fluorescenční molekulu a na 3'konci tzv. *quencher* (zhášeč). Princip fungování sondy je založen na exonukleázové aktivitě 5' → 3' *Taq* DNA polymerázy, která štěpí *TaqMan* sondu během elongační fáze amplifikace. V tomto procesu je fluorescenční molekula oddělena od zhášeče. To vede k nárůstu fluorescenčního signálu, který lze měřit v každém cyklu amplifikace (Verweij a Stensvold, 2014). Princip *TaqMan* sondy znázorňuje obrázek (Obr. 3). Tento diagnostický protokol vykazuje 100% specifitu a vysokou senzitivitu a umožňuje identifikaci všech dosud identifikovaných subtypů u lidí (Stensvold et al., 2012b).

Obr. 3: Princip *TaqMan* sondy (Verweij a Stensvold, 2014).



1.6.1.3 *Next-generation sequencing* (NGS)

Next-generation sekvenování (NGS) je vysoce efektivní nástroj vhodný pro charakterizaci diverzity a kompozice mikrobiálních společenstev (Boers et al., 2019). Tato metoda generuje obrovské množství sekvencí z jednoho vzorku, což umožňuje rychlou a vysoce citlivou analýzu na úrovni populace. V současné době se NGS začala používat i pro určení diverzity subtypů *Blastocystis* sp. Na rozdíl od klasického Sangerova sekvenování dokáže daleko přesněji identifikovat směsné kolonizace subtypů ve vzorku. Zároveň umožňuje spolehlivě určit intra-subtypovou variabilitu v rámci hostitele (Maloney et al., 2019; Rojas-Velázquez et al., 2019; Higuera et al., 2021; Cinek et al., 2021).

Autoři studie Maloney et al. (2019) optimalizovali NGS protokol pro detekci směsných kolonizací *Blastocystis* sp. ve vzorcích stolice. Před samotným NGS je nutné pomocí molekulárních metod amplifikovat oblast genu SSU rRNA. PCR amplifikace SSU rDNA byla provedena s využitím primerů ILMN_Blast505_532F a ILMN_Blast998_1017R.

Tyto primery byly odvozeny ze studie Santín et al. (2011) a pro účely *Next-generation* sekvenování modifikovány připojením adaptorových sekvencí k 5'konci. Celý proces zahrnuje tři kroky – přípravu knihovny, amplifikaci a sekvenování. V prvním kroku je DNA naštěpena na různě dlouhé fragmenty a na jejich konce je navázána velmi krátká molekula DNA o přesně dané sekvenci zvaná adaptor. Umožňuje amplifikaci fragmentů knihovny a jejich fixaci k pevnému povrchu (Goodwin et al., 2016; Kolísko, 2017; Qin, 2019).

Jednotlivé fragmenty jsou amplifikovány pomocí emulzní PCR nebo *bridge* PCR, čímž vznikne skupina identických molekul DNA zvaná klastr. K fragmentům DNA jsou přiřazovány jednotlivé nukleotidy na základě komplementarity bází, přičemž každá báze je označena jinou fluorescenční barvou. Na základě rozdílné fluorescence lze identifikovat přesnou sekvenci (Goodwin et al., 2016; Kolísko, 2017; Qin, 2019).

Získané sekvence jsou poté analyzovány s využitím bioinformatických přístupů s využitím specializovaných softwarů (Boers et al., 2019; Qin, 2019). V případě *Blastocystis* sp. je identifikace založena na podobnosti s referenčními sekvencemi genu SSU rRNA dostupnými ve veřejných databázích, kde jsou zahrnuty všechny již identifikované subtypy (Cinek et al., 2021; Higuera et al., 2021; Maloney et al., 2019; Rojas-Velázquez et al., 2019).

V novějších studiích byla použita metoda založená na technologii *Oxford Nanopore MinION*. Tato metoda umožňuje generovat kompletní sekvence SSU rDNA (Maloney et al., 2020; Maloney a Santin, 2021).

2 Cíle práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zavedení a optimalizace qPCR protokolu pro diagnostiku střevního prvoka *Blastocystis* sp. v souboru vzorků od zdravých lidí. Následně porovnat citlivost qPCR diagnostiky s výsledky konvenční PCR získanými v předchozí studii Lhotská et al. (2020).

Dílčí cíle byly následující:

- zjistit celkovou prevalenci *Blastocystis* sp. pomocí qPCR v souboru vzorků lidí;
- zjistit intenzity kolonizací *Blastocystis* sp. u pozitivních jedinců na základě kvantifikační křivky s využitím qPCR;
- zjistit diverzitu subtypů *Blastocystis* sp. na základě „*Next-generation*“ sekvenování a následně porovnat s výsledky ze Sangerova sekvenování získanými v předchozí studii Lhotská et al. (2020).

3 Materiál a metodika

Pro účely této diplomové práce byla použita DNA ze vzorků lidské stolice ($n = 288$) získaná již v předchozí epidemiologické studii zaměřené na prevalenci a diverzitu *Blastocystis* sp. v populaci zdravých jedinců v České republice (Lhotská et al., 2020). Získaná data byla anonymizována a zpracována dle zákona č. 101/2000 Sb. O ochraně osobních údajů a dalších souvisejících předpisů. Tato studie byla posouzena jako eticky přípustná a odpovídající rozsahu statutu Etické komise Biologického centra AV ČR v.v.i. v Českých Budějovicích (číslo rozhodnutí: 1/2017).

3.1 Molekulární detekce

V této práci byla pro detekci *Blastocystis* sp. zvolena molekulární diagnostika real-time PCR (qPCR). Lhotská et al. (2020) použila pro detekci *Blastocystis* sp. konvenční PCR (cPCR). Přestože je cPCR běžně používanou metodou ve většině epidemiologických studiích zaměřených na *Blastocystis* sp., nedokáže spolehlivě detekovat velmi slabé intenzity kolonizace. Kromě toho cPCR neposkytuje na rozdíl od qPCR kvantitativní informaci o intenzitě kolonizace. Z těchto důvodů jsme zavedli diagnostický qPCR protokol a následně porovnali výsledky obou molekulárních metod.

3.1.1 qPCR diagnostika

Veškeré vzorky DNA byly otestovány pomocí qPCR diagnostiky. Základ pro diagnostický qPCR protokol byl převzat ze studie Stensvold et al. (2012b) a následně optimalizován pro podmínky naší laboratoře. V našich podmínkách byla použita polymeráza Master Mix 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus ROX (Solis BioDyne, Estonsko) a modifikované množství primerů a *TaqMan* sondy na jednu qPCR reakci.

Specifické primery Blasto FWD F5 a R F2 (Generi Biotech, Hradec Králové) jsou cílené na amplifikaci fragmentu malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA) o velikosti 118 bp. Pro následnou vizualizaci byla použita fluoresceinem značená *TaqMan* sonda. Použité sondy a primery jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2).

Kromě toho byly také upraveny reakční podmínky, konkrétně počet cyklů amplifikace – počáteční denaturace 95 °C/10 min a 37 × (95 °C/15 s, 60 °C/30 s, 72 °C/30 s). Celkový objem každé qPCR reakce byl 20 µl a obsahovala 1 µl od každého primeru (10nmol), 1 µl *TaqMan* sondy (ředěné v poměru 1:20), 4 µl Master Mix polymerázy, 8 µl MiliQ vody a 5 µl extrahované DNA. Součástí každého „runu“ byla vždy negativní kontrola (DNA nahrazena

MiliQ vodou) a pozitivní kontrola (DNA z definované *in vitro* xenické kultury *Blastocystis* sp.). Vzorke byly otestovány s využitím přístroje LightCycler LC 480 I (Roche, Basilej, Švýcarsko) a 96-jamkových desek (RT-PL96-LC480).

Tab. 2: Sondy a primery použité pro qPCR diagnostiku *Blastocystis* sp. (převzato ze studie Stensvold et al., 2012b).

Primery a sonda	Sekvence
Blasto FWD F5	5'-GGTCCGGTGAACACTTTGGATTT-3'
Blasto R F2	5'-CCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCA-3'
Blastocystis probe	FAM-TCGTGTAAATCTTACCATTAGAGGA-MGBNFQ

3.1.2 Optimalizace kvantifikační křivky

Intenzita kolonizací *Blastocystis* sp. v pozitivních vzorcích byla posouzena pomocí kvantifikační křivky. Tato křivka byla definována na základě ředící řady buněk získaných z *in vitro* kultury *Blastocystis* sp. a nastavena v řádovém rozsahu 10^0 až 10^5 buněk na jednu qPCR reakci. Stupeň kolonizace jsme definovali následovně: 10^0 – 10^1 nízká intenzita kolonizace, 10^2 – 10^3 střední intenzita kolonizace, 10^4 – 10^5 vysoká intenzita kolonizace.

3.1.3 Kontrola vnitřní inhibice

U některých vzorků DNA, které jsou izolované ze stolice nebo trusu, může docházet k inhibování polymerázové aktivity při PCR diagnostice (Stensvold et al., 2012b). Abychom vyloučili zkreslení získaných výsledků případným působením PCR inhibitorů, přidali jsme ke vzorkům s negativním výsledkem cizorodou DNA, konkrétně DNA získanou z tkáně experimentálních potkanů. Otestovány byly pouze vzorky, ve kterých nebyla prokázána přítomnost *Blastocystis* sp. ani žádného jiného střevního prvoka, na jejichž výzkum se zaměřujeme v naší laboratoři (např. *Giardia intestinalis* a *Dientamoeba fragilis*) (n = 248). K izolaci DNA z tkáně potkana byl použit kit (High Pure PCR Template Preparation Kit for Genomic DNA, Roche) a tato izolovaná DNA byla posléze naředěna $10^9\times$. Zároveň jsme použili qPCR protokol pro analýzu B2M (komerční primery a *TaqMan* sonda používaná k detekci potkaního genu pro beta-2 mikroglobulin; Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Výsledný qPCR amplikon měl velikost 58 bp.

3.2 Statistické srovnání citlivosti dvou diagnostických přístupů

Rozdíl v citlivosti pro detekci *Blastocystis* sp. mezi dvěma diagnostickými přístupy qPCR a cPCR Lhotská et al. (2020) na stejném souboru vzorků byl vyhodnocen pomocí McNemarova testu s Yatesovou korekcí 0,5. Statistická analýza byla provedena s využitím softwaru SciStatCalc 2013 (<https://scistatcalc.blogspot.com/2013/11/mcnemars-test-calculator.html>).

3.3 Určení jednotlivých subtypů metodou *Next-generation* sekvenování

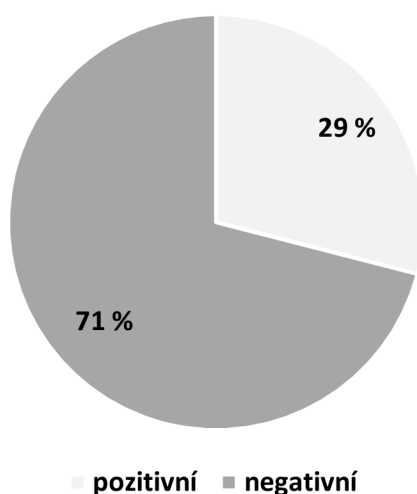
Pro určení jednotlivých subtypů a jejich směsných kolonizací byla využita analýza *Next-generation* sequencing (NGS) ve spolupráci s Pediatrickým oddělením 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a fakultní nemocnicí Motol (prof. MUDr. Ondřej Cinek Ph.D.). NGS protokol vycházel ze studie Maloney et al. (2019) a byl dále optimalizován dle studie Cinek et al. (2021).

4 Výsledky

4.1 Prevalence *Blastocystis* sp. na základě qPCR

V rámci této diplomové práce byl s využitím molekulární diagnostiky qPCR otestován soubor 288 vzorků DNA od zdravých lidí. Celková prevalence *Blastocystis* sp. byla 29 % (83/288) (Obr. 4). Výsledky této práce byly následně porovnány s výsledky cPCR použité v předchozí studii Lhotská et al. (2020) za účelem zjištění rozdílů v senzitivitě mezi oběma diagnostickými metodami.

Obr. 4: Prevalence *Blastocystis* sp. v souboru vzorků od zdravých lidí na základě qPCR.

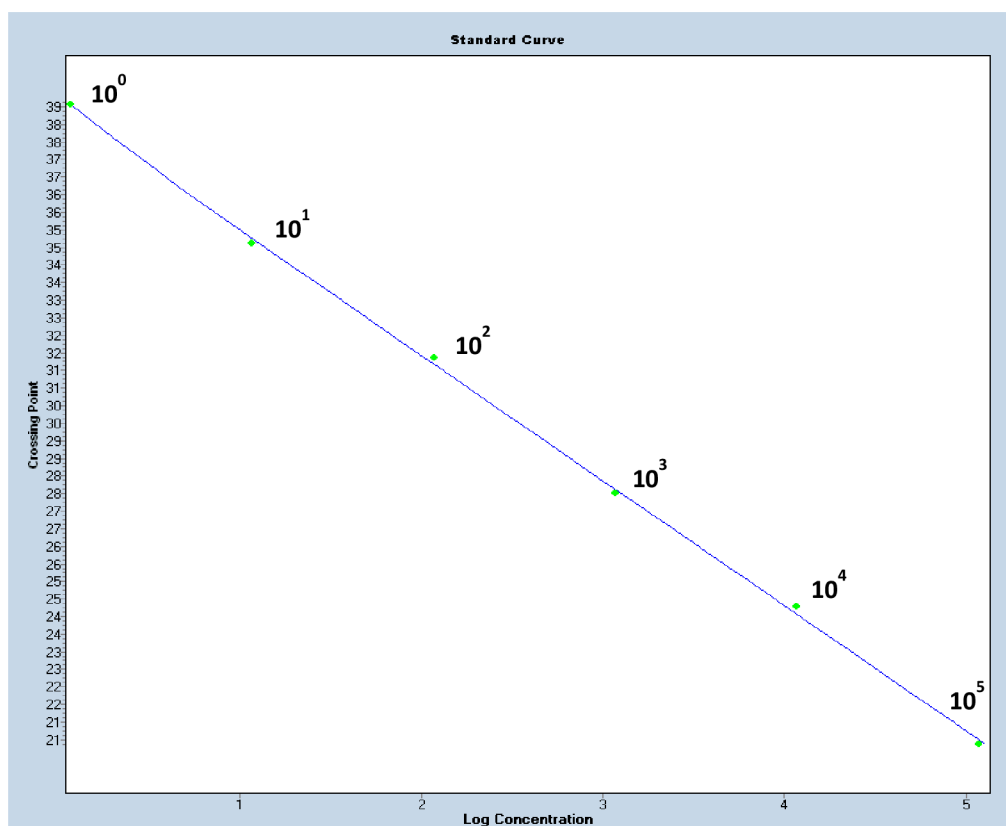


4.2 Vyhodnocení intenzity kolonizace

U vzorků, kde byla na základě qPCR diagnostiky potvrzena pozitivita *Blastocystis* sp. ($n = 83$), byla navíc vyhodnocena intenzita kolonizace s použitím kvantifikační křivky nastavené v rozsahu řádů 10^0 až 10^5 buněk na jednu qPCR reakci (Obr. 5).

U více než poloviny analyzovaných vzorků byla zaznamenána vysoká intenzita kolonizace, konkrétně v řádovém rozmezí 10^5 – 10^6 buněk na jednu qPCR reakci. Rozsah Ct hodnot odpovídal 15. až 20. cyklu amplifikace. Nízká intenzita kolonizace 10^1 – 10^2 buněk na jednu qPCR reakci byla zjištěna u 18 vzorků. Nejméně byly zastoupeny kolonizace v hodnotách řádů 10^3 – 10^4 buněk na jednu qPCR reakci. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3).

Obr. 5: Kvantifikační křivka pro vyhodnocení intenzity kolonizace v rozsahu řádů 10^0 až 10^5 buněk/1 qPCR reakci (program LightCycler480).



Tab. 3: Vyhodnocení intenzity kolonizace *Blastocystis* sp. pomocí kvantifikační křivky (v rozsahu řádů 10^0 až 10^5 buněk/1 qPCR reakci).

Stanovená intenzita kolonizace ¹	N vzorků /N pozitivních vzorků	Rozsah Ct hodnot
10^1 – 10^2	18/83	28–32
10^3 – 10^4	13/83	21–27
10^5 – 10^6	52/83	15–20

¹Počet buněk/1 qPCR reakci

4.3 Testování vnitřní inhibice

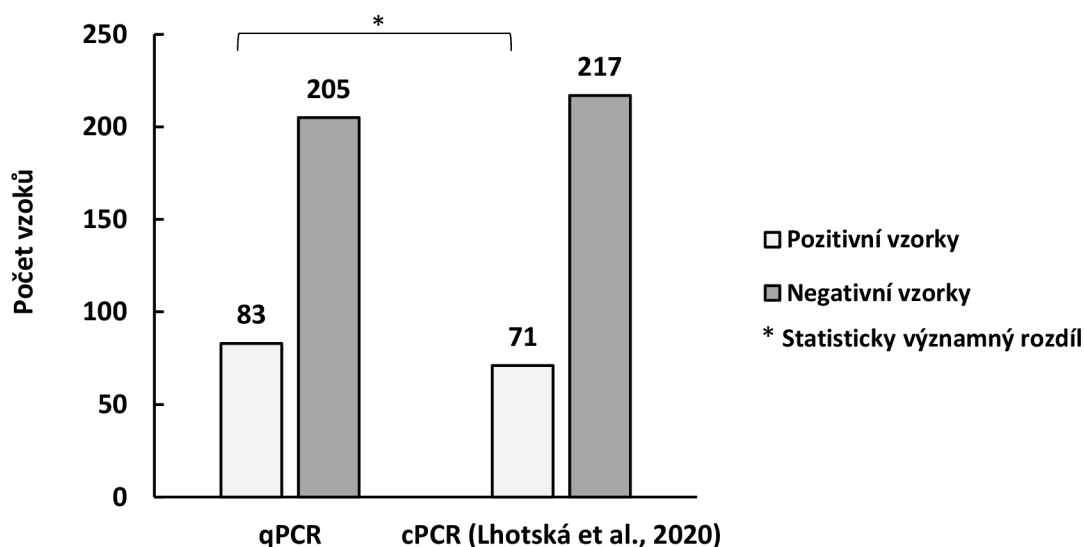
U vzorků, ve kterých nebyl detekován žádný střevní prvek ($n = 248$) byla provedena kontrola vnitřní inhibice. Na základě tohoto testu jsme u vzorků vyloučili jakékoli působení PCR inhibitorů.

4.4 Porovnání citlivosti dvou diagnostických metod qPCR a cPCR

Jedním z důležitých sledovaných aspektů bylo posouzení senzitivity mezi dvěma diagnostickými metodami, a to qPCR a cPCR. K porovnání metod byl použit soubor DNA vzorků ($n = 288$). Na základě molekulární diagnostiky qPCR byla zjištěna prevalence *Blastocystis* sp. 29 % (83/288). Lhotská et al. (2020) využívala pro diagnostiku *Blastocystis* sp. cPCR a detekovala prevalenci nižší, konkrétně 24 % (71/288). Rozdíl v citlivosti mezi oběma metodami byl statisticky významný ($p < 0,05$; $\chi^2 = 8,26$) (Tab. 4). Ve srovnání s cPCR tedy odhalila qPCR o 12 pozitivních vzorků více (Obr. 6, Tab. 5).

Na základě srovnání citlivosti obou metod je zřejmé, že qPCR je citlivější metodou pro detekci *Blastocystis* sp. Ačkoliv qPCR prokázala vyšší senzitivitu, dva vzorky byly vyhodnoceny jako falešně negativní, zatímco cPCR je identifikovala jako pozitivní. U 12 vzorků, které byly pozitivní pouze na základě qPCR, byla za pomoci kvantifikační křivky vyhodnocena nízká intenzita kolonizace, tzn. že se jednalo o hodnoty v řádovém rozmezí 10^1 – 10^2 buněk na jednu qPCR reakci (rozsah Ct hodnot odpovídal 28. až 32. cyklu amplifikace) (Tab. 3).

Obr. 6: Počet pozitivních a negativních vzorků na základě qPCR a cPCR.



Tab. 4: Porovnání citlivosti qPCR a cPCR pomocí McNemarova testu.

		qPCR		
		pozitivní	negativní	
cPCR	pozitivní	69	2	71 (25 %)
	negativní	14	203	217 (75 %)
		83 (29 %)	205 (71 %)	288

4.5 Diverzita subtypů na základě NGS a srovnání s výsledky ze Sanger sekvenování

Abychom mohli určit diverzitu subtypů, byly veškeré pozitivně testované vzorky z qPCR ($n = 83$) otestovány pomocí *Next-generation* sekvenování (NGS). Tato analýza byla provedena ve spolupráci s prof. MUDr. Ondřejem Cinkem Ph.D. z Pediatrického oddělení 2. LF Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnicí v Motole. Pomocí NGS byly identifikovány subtypy v 69 vzorcích z celkových 83 pozitivních. Výsledná diverzita subtypů na základě NGS sekvenování zcela korelovala s diverzitou subtypů ve studii Lhotská et al. (2020), kde bylo použito Sangerovo sekvenování (Tab. 6).

NGS analýza však prokázala vyšší senzitivitu v detekci směsných kolonizací subtypů než kombinace metod cPCR a Sangerova sekvenování použité ve studii Lhotská et al. (2020). Pomocí NGS bylo odhaleno celkem pět nových případů směsných kolonizací. Ve všech případech se jednalo o směsné kolonizace dvou subtypů, konkrétně: ST1+ST7, ST3+ST1, ST3+ST2 (2×) a ST7+ST3 (Tab. 6).

U 12 vzorků, které byly pozitivně identifikovány pouze na základě qPCR, potvrdila NGS analýza pozitivitu pouze u pěti vzorků. Jednalo se o subtypy (ST2, ST5, 2 × ST3 a ST4) (Tab. 6).

Tab. 5: Porovnání citlivosti cPCR a qPCR v souboru vzorků lidí (n = 288). Dále byla vyhodnocena úspěšnost detekce *Blastocystis* sp. pomocí *Next-generation* sekvenování (NGS) pouze na základě qPCR-pozitivních vzorků (n = 83).

# vzorek	metoda				# vzorek	metoda			
	PCR	qPCR	Ct hodnota	NGS		PCR	qPCR	Ct hodnota	NGS
B1	+	+	15	+	B2	+	+	19	+
B13	+	+	15	+	B19	+	+	19	+
B24	+	+	15	+	B115	+	+	19	+
B59	+	+	15	+	B126	+	+	19	+
B68	+	+	15	+	B184	+	+	19	+
B195	+	+	15	+	B220	+	+	19	+
B201	+	+	15	+	B374	+	+	19	+
B226	+	+	15	+	B417	+	+	19	+
B235	+	+	15	+	B86	+	+	20	+
B312	+	+	15	+	B292	+	+	20	+
B339	+	+	15	+	B277	+	+	21	-
B371	+	+	15	+	B303	+	+	21	+
B373	+	+	15	+	B380	+	+	21	+
B9	+	+	16	+	B300	+	+	22	+
B37	+	+	16	-	B375	+	+	22	+
B42	+	+	16	+	B418	+	+	22	+
B45	+	+	16	+	B424	+	+	22	+
B49	+	+	16	+	B431	+	+	23	+
B120	+	+	16	+	B33	+	+	24	+
B225	+	+	16	+	B36	+	+	24	+
B327	+	+	16	+	B313	+	+	24	+
B343	+	+	16	+	B365	+	+	24	+
B352	+	+	16	+	B55	+	+	26	+
B364	+	+	16	+	B144	-	+	28	+
B412	+	+	16	+	B345	+	+	28	+
B15	+	+	17	+	B405	+	+	29	+
B30	+	+	17	+	B356	+	+	30	-
B65	+	+	17	+	B372	-	+	31	+
B82	+	+	17	+	B10	-	+	32	-
B99	+	+	17	+	B35	-	+	32	-
B113	+	+	17	+	B38	-	+	32	-
B185	+	+	17	+	B41	-	+	32	+
B336	+	+	17	+	B50	-	+	32	-
B341	+	+	17	+	B54	-	+	32	-
B353	+	+	17	+	B62	-	+	32	-
B363	+	+	17	+	B114	-	+	32	+
B31	+	+	18	-	B189	-	+	32	-
B224	+	+	18	+	B240	-	+	32	+
B231	+	+	18	+	B248	-	+	32	-
B393	+	+	18	-	B398	-	+	32	-
B397	+	+	18	+	B425	+	+	32	+
B413	+	+	18	+					

Tab. 6. Porovnání úspěšnosti v identifikaci subtypů *Blastocystis* sp. mezi dvěma sekvenčními přístupy, konkrétně mezi Sangerovým sekvenováním (výsledky získané v předchozí studii Lhotská et al., 2020) a *Next-generation* sekvenováním (NGS).

# vzorek	subtyp		# vzorek	Subtyp	
	Sanger sekvenování	NGS		Sanger sekvenování	NGS
B1	ST3	ST3	B225	ST1	ST1
B2	ST1	ST1	B226	ST1	ST1
B9	ST1	ST1	B231	ST3	ST3+ST1
B10	-	-	B235	ST3	ST3
B13	ST1	ST1	B240	-	ST3
B15	ST3	ST3	B248	-	-
B19	ST3	ST3	B277	ST7	-
B24	ST6	ST6	B292	ST7	ST7
B30	ST3	ST3	B300	ST4	ST4
B31	ST3	-	B303	ST7	ST7
B33	ST3	ST3	B312	ST3	ST3
B35	-	-	B313	ST3	ST3
B36	ST1	ST1	B327	ST2	ST2
B37	ST2	-	B336	ST3	ST3
B38	-	-	B339	ST1	ST1
B41	-	ST3	B341	ST3	ST3
B42	ST1	ST1	B343	ST5	ST5
B45	ST1	ST1+ST7	B345	ST6	ST6
B49	ST1	ST1	B352	ST3	ST3+ST2
B50	-	-	B353	ST1+ST3	ST1+ST3
B54	-	-	B356	ST3	-
B55	ST3	ST3	B363	ST3	ST3
B59	ST4	ST4	B364	ST3	ST3+ST2
B62	-	-	B365	ST7	ST7+ST3
B65	ST4	ST4	B371	ST4	ST4
B68	ST3	ST3	B372	-	ST4
B82	ST2	ST2	B373	ST4	ST4
B86	ST3	ST3	B374	ST2	ST2
B99	ST3	ST3	B375	ST1	ST1
B113	ST2	ST2	B380	ST3	ST3
B114	-	ST2	B393	ST7	-
B115	ST7	ST7	B397	ST2	ST2
B120	ST1	ST1	B398	-	-
B126	ST6	ST6	B405	ST6	ST6
B144	-	ST5	B412	ST2	ST2
B184	ST3	ST3	B413	ST4	ST4
B185	ST6	ST6	B417	ST2	ST2
B189	-	-	B418	ST2	ST2
B195	ST3	ST3	B424	ST3	ST3
B201	ST3	ST3	B425	ST2	ST2
B220	ST3	ST3	B431	ST4	ST4
B224	ST1	ST1			

5 Diskuze

Blastocystis sp. je v současné době nejrozšířenějším střevním prvokem na světě a vyskytuje se u více než 1 miliardy lidí (Andersen a Stensvold, 2016). Jeho role ve zdraví i nemoci a střevním mikrobiomu je však stále nejasná až kontroverzní, zejména z důvodu jeho výskytu jak u asymptomatických, tak i symptomatických jedinců (Scanlan et al., 2014; Krogsgaard et al., 2015; Mardani Kataki et al., 2019; Lhotská et al., 2020; Jimenez-Gonzalez et al., 2012; Nourrisson et al., 2014). Prevalence *Blastocystis* sp. závisí na mnoha faktorech včetně geografické oblasti (Clark et al., 2013). V rozvojových zemích bývá prevalence výrazně vyšší než v zemích industrializovaných. Dle některých studií může dokonce dosahovat i 100 % (El Safadi et al., 2014).

Značný vliv na uváděnou prevalenci *Blastocystis* sp. má jednoznačně také použitá diagnostická metoda (Clark et al., 2013). Dříve byly hojně využívány metody pro vyšetření nativních vzorků stolice nebo xenická kultivace *in vitro* s pomocí světelné mikroskopie (McHardy et al., 2014). Tyto metody mají ale řadu limitací. Jsou časově náročné, mají nízkou senzitivitu a navíc neumožňují určení jednotlivých subtypů *Blastocystis* sp. (Stensvold et al., 2007a; Roberts et al., 2011; Lhotská et al., 2020). Právě identifikace subtypů je zásadní pro pochopení epidemiologie *Blastocystis* sp. a jeho vlivu na lidské zdraví. Výše zmíněné diagnostické metody jsou dnes nahrazovány daleko rychlejšími, přesnějšími a také levnějšími metodami. Za standard jsou v současné době považované molekulární metody, a to konvenční PCR (cPCR) nebo real-time PCR (qPCR), které vynikají vysokou senzitivitou i specifitou (Skotarczak, 2018; Stensvold et al., 2006; Stensvold et al., 2012b). Do popředí se dostává také *Next-generation* sekvenování (NGS), a to zejména díky přesnější detekci směsných kolonizací více subtypů ve vzorku (Rojas-Velázquez et al., 2019; Maloney et al., 2019; Cinek et al., 2021). Ačkoliv bylo provedeno již mnoho prevalenčních studií, pro detekci a identifikaci subtypů *Blastocystis* sp. nebyla stále ještě stanovena jednotná metoda (Skotarczak, 2018).

Prevalence *Blastocystis* sp. v souboru vzorků lidí sp. na základě qPCR

V rámci této práce jsme zavedli a optimalizovali qPCR protokol pro diagnostiku a kvantifikaci střevního prvoka *Blastocystis* sp. Pomocí tohoto protokolu byl následně otestován soubor 288 vzorků DNA od zdravých lidí. Celková prevalence *Blastocystis* sp. byla 29 % (83/288). Tento výsledek je v souladu s dostupnou literaturou, která uvádí, že se prevalence *Blastocystis* sp. ve vyspělých zemích pohybuje mezi 7 až 50 % (Bart et al., 2013; Scanlan et al., 2016; Seyer et al., 2017; Lhotská et al., 2020; Tito et al., 2019; Lepczyńska et al., 2021).

V evropských zemích bylo zatím provedeno pouze několik studií, které pro detekci *Blastocystis* sp. u lidí zvolily molekulární diagnostiku na základě qPCR. Jedna z takových studií pochází například z Francie, kde byla zaznamenána prevalence *Blastocystis* sp. 18 % (143/788) (El Safadi et al., 2016). Autoři novější francouzské studie Menu et al. (2019) sledovali výskyt střevních prvoků a detekovali pozitivitu *Blastocystis* sp. u 10 % vzorků (51/643). Obě výše uvedené studie byly zaměřeny především na výskyt *Blastocystis* sp. u pacientů s gastrointestinálními příznaky, zatímco v naší práci byly s využitím qPCR otestovány vzorky DNA pouze od zdravých, respektive asymptomatických lidí. Poirier et al. (2011) optimalizoval ve své studii qPCR protokol založený na *SYBR Green* systému a zaznamenal ve zdravé populaci prevalenci 13 % (12/92). V naší práci byla detekována vyšší prevalence *Blastocystis* sp. (29 %), což by mohlo souviset s tím, že k vizualizaci fragmentů SSU rDNA byla použita fluoresceinem značená *TaqMan* sonda, která má na rozdíl od *SYBR Green* vyšší citlivost (Stensvold et al., 2012b). Cinek et al. (2021) se v rámci své studie zabýval prevalencí *Blastocystis* sp. u asymptomatických dětí z šesti různých zemí. Mezi nimi byla zastoupena i Česká republika, přičemž zde byla pomocí qPCR zaznamenána prevalence nejnižší, a to 15 % (8/52).

V italské studii Piubelli et al. (2019) bylo pomocí qPCR identifikováno 34 % pozitivních vzorků (258/756), což je o trochu vyšší prevalence, než jsme zjistili v naší práci. Vyšší prevalence může souviset s tím, že do studované populace byli kromě Evropanů zahrnuti také lidé z mimoevropských zemí, například z Afriky nebo Asie. Podobná prevalence jako v naší práci byla na základě qPCR zjištěna v Nizozemsku u pacientů s gastroenteritidou, konkrétně 26 % (355/1374). U kontrolní skupiny zdravých lidí byla zjištěna prevalence vyšší, a to 40 % (410/1026) (Dullaert-de Boer et al., 2020). Autoři jiné studie v Nizozemsku van Hattem et al. (2019) zjišťovali prevalenci *Blastocystis* sp. v závislosti na cestování a detekovali *Blastocystis* sp. u 36 % lidí (174/479).

Vyšší prevalence *Blastocystis* sp. na základě qPCR byla zjištěna také mimo Evropu. Například u dětí žijících v oblasti Kolumbie v povodí řeky Amazonky dosahovala prevalence 89 % (252/284) (Sánchez et al., 2017). K vysoké prevalenci zde pravděpodobně přispěly nižší hygienické standardy a s tím spojený fekálně-orální přenos. Další studie byla provedena v Mexiku a zabývala se souvislostí mezi *Blastocystis* sp. a střevním mikrobiomem. S využitím qPCR diagnostiky byla u asymptomatických lidí zjištěna prevalence 65 % (102/156) (Nieves-Ramirez et al., 2018). V Turecku na základě qPCR zjistili u asymptomatických dětí prevalenci *Blastocystis* sp. 44 % (97/219) (Dogan et al., 2017). Na Madagaskaru stejnou metodou detekovali prevalenci 70 % (185/265) (Greigert et al., 2018).

Porovnání senzitivity dvou diagnostických metod

Hlavním cílem této práce bylo posouzení senzitivity mezi dvěma molekulárními metodami v diagnostice *Blastocystis* sp., konkrétně cPCR (Lhotská et al., 2020) a qPCR. Některé dřívější studie již prokázaly vyšší citlivost qPCR ve srovnání s klasickými metodami, jako je mikroskopie nativních preparátů stolice nebo xenická kultivace *in vitro* (Poirier et al., 2011; Stensvold et al., 2012b; Sánchez et al., 2017; Nourrisson et al., 2020). Autoři studie Nourrisson et al. (2020) porovnávali čtyři qPCR protokoly pro detekci *Blastocystis* sp. a zjistili, že se liší jak ve specifitě, tak i citlivosti. Autoři studií Forsell et al. (2016) a El Safadi et al. (2014) se snažili zvýšit citlivost detekce *Blastocystis* sp. a pro její diagnostiku využili kombinaci dvou molekulárních přístupů. Veškeré vzorky nejprve otestovali pomocí cPCR. Následně vyselektovali vzorky s negativním výsledkem, které dále analyzovaly pomocí qPCR. V obou studiích se zjistilo, že qPCR má vyšší citlivost než cPCR a bylo identifikováno dalších 12 % a 24 % pozitivních vzorků. Nicméně studie, která by porovnávala citlivost obou molekulárních metod na stejném souboru vzorků zatím nebyla publikována.

V této práci jsme pro porovnání cPCR a qPCR použili soubor 288 vzorků DNA od asymptomatických lidí z předchozí epidemiologické studie Lhotská et al. (2020). Výsledky ukázaly, že qPCR je citlivější metodou pro detekci *Blastocystis* sp., protože odhalila o 12 pozitivních vzorků více než cPCR. Celková prevalence *Blastocystis* sp. na základě qPCR byla 29 % (83/288), kdežto u cPCR pouze 24 % (71/288) (Lhotská et al., 2020). Rozdíly mezi oběma metodami byly statisticky významné ($p < 0,05$; $\chi^2 = 8,26$).

Konvenční PCR je sice běžně využívanou metodou pro detekci *Blastocystis* sp., nicméně z důvodu nižší citlivosti nemusí spolehlivě zachytit nízké intenzity kolonizace. Ve všech 12 vzorcích, které byly odhaleny navíc pomocí qPCR, se intenzita kolonizace *Blastocystis* sp., pohybovala v hodnotách řádů od 10^1 do 10^2 buněk na jednu qPCR reakci. Na základě těchto výsledků lze říci, že náš diagnostický qPCR protokol umožňuje detekovat i velmi slabé intenzity kolonizace, a to až do řádových hodnot 10^1 buněk v jedné qPCR reakci.

Ačkoliv qPCR prokázala vyšší citlivost ve srovnání s cPCR, dva vzorky byly identifikovány jako falešně negativní (tzn. že qPCR je označila jako negativní, kdežto cPCR jako pozitivní). Pozitivita těchto vzorků byla potvrzena i na základě Sangerova sekvenování, které u těchto dvou vzorků potvrdilo přítomnost subtypů ST3 a ST8. Jelikož jsme u negativních vzorků provedli test vnitřní inhibice a vyloučili jakékoli působení PCR inhibitorů, domníváme se, že důvodem falešné negativity by mohla být degradace DNA ve vzorcích. K tomu může často docházet v důsledku dlouhodobého uchovávání vzorků.

Tyto vzorky DNA byly znovu otestovány pomocí cPCR a zviditelněny elektroforézou. Jeden vzorek se zdál být negativní a druhý (ST8) vykazoval velmi slabý amplikon.

Intenzita kolonizace *Blastocystis* sp. u pozitivních jedinců

Velkou výhodou qPCR je, že na rozdíl od cPCR umožňuje kvantifikovat množství DNA přítomné v analyzovaném vzorku. Informace o intenzitě kolonizace je klíčová pro pochopení role tohoto prvoka ve střevním ekosystému a při porovnávání intenzit kolonizací mezi IBD/IBS pacienty a zdravými jedinci (Verweij a Stensvold, 2014). V této práci jsme sestavili kvantifikační křivku v řádovém rozmezí 10^0 až 10^5 buněk na jednu qPCR reakci. Na základě Ct hodnot a jejich srovnání s kvantifikační křivkou jsme vyhodnotili intenzitu kolonizace ve všech pozitivně testovaných vzorcích. U více než poloviny vzorků (52/83) byla zaznamenána vysoká intenzita kolonizace, která odpovídala řádovému rozmezí 10^5 – 10^6 buněk na jednu qPCR reakci. Rozsah Ct hodnot se pohyboval mezi 15. až 20. cyklem amplifikace. Poirier et al. (2011) publikoval qPCR protokol, který umožňuje detekci 10^2 buněk na 1 g stolice. Náš diagnostický qPCR protokol dokáže identifikovat i nižší intenzity kolonizace, a to až do hodnot řádů 10^1 buněk na jednu qPCR reakci. Nízká intenzita kolonizace byla zjištěna u 18 vzorků a pohybovala se v řádových hodnotách 10^1 – 10^2 buněk na jednu qPCR reakci s rozsahem Ct hodnot od 28. do 32. cyklu amplifikace.

Diverzita subtypů *Blastocystis* sp. na základě „Next-generation“ sekvenování

Rod *Blastocystis* sp. vykazuje širokou genetickou diverzitu, protože u savců (včetně člověka) a ptáků bylo dosud objeveno celkem 22 subtypů (Stensvold a Clark, 2020). Identifikace jednotlivých subtypů představuje důležitou roli zejména v epidemiologických studiích zaměřených na detekci *Blastocystis* sp. u lidí (El Safadi et al., 2016; Lhotská et al., 2020; Gabrielli et al., 2020; Popruk et al., 2021). Různé subtypy blastocyst se mohou vyskytovat u řady hostitelů a pravděpodobně se liší i geografickou distribucí. Proto by výzkumy zaměřené na diverzitu subtypů blastocyst mohly pomoci odhalit cesty přenosu a potenciální zdroje specifických subtypů v dané oblasti (Skotarczak, 2018; Scanlan, 2012).

Real-time PCR nám neumožňuje určit jednotlivé subtypy *Blastocystis* sp. ani jejich směsné kolonizace. Z tohoto důvodu byly veškeré qPCR-pozitivní vzorky (83) analyzovány na Pediatrické klinice 2. LF UK pomocí NGS (prof. MUDr. Ondřej Cinek Ph.D.). Identifikované subtypy jsme následně porovnali s výsledky Sangerova sekvenování Lhotské et al. (2020). V našem případě jsme neprokázali žádný rozdíl mezi sekvenčními přístupy a diverzita subtypů na základě NGS zcela korelovala s výsledky ze Sangerova sekvenování.

NGS a Sangerovo sekvenování porovnávala také studie Maloney et al. (2019). Stejně jako v naší práci nebyl prokázán žádný rozdíl mezi dvěma sekvenčními přístupy. Ve 12 vzorcích, které byly odhaleny navíc na základě qPCR, identifikovala NGS analýza subtypy pouze v pěti případech. To bylo pravděpodobně způsobeno nízkou intenzitou kolonizace *Blastocystis* sp., která se pohybovala v řádovém rozmezí 10^1 – 10^2 buněk na jednu qPCR reakci. Jednalo se o subtypy ST2, ST5, 2×ST3 a ST4. Ve zbývajících sedmi vzorcích byla ověřena přítomnost blastocyst na základě Sangerova sekvenování přímo z qPCR amplikonů (118 bp), ovšem nebyly získány informace o jednotlivých subtypech *Blastocystis* sp.

Směsné kolonizace subtypů

Epidemiologické studie uvádějí, že v lidské populaci převládá kolonizace pouze jedním subtypem *Blastocystis* sp. (Forsell et al., 2017; Scanlan et al., 2016; Lhotská et al., 2020). V poslední době se však ukazuje, že výskyt směsných kolonizací subtypů je ve zdravé populaci mnohem častější, než se dříve předpokládalo (Scanlan et al., 2015). Směsné kolonizace subtypů byly pozorovány v 1,1 % až 14,3 % případů, s průměrem okolo 6 % (Tan, 2008; Alfellani et al., 2013b). Většina studií využívá pro určení diverzity subtypů *Blastocystis* sp. v hostitelích Sangerovo sekvenování (Haghighi et al., 2020; Lhotská et al., 2020; Mattiuci et al., 2016). Nicméně velkým nedostatkem tohoto přístupu je právě identifikace směsných kolonizací subtypů v jednom hostiteli. Z důvodu přednostní PCR amplifikace převládajících subtypů ve vzorku nemusí být směsné kolonizace subtypů vždy identifikovány (Maloney et al., 2019).

Autoři studie Scanlan et al. (2015) na základě Sangerova sekvenování nezjistili u vzorků s pozitivním nálezem *Blastocystis* sp. žádný případ směsné kolonizace. Ovšem při použití *nested* PCR se ukázalo, že 22 % (11/50) vzorků obsahovalo více než jeden subtyp *Blastocystis* sp. Vysoký počet směsných kolonizací subtypů byl zaznamenán také ve studii Piubelli et al. (2019), a to 36 % (80/221).

V současné době se pro určení diverzity subtypů *Blastocystis* sp. začala využívat také NGS analýza, která mnohem přesněji identifikuje směsné kolonizace subtypů (Rojas-Velázquez et al., 2019; Maloney et al., 2019; Cinek et al., 2021). Totéž bylo potvrzeno i v naší práci, kde jsme diverzitu subtypů zjištěnou na základě NGS porovnávali s výsledky ze Sangerova sekvenování. NGS analýza prokázala mnohem lepší výsledky v detekci směsných kolonizací subtypů než kombinace metod jako je cPCR a Sangerovo sekvenování (Lhotská et al., 2020). Zatímco ve studii Lhotská et al. (2020) byl odhalen jediný případ směsné kolonizace (ST1+ST3), pomocí NGS přístupu bylo diagnostikováno pět nových

směsných kolonizací. Autoři jiné studie Rojas-Velázquez et al. (2019) na základě NGS identifikovali u asymptomatických lidí směsné kolonizace subtypů u 14 % (17/124) pozitivních vzorků. Ve studii byly zaznamenány jak kombinace dvou (ST1+ST3, ST2+ST3), tak i tři subtypů (ST1+ST2+ST3). Převládala zejména kombinace subtypů ST1+ST3 (9/17, 53 %), dále byly detekovány ST2+ST3 (5/17, 29 %) a ST1+ST2+ST3 (3/17, 18 %). Subtyp ST3 byl pozorován ve všech směsných kolonizacích. V naší práci jsme pozorovali pouze směsné kolonizace dvou subtypů, konkrétně ST1+ST7, ST3+ST1, ST3+ST2 (2×) a ST7+ST3. Subtyp ST3 byl podobně jako ve studii Rojas-Velázquez et al. (2019) detekován ve většině směsných kolonizací.

To, že NGS umožňuje přesnější identifikaci směsných kolonizací subtypů *Blastocystis* sp., bylo prokázáno také ve studii Maloney et al. (2019). Pomocí NGS bylo identifikováno 65 % (49/75) směsných kolonizací, kdežto na základě Sangerova sekvenování pouze 4 % (3/75). Zastoupeny byly kombinace dvou a více subtypů. Metoda NGS odhalila až osm subtypů v jednom vzorku, přičemž nejčastější směsnou kolonizací byla kombinace subtypů ST5+ST3. My jsme v naší práci takovou směsnou kolonizaci nezachytili, nicméně naše práce byla zaměřená na diverzitu subtypů *Blastocystis* sp. u lidí, kdežto ve studii Maloney et al. (2019) byla pozorována diverzita subtypů u zvířecích hostitelů, konkrétně u skotu.

6 Závěr

V této diplomové práci se nám podařilo zavést a optimalizovat qPCR protokol pro diagnostiku střevního prvoka *Blastocystis* sp. Pomocí tohoto qPCR protokolu byl otestován soubor 288 vzorků DNA od zdravých lidí a zjištěna prevalence *Blastocystis* sp.

Jedním z hlavních cílů této práce bylo porovnání citlivosti qPCR diagnostiky s výsledky cPCR získanými v předchozí epidemiologické studii Lhotská et al. (2020). Celková prevalence *Blastocystis* sp. na základě qPCR byla 29 % (83/288), zatímco u konvenční PCR pouze 24 % (71/288). Ve srovnání s cPCR detekovala qPCR o 12 pozitivních vzorků více. Rozdíly mezi oběma metodami byly statisticky významné. Na základě těchto výsledků jsme prokázali, že qPCR je citlivější metoda pro detekci *Blastocystis* sp.

S použitím kvantifikační křivky nastavené v rozsahu řádů 10^0 až 10^5 buněk na jednu qPCR reakci byla vyhodnocena intenzita kolonizace ve všech pozitivně testovaných vzorcích. U 52 analyzovaných vzorků byla zaznamenána vysoká intenzita kolonizace v řádovém rozmezí 10^5 – 10^6 buněk na jednu qPCR reakci. Zároveň jsme prokázali, že qPCR dokáže odhalit i velmi slabé intenzity kolonizace, které nemusí být spolehlivě detekované při použití cPCR. Nízká intenzita kolonizace byla zjištěna u 18 vzorků a pohybovala se v řádových hodnotách 10^1 – 10^2 buněk na jednu qPCR reakci. Nejméně byly zastoupeny kolonizace v řádových hodnotách 10^3 – 10^4 buněk na jednu qPCR reakci, a to u 13 vzorků.

Dále byla posuzována diverzita subtypů na základě NGS a Sangerova sekvenování. Mezi sekvenčními přístupy jsme nezjistili žádný rozdíl. Diverzita subtypů na základě NGS se zcela shodovala s výsledky ze Sangerova sekvenování. NGS však mnohem přesněji identifikovala směsné kolonizace subtypů *Blastocystis* sp. ve vzorku. Na základě NGS bylo zjištěno pět nových případů směsných kolonizací, konkrétně ST1+ST7, ST3+ST1, ST3+ST2 (2×) a ST7+ST3.

Kombinace dvou molekulárních přístupů qPCR a NGS by mohla být přínosná pro budoucí epidemiologické studie *Blastocystis* sp.

7 Seznam použitých zdrojů a literatury

- Abda BI, Maatoug N, Romdhane RB, Bouhelmi N, Zallegua N, Aoun K, Viscogliosi E, Bouratbine A (2017).** Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* sp. in healthy individuals in the Tunis Area, Tunisia. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 96: 202–204.
- Abe N, Wu Z, Yoshikawa H (2003a).** Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology research*, 90: 124–128.
- Abe N, Wu Z, Yoshikawa H (2003b).** Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology research*, 89: 393–396.
- Aden K, Reindl W (2019).** The gut microbiome in inflammatory bowel diseases: diagnostic and therapeutic implications. *Visceral medicine*, 35: 332–336.
- Ajjampur SSR, Png CW, Chia WN, Zhang Y, Tan KSW (2016).** Ex vivo and in vivo mice models to study *Blastocystis* spp. Adhesion, colonization and pathology: closer to proving Koch's postulates. *PLoS pathogens*, 11: e0160458.
- Alexeieff A (1911).** Sur nature des formations dites kystes de *Trichomonas intestinalis*. *Journal de la Société de biologie*, 71: 296–298.
- Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG (2013a).** Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist*, 164: 497–509.
- Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ESU, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG (2013b).** Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta tropica*, 126: 11–18.
- Alinaghizade A, Mirjalali H., Mohebbali M, Stensvold CR, Rezaeian M (2017).** Inter- and intra-subtype variation of *Blastocystis* subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infection, genetics and evolution*, 50: 77–82.

- Andersen LOB, Bonde I, Nielsen HB, Stensvold CR (2015).** A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS microbiology ecology*, 91: fiv072.
- Andersen LOB, Karim AB, Roager HM, Vignsæs LK, Krogfelt KA, Licht TR, Stensvold CR (2016).** Associations between common intestinal parasites and bacteria in humans as revealed by qPCR. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 35: 1427–1431.
- Andersen LOB, Stensvold CR (2016).** *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? *Journal of clinical microbiology*, 54: 524–528.
- Anuar TS, Ghani MKA, Azreen SN, Salleh FM, Moktar N (2013).** *Blastocystis* infection in Malaysia: evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasites and vectors*, 6: 40.
- Asfaram S, Daryani A, Sarvi S, Pagheh AS, Hosseini SA, Saberi R, Hoseiny SM, Soosaraei M, Sharif M (2019).** Geospatial analysis and epidemiological aspects of human infections with *Blastocystis hominis* in Mazandaran province, northern Iran. *Epidemiology and health*, 41: e2019009.
- Audebert C, Even G, Cian A, The *Blastocystis* Investigation Group, Loywick A, Merlin S, Viscogliosi E, Chabé M (2016).** Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific reports*, 6: 25255.
- Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, van Vugt M, Goorhuis A, van Gool T (2013).** Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC infectious diseases*, 13: 389.
- Beghini F, Pasolli E, Truong TD, Putignani L, Cacciò SM, Segata N (2017).** Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *The ISME journal*, 11: 2848–2863.
- Belleza MLB, Reyes JCB, Tongol-Rivera PN, Rivera WL (2016).** Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from human and canine hosts in an urban community in the Philippines. *Parasitology international*, 65: 291–294.

- Billy V, Lhotská Z, Jirků M, Kadlecová O, Frgelecová L, Parfrey LW, Jirků-Pomajbíková K (2021).** *Blastocystis* colonization alters the gut microbiome and, in some cases, promotes faster recovery from induced colitis. *Frontiers in microbiology*, 12: 641483.
- Bloom SM, Bijanki VN, Nava GM, Sun L, Malvin NP, Donermeyer DL, Dunne WM Jr, Allen PM, Stappenbeck TS (2011).** Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell host microbe*, 9: 390–403.
- Boers SA, Jansen R, Hays JP (2019).** Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 38: 1059–1070.
- Candela E, Goizueta C, Periago MV, Muñoz-Antoli C (2021).** Prevalence of intestinal parasites and molecular characterization of *Giardia intestinalis*, *Blastocystis* spp. and *Entamoeba histolytica* in the village of Fortín Mbororé (Puerto Iguazú, Misiones, Argentina). *Parasites and vectors*, 14: 510.
- Caní PD (2018).** Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*, 67: 1716–1725.
- Casero RD, Mongi F, Sánchez A, Ramírez JD (2015).** *Blastocystis* and urticaria: examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta tropica*, 148: 156–161.
- Castañeda S, Muñoz M, Villamizar X, Hernández PC, Vásquez LR, Tito RY, Ramírez JD (2020).** Microbiota characterization in *Blastocystis*-colonized and *Blastocystis*-free school-age children from Colombia. *Parasites and vectors*, 13: 521.
- Chabé M, Lokmer A, Ségurel L (2017).** Gut protozoa: friends or foes of the human gut microbiota? *Trends in parasitology*, 33: 925–934.
- Cian A, El Safadi D, Osman M, Moriniere R, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, Delgado-Viscogliosi P, Guyot K, Li LL, Monchy S, Noël C, Poirier P, Nourrisson C, Wawrzyniak I, Delbac F, Bosc S, Chabé M, Petit T, Certad G, Viscogliosi E (2017).** Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS one*, 12: e0169659.

- Cinek O, Polackova K, Odeh R, Alassaf A, Kramná L, Ibekwe MAU, Majaliwa ES, Ahmadov G, Elmahi BME, Mekki H, Oikarinen S, Lebl J, Abdullah MA (2021).** *Blastocystis* in the faeces of children from six distant countries: prevalence, quantity, subtypes and the relation to the gut bacteriome. *Parasites and vectors*, 14: 399.
- Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR (2013).** Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in parasitology*, 82: 1–32.
- Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, de Vos WM, Ehrlich SD, Fraser CM, Hattori M, Huttenhower C, Jeffery IB, Knights D, Lewis JD, Ley RE, Ochman H, O'Toole PW, Quince C, Relman DA, Shanahan F, Sunagawa S, Wang J, Weinstock GM, Wu GD, Zeller G, Zhao L, Raes J, Knight R, Bork P (2018).** Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature microbiology*, 3: 8–16.
- Dacal E, Saugar JM, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, Robinson E, Köster PC, Aznar-Ruiz-de-Alegría ML, Espasa M, Ninda A, Gandasegui J, Sulleiro E, Moreno M, Salvador F, Molina I, Rodríguez E, Carmena D (2018).** Prevalence and molecular characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* spp. isolates in school children in Cubal, Western Angola. *Parasites and vectors*, 11: 67.
- Dagci H, Ustun S, Taner MS, Ersoz G, Karacasu F, Budak S (2002).** Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta tropica*, 81: 1–5.
- Das R, Khalil S, Mirdha BR, Makharia GK, Dattagupta S, Chaudhry R (2016).** Molecular characterization and subtyping of *Blastocystis* species in irritable bowel syndrome patients from North India. *PLoS one*, 11: e0147055.
- Das B, Nair GB (2019).** Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health and disease. *Journal of biosciences*, 44: 117.
- Defaye M, Nourrisson C, Baudu E, Lashermes A, Meynier M, Meleine M, Ivan Wawrzyniak I, Bonnin V, Barbier J, Chassaing B, Godfraind C, Gelot A, Barnich N, Ardid D, Bonnet M, Delbac F, Carvalho FA, Poirier P (2020).** Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically *Blastocystis*-infected rats. *Scientific reports*, 10: 9146.

- De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y (2010).** Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC microbiology*, 10: 63.
- Deng L, Wojciech L, Gascoigne NRJ, Peng G, Tan KSW (2021).** New insights into the interactions between *Blastocystis*, the gut microbiota, and host immunity. *PLoS pathogens*, 17: e1009253.
- Deng L, Tan KSW (2022).** Interactions between *Blastocystis* subtype ST4 and gut microbiota in vitro. *Parasites and vectors*, 15: 80.
- Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva, C Diogon M, Brochier-Armanet C, Couloux A, Poulain J, Segurens B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng GC, Tan KSW, Artiguenave F, Jaillon O, Aury JM, Delbac F, Wincker P, Vivarès CP, Alaoui HE. (2011).** Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome biology*, 12: R29.
- Dogan N, Aydin M, Tuzemen NU, Dinleyici EC, Oguz I, Dogruman-AI F (2017).** Subtype distribution of *Blastocystis* spp. isolated from children in Eskisehir, Turkey. *Parasitology international*, 66: 948–951.
- Dogruman-AI F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, Araz E, Boorum K (2009).** *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Memórias do instituto oswaldo cruz*, 104: 724–727.
- Dullaert-de Boer M, Schuurs TA, Vermeer M, Ruijs GJHM, van der Zanden AGM, Weel JF, van Coppentraet LESB (2020).** Distribution and prevalence of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* species in gastroenteritis: results from a case-control study. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 39: 197–203.
- El-Badry AA, El Wahab WMA, Hamdy DA, Aboud A (2018).** *Blastocystis* subtypes isolated from irritable bowel syndrome patients and co-infection with *Helicobacter pylori*. *Parasitology research*, 117: 127–137.
- El Deeb HK, Khodeer S (2013).** *Blastocystis* spp.: frequency and subtype distribution in iron deficiency anemic versus non-anemic subjects from Egypt. *Journal of parasitology*, 99: 599–602.

- El Safadi D, Cian A, Nourrisson C, Pereira B, Morelle C, Bastien P, Bellanger AP, Botterel F, Candolfi E, Desoubeaux G, Lachaud L, Morio F, Pomares C, Rabodonirina M, Wawrzyniak I, Delbac F, Gantois N, Certad G, Delhaes L, Poirier L, Viscogliosi E (2016).** Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC infectious diseases*, 16: 451.
- El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, Hamze M, Riveau G, Viscogliosi E (2014).** Children of Senegal River basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC infectious diseases*, 14: 164.
- El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, Wawrzyniak I, Delbac F, Alaoui EH, Delhaes L, Dei-Cas E, Mallat H, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E (2013).** Short report: molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 88: 1203–1206.
- Even G, Lokmer A, Rodrigues J, Audebert C, Viscogliosi E, Ségurel L, Chabé M (2021).** Changes in the human gut microbiota associated with colonization by *Blastocystis* sp. and *Entamoeba* spp. in non-industrialized populations. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11: 533528.
- Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark GC, Evengård B (2012).** Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 31: 1689–1696.
- Forsell J, Bengtsson-Palme J, Angelin M, Johansson A, Evengård B, Granlund M (2017).** The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC microbiology*, 17: 231.
- Forsell J, Granlund M, Samuelsson L, Koskiniemi S, Edebro H, Evengård B (2016).** High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasites and vectors*, 9: 370.
- Gabrielli S, Furzi F, Fontanelli Sulekova L, Taliani G, Mattiucci S (2020).** Occurrence of *Blastocystis*-subtypes in patients from Italy revealed association of ST3 with a healthy gut microbiota. *Parasite epidemiology and control*, 9: e00134.

- Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM (2020).** The microbiome and inflammatory bowel disease. *Journal of allergy and clinical immunology*, 145: 16–27.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016).** Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews genetics*, 17: 333–351.
- Gong B, Liu X, Wu Y, Xu N, Xu M, Yang F, Tong L, Zhou K, Cao J, Liu A, Shen Y (2019).** Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in ethnic minority groups on both sides of the China-Myanmar border, and assessment of risk factors. *Parasite*, 26: 46.
- Greige S, El Safadi D, Bécu N, Gantois N, Pereira B, Chabé M, Benamrouz-Vanneste S, Certad G, Hage RE, Chemaly M, Hamze M, Viscogliosi E (2018).** Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasites and vectors*, 11: 389.
- Greigert V, Abou-Bacar A, Brunet J, Nourrisson C, Pfaff AW, Benarbia L, Pereira B, Randrianarivelosia M, Razafindrakoto JL, Rakotomalala RS, Morel E, Candolfi E, Poirier P (2018).** Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: the kingdom of the protozoa. *PLoS one*, 13: e0204576.
- Haghighi L, Talebnia SE, Mikaeili F, Asgari Q, Gholizadeh F, Zomorodian K (2020).** Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* isolated from human in Shiraz city, southern Iran. *Clinical epidemiology and global health*, 8: 840–844.
- Hamdy DA, El Wahab WMA, Senosy SA, Mabrouk AG (2020).** *Blastocystis* spp. and *Giardia intestinalis* co-infection profile in children suffering from acute diarrhea. *Journal of parasitic diseases*, 44: 88–98.
- Hameed DMA, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM (2011).** Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitology research*, 108: 553–560.
- Hidalgo L, Salvador F, Sulleiro E, López I, Balladares M, García E, Paz C, Sánchez-Montalvá A, Bosch-Nicolau P, Sao-Avilés A, Molina I (2019).** Evaluation of risk factors associated to detection of *Blastocystis* sp. in fecal samples in population from Barcelona, Spain: a case-control study. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 38: 1241–1247.

- Higuera A, Herrera G, Jimenez P, García-Corredor D, Pulido-Medellín M, Bulla-Castañeda DM, Pinilla JC, Moreno-Pérez DA, Maloney JG, Santín M, Ramírez JD (2021).** Identification of multiple *Blastocystis* subtypes in domestic animals from Colombia using amplicon-based next generation sequencing. *Frontiers in veterinary science*, 8: 732129.
- Hussain A, Younis EZ, Elamami AH, Jelodar M, Mishra T, Shivaramaiah G (2019).** Prevalence of intestinal parasitic infestation among expatriate workers. *Cureus*, 11: e4894.
- Jantermtor S, Pinlaor P, Sawadpanich K, Pinlaor S, Sangka A, Wilailuckana C, Wongsena W, Yoshikawa H (2013).** Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. *Parasitology research*, 112: 1781–1786.
- Jimenez-Gonzalez DE, Martinez-Flores WA, Reyes-Gordillo J, Ramirez-Miranda ME, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, Stark D, Souza-Saldivar V, Martinez-Hernandez F, Flisser A, Olivo-Diaz A, Maravilla P (2012).** *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitology research*, 110: 1269–1275.
- Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD (2019).** A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. *Parasites and vectors*, 12: 376.
- Jones MS, Ganac RD, Hiser G, Hudson NR, Le A, Whipps CM (2008).** Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitology research*, 103: 551–557.
- Khademvatan S, Masjedizadeh R, Rahim F, Mahbodfar H, Salehi R, Yousefi-Razin E, Foroutan M (2017).** *Blastocystis* and irritable bowel syndrome: frequency and subtypes from Iranian patients. *Parasitology international*, 66: 142–145.
- Klein, D (2002).** Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*, 8: 257–260.
- Kodio A, Coulibaly D, Koné AK, Konaté S, Doumbo S, Guindo A, Bittar F, Gouriet F, Raoult D, Thera MA, Ranque S (2019).** *Blastocystis* colonization is associated with increased diversity and altered gut bacterial communities in healthy malian children. *Microorganisms*, 7: 649.
- Kolíško M (2017).** Moderní metody sekvenování DNA. *Živa*, 3: 73–76.

- 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.
- Krogsgaard LR, Andersen LOB, Johannesen TB, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, Bytzer P (2018).** Characteristics of the bacterial microbiome in association with common intestinal parasites in irritable bowel syndrome. *Clinical and translational gastroenterology*, 9: 161.
- Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Garrup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O (2013).** Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500: 541–546.
- Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M (2008).** Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 79: 401–406.
- Lepczyńska M, Dzika E, Chen WC (2021).** Prevalence of *Blastocystis* subtypes in healthy volunteers in northeastern Poland. *Journal of parasitology*, 107: 684–688.
- Lhotská Z, Jirků M, Hložková O, Brožová K, Jirsová D, Stensvold CR, Kolísko M, Jirků-Pomajbíková K (2020).** A study on the prevalence and subtype diversity of the intestinal protist *Blastocystis* sp. in a gut-healthy human population in the Czech Republic. *Frontiers in cellular infection microbiology*, 10: 544335.
- Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, Steinmann P, Utzinger J, Tong XM, Chen SH, Zhou XN (2007).** Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitology research*, 102: 83–90.

- Lim MX, Png CW, Tay CYB, Teo JDW, Jiao H, Lehming N, Tan KSW, Zhang Y (2014).** Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infection and immunity*, 82: 4789–4801.
- Loh G, Blaut M (2012).** Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut microbes*, 3: 544–555.
- Long H, Handschack A, König W, Ambrosch A (2001).** *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitology research*, 87: 1029–1030.
- Lukeš J, Stensvold CR, Jirků-Pomajbíková K, Wegener Parfrey L (2015).** Are human intestinal eukaryotes beneficial or commensals? *PLoS pathogens*, 11: e1005039.
- Maloney JG, Molokin A, Santin M (2019).** Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infection, genetics and evolution*, 73: 119–125.
- Maloney JG, Molokin A, Santin M (2020).** Use of oxford nanopore MinION to generate full-length sequences of the *Blastocystis* small subunit (SSU) rRNA gene. *Parasites and vectors*, 13: 595.
- Maloney JG, Santin M (2021).** Mind the gap: new full-length sequences of *Blastocystis* subtypes generated via oxford nanopore minion sequencing allow for comparisons between full-length and partial sequences of the small subunit of the ribosomal RNA gene. *Microorganisms*, 9: 997.
- Mardani Katakai M, Tavalla M, Beirumvand M (2019).** Higher prevalence of *Blastocystis hominis* in healthy individuals than patients with gastrointestinal symptoms from Ahvaz, southwestern Iran. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 65: 160–164.
- Mattiucci S, Crisafi B, Gabrielli S, Paoletti M, Cancrini G (2016).** Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiology and infection*, 144: 635–646.
- McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Roger Couturier M, Humphries RM (2014).** Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 52: 712–720.
- Menees S, Chey W (2018).** The gut microbiome and irritable bowel syndrome. *F1000 research*, 7: 1029.

- 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.
- Michaudel C, Sokol H (2020).** The gut microbiota at the service of immunometabolism. *Cell metabolism*, 32: 514–523.
- Mirza H, Teo JDW, Upcroft J, Tan KSW (2011).** A rapid, high-throughput viability assay for *Blastocystis* spp. reveals metronidazole resistance and extensive subtype-dependent variations in drug susceptibilities. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55: 637–648.
- Mirza H, Wu Z, Teo JDW, Tan KSW (2012).** Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cellular microbiology*, 14: 1474–1484.
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Ng GC, Yap EH (1997).** Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology research*, 83: 319–325.
- Nagel R, Traub RJ, Allcock RJN, Kwan MMS, Bielefeldt-Ohmann H (2016).** Comparison of faecal microbiota in *Blastocystis*-positive and *Blastocystis*-negative irritable bowel syndrome patients. *Microbiome*, 4: 47.
- Nieves-Ramirez ME, Partida-Rodriguez O, Laforest-Lapointe I, Reynolds LA, Brown EM, Valdez-Salazar A, Morán-Silva P, Rojas-Velázquez L, Morien E, Parfrey LW, Jin M, Walter J, Torres J, Arrieta MC, Ximénez-García C, Finlay BB (2018).** Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis*. *Host-microbe biology*, 3: e00007-18.
- Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A (2017).** Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical journal of gastroenterology*, 11: 1–10.
- Nithyamathi K, Chandramathi S, Kumar S (2016).** Predominance of *Blastocystis* sp. infection among school children in Peninsular Malaysia. *PLoS one*, 11: e0136709.
- Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E (2005).** Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of clinical microbiology*, 43: 348–355.

- Noradilah SA, Moktar N, Anuar TS, Lee IL, Salleh FM, Manap SNAA, Mohtar NSHM, Azrul SM, Abdullah WO, Nordin A, Abdullah SR (2017).** Molecular epidemiology of *blastocystosis* in Malaysia: does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community? *Parasites and vectors*, 10: 360.
- Nourrisson C, Brunet J, Flori P, Moniot M, Bonnin V, Delbac F, Poirier P (2020).** Comparison of DNA extraction methods and real-time PCR assays for the detection of *Blastocystis* sp. in stool specimens. *Microorganisms*, 8: 1768.
- Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F, Dapoigny M, Poirier P (2014).** *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS one*, 9: e111868.
- Oliveira-Arbex AP, David ÉB, Guimarães S (2018).** *Blastocystis* genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. *Infection, genetics and evolution*, 57: 59–63.
- Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, Pereira B, Razakandrainibe R, Pinon A, Lambert C, Wawrzyniak I, Dabboussi F, Delbac F, Favennec L, Hamze M, Viscogliosi E, Certad G (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.
- Ou J, Carbonero F, Zoetendal EG, DeLany JP, Wang M, Newton K, Gaskins HR, O’Keefe SJD (2013).** Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *American journal of clinical nutrition*, 98: 111–120.
- Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, Morris K, Thompson RCA (2007).** Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology*, 134: 359–367.
- Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RCA (2010).** Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary parasitology*, 169: 8–17.

- Petersen AM, Stensvold CR, Mirsepasi H, Engberg J, Friis-Moller A, Porsbo LJ, Hammerum AM, Nordgaard-Lassen I, Nielsen HV, Krogfelt KA (2013).** Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 48: 638–639.
- Pintong, A. rada, Sunyanusin, S., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T, Komalamisrae C, Sukthanab Y, Popruk S (2018).** *Blastocystis* subtype 5: predominant subtype on pig farms, Thailand. *Parasitology international*, 67: 824–828.
- Piubelli C, Soleymanpoor H, Giorli G, Formenti F, Buonfrate D, Bisoffi Z, Perandin F (2019).** *Blastocystis* prevalence and subtypes in autochthonous and immigrant patients in a referral centre for parasitic infections in Italy. *PLoS one*, 14: e0210171.
- Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V (2011).** Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *Journal of clinical microbiology*, 49: 975–983.
- Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H (2012).** New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS pathogens*, 8: e1002545.
- Popruk S, Adao DEV, Rivera WL (2021).** Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: a review. *Infection, genetics and evolution*, 95: 105085.
- Poulsen CS, Efunshile AM, Nelson JA, Stensvold CR (2016).** Epidemiological aspects of *Blastocystis* colonization in children in Ilero, Nigeria. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 95: 175–179.
- Puthia MK, Sio SWS, Lu J, Tan KSW (2006).** *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infection and immunity*, 74: 4114–4123.
- Qi M, Wei Z, Zhang Y, Zhang Q, Li J, Zhang L, Wang R (2020).** Genetic diversity of *Blastocystis* in kindergarten children in southern Xinjiang, China. *Parasites and vectors*, 13: 15.
- Qin, D (2019).** Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer biology and medicine*. 16: 4–10.

- Ramírez JD, Flórez C, Olivera M, Bernal MC, Giraldo JC (2017).** *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS one*, 12: e0172586.
- Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, Reyes P, López MC, García L, Cooper PJ, Vicuña Y, Mongi F, Casero RD (2016).** Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection, genetics and evolution*, 41: 32–35.
- Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D (2011).** Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 84: 308–312.
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J (2014).** Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut pathogens*, 6: 17.
- Rojas-Velázquez L, Maloney JG, Molokin A, Morán P, Serrano-Vázquez A, González E, Pérez-Juárez H, Ximénez C, Santin M (2019).** Use of next-generation amplicon sequencing to study *Blastocystis* genetic diversity in a rural human population from Mexico. *Parasites and vectors*, 12: 566.
- Rossen NG, Bart A, Verhaar N, van Nood E, Kootte R, de Groot PF, D’Haens GR, Ponsioen CY, van Gool T (2015).** Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 34: 1039–1044.
- Rostami A, Riahi SM, Haghghi A, Saber V, Armon B, Seyyedtabaei SJ (2017).** The role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology research*, 116: 2361–2371.
- Rudzińska M, Kowalewska B, Szostakowska B, Grzybek M, Sikorska K, Świątalska A (2020).** First report on the occurrence and subtypes of *Blastocystis* in pigs in Poland using sequence-tagged-site PCR and barcode region sequencing. *Pathogens*, 9: 595.
- Rudzińska M, Kowalewska B, Wąż P, Sikorska K, Szostakowska B (2019).** *Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland – a single center study. *Infection, genetics and evolution*, 75: 103926.

- Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á, Restrepo C, Ruíz M, Reyes P, Qian Y, Xiao L, López MC, Ramírez JD (2017).** Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon basin. *Frontiers in microbiology*, 8: 248.
- Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R (2011).** Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology research*, 109: 205–212.
- Scanlan PD, Knight R, Song SJ, Ackermann G, Cotter PD (2016).** Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* in family units living in the United States. *Infection, genetics and evolution*, 45: 95–97.
- Scanlan, PD (2012).** *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends in parasitology*, 28: 327–334.
- Scanlan PD, Stensvold CR (2013).** *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends in parasitology*, 29: 523–529.
- Scanlan PD, Stensvold CR, Cotter PD (2015).** Development and application of a *Blastocystis* subtype-specific PCR assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population. *Applied and environmental microbiology*, 81: 4071–4076.
- Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, Heilig HGHJ, De Vos WM, O’Toole PW, Cotter PD (2014).** The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS microbiology ecology*, 90: 326–330.
- Sciicluna SM, Tawari B, Clark CG (2006).** DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157: 77–85.
- Seguí R, Muñoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Köster PC, De Lucio A, Hernández-de-Mingo M, Puente P, Toledo R, Esteban JD, Carmena D (2018).** Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. *Parasites and vectors*, 11: 490.
- Seyer A, Karasartova D, Ruh E, Güreser AS, Turgal E, Imir T, Taylan-Ozkan A (2017).** Epidemiology and prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 96: 1164–1170.

- Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG (1996).** Human parasite finds taxonomic home. *Nature*, 380: 398.
- Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH (1995).** Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitology research*, 81: 446–450.
- Skotarczak B (2018).** Genetic diversity and pathogenicity of *Blastocystis*. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 25: 411–416.
- Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Nhieu JTV, Furet JP (2011).** Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS one*, 6: e16393.
- Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui, H, Delbac F, Boorom K, Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E (2010).** Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitology research*, 106: 505–511.
- Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG (2012a).** Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infection, genetics and evolution*, 12: 263–273.
- Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen LOB, Nielsen HV (2012b).** Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of clinical microbiology*, 50: 1847–1851.
- Stensvold, CR (2013).** Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *Journal of clinical microbiology*, 51: 190–194.
- Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG (2009).** Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International journal of parasitology*, 39: 473–479.
- Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen HV (2007a).** Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59: 303–307.
- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG (2007b).** Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends in parasitology*, 23: 93–96.

- Stensvold CR, Clark CG (2016a).** Current status of *Blastocystis*: a personal view. *Parasitology international*, 65: 763–771.
- Stensvold CR, Clark CG (2016b).** Molecular identification and subtype analysis of *Blastocystis*. *Current protocols in microbiology*, 43: 20A.2.1-20A.2.10.
- Stensvold CR, Clark CG (2020).** Pre-empting pandora's box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends in parasitology*, 36: 229–232.
- Stensvold CR, van der Giezen M (2018).** Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends in parasitology*, 34: 369–377.
- Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC (2006).** Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *Journal of parasitology*, 92: 1081–1087.
- Stenzel DJ, Boreham PFL (1991).** A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *International journal for parasitology*, 21: 613–615.
- Stenzel DJ, Boreham PFL (1996).** *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical microbiology reviews*, 9: 563–584.
- Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L (2014).** The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in immunology*, 121: 91–119.
- Tan KSW (2008).** New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical microbiology reviews*, 21: 639–665.
- Tito RY, Chaffron S, Caenepeel C, Lima-Mendez G, Wang J, Vieira-Silva S, Falony G, Hildebrand F, Darzi Y, Rymenans L, Verspecht C, Bork P, Vermeire S, Joossens M, Raes J (2019).** Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*, 68: 1180–1189.

- van Hattem JM, Arcilla MS, Schultsz C, Bootsma MC, Verhaar N, Rebers SP, Goorhuis A, Grobusch MP, Penders J, de Jong MD, van Gool T, Barta A, COMBAT consortium (van Genderen PJ, Mellei DC, Molhoek N, Lashofj AMO, Stobberingh EE, Verbrughi HA) (2019).** Carriage of *Blastocystis* spp. in travellers - a prospective longitudinal study. *Travel medicine and infectious disease*, 27: 87–91.
- Verweij JJ, Stensvold RC (2014).** Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical microbiology reviews*, 27: 371–418.
- Wang L, Alammari N, Singh R, Nanavati J, Song Y, Chaudhary R, Mullin GE (2019).** Gut microbial dysbiosis in the irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Journal of the academy of nutrition and dietetics*, 120: 565–586.
- Wang W, Owen H, Traub RJ, Cuttler L, Inpankaew T, Bielefeldt-Ohmann H (2014).** Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Veterinary parasitology*, 203: 264–269.
- Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, El Alaoui H (2013).** *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Therapeutic advances in infectious disease*, 1: 167–178.
- Wu Z, Mirza H, Tan KSW (2014).** Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. *PLoS neglected tropical diseases*, 8: e2885.
- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R (2010).** *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitology research*, 107: 679–684.
- Yan Y, Su S, Ye J, Lai X, Lai R, Liao H, Chen G, Zhang R, Hou Z, Luo X (2007).** *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitology research*, 101: 1527–1532.
- Yason JA, Liang YR, Png CW, Zhang Y, Tan KSW (2019).** Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: in vitro and in vivo studies. *Microbiome*, 7: 30.
- Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I (2004a).** Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology research*, 94: 391–396.

Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IKM, Hossain MB, Zaman V, Haque R, Takahashi Y (2004b). Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology research*, 92: 22–29.

Yowang A, Tsaousis AD, Chumphonsuk T, Thongsin N, Kullawong N, Popluechai S, Gentekaki E (2018). High diversity of *Blastocystis* subtypes isolated from asymptomatic adults living in Chiang Rai, Thailand. *Infection, genetics and evolution*, 65: 270–275.

Zierdt CH, Rude WS, Bull BS (1967). Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *American journal of clinical pathology*, 48: 495–501.