

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Studijní program: N4103 ZOOTECHNIKA

Studijní obor: ZOOTECHNIKA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

PODTYPY BLASTOCYSTIS U PRASAT

Vedoucí diplomové práce:
Mgr. Martin Kostka, Ph.D.

Autor diplomové práce:
Bc. Lucie Lakatosová

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie LAKATOSOVÁ**
Osobní číslo: **Z10668**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Zootechnika**
Název tématu: **Podtypy Blastocystis u prasat**
Zadávací katedra: **Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl práce: charakterizovat ve vybraných vzorcích prasečí kmeny Blastocystis molekulárně a stanovit, do kterého genotypu patří.

Metodika: po odebrání vzorů výkalů prasat se studentka pokusí vykultivovat střevní prvoky, především Blastocystis, na kultivačních médiích, která si sama připraví. V izolované DNA pomocí PCR diagnostiky stanoví genetické podtypy Blastocystis. Případné získané sekvence budou analyzovány fylogenetickými metodami. Výsledky práce budou prezentovány pomocí obrázků, tabulek a grafů.

Finanční zajištění: finance na materiální zajištění práce budou poskytnuty z grantu MSM6007665806.

Rozsah grafických prací: **obrázky, grafy a tabulky**

Rozsah pracovní zprávy: **cca 40 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

- **Horák P et al.: Paraziti a jejich biologie. Praha, 2007, 393s.**
- **Rommel M et al.: Veterinarmedizinische Parasitologie. Berlin, 2000, 915s.**
- **Stenzel, D. J., Boreham, P. F. L. (1996): Blastocystis hominis revisited. Clin. Microbiol. Rev. 9, 563 - 584.**


Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Martin Kostka, Ph.D.

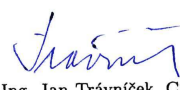
Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Datum zadání diplomové práce: **14. března 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2012**


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUĎEJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice ①


prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 14. března 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma podtypy Blastocystis u prasat vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že jsem v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 27.4.2013

.....

Lucie Lakatosová

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Mgr. M. Kostkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Doc. Ing. M. Kváčovi, Ph.D. za umožnění práce v jeho laboratoři a zpřístupnění sbírky vzorků DNA pro mé experimenty.

V neposlední řadě patří můj velký dík rodičům za podporu při studiu a vytvoření potřebného zázemí. Děkuji také Románkovi a všem svým blízkým přátelům rovněž za jejich podporu.

Abstrakt

Blastocystis je jednobuněčný anaerobní prvok, který se běžně vyskytuje ve střevním traktu zvířat i lidí. Jedná se o geneticky velmi variabilní organismus. *Blastocystis* lze nalézt jak u zdravých jedinců, tak u pacientů s gastrointestinálními poruchami.

V roce 2011/2012 jsem v laboratoři parazitologického ústavu AV ČR prováděla vyšetřování již vyizolovaných vzorků DNA od prasat domácích a divokých molekulárními metodami. Celkem bylo vyšetřeno 110 vzorků. U domácích prasat byl pozitivní výsledek v 91 % (51/56) a u divokých prasat v 67 % (36/54). Celková prevalence byla u domácích prasat vyšší o 24 %. Několik získaných sekvencí genu pro SSU rRNA naznačuje, že u prasat se mohou vyskytovat i netypické podtypy *Blastocystis*.

Klíčová slova: *Blastocystis*, prasata, molekulární metody

Abstract

Blastocystis is an anaerobic single-celled protozoan that commonly occurs in the intestinal tract of animals and humans. It is a genetically very variable organism. *Blastocystis* can be found both in healthy specimens and in patients with gastrointestinal disorders.

In 2011/2012, I examined already isolated DNA samples from domestic and wild pigs by molecular methods in the laboratory of the ASCR Parasitology Institute. In total, 110 samples were examined. The domestic pigs were positive in 91 % (51/56) and wild pigs in 67 % (36/54). The overall prevalence of domestic pigs was higher by 24 %. Several sequences of SSU rRNA gene obtained during the work suggest that pigs may serve as host for atypical *Blastocystis* subtypes.

Keywords: *Blastocystis*, pigs, molecular methods

OBSAH

1. Úvod	8
2. Literární přehled.....	9
2.1. Prase domácí (<i>Sus scrofa f. domestica</i>).....	9
2.1.1. Mikroklima stájí.....	9
2.1.2. Možnosti přenosu nález.....	10
2.1.3. Parazitární nemoci.....	10
2.2. Prase divoké (<i>Sus scrofa</i>).....	13
2.2.1. Potrava	13
2.2.2. Biologie.....	14
2.2.3. Parazitární nemoci.....	14
2.3. <i>Blastocystis</i>	15
2.3.1. Základní charakteristika	15
2.3.2. Historie.....	16
2.3.3. Taxonomické zařazení rodu <i>Blastocystis</i>	17
2.3.4. Genetická rozmanitost – podtypy.....	18
2.3.4.1. Distribuce podtypů u hostitelských organismů	20
2.3.5. Morfologie jednotlivých forem	21
2.3.5.1. Vakuolární a granulární forma	21
2.3.5.2. Multivakuolární a avakuolární formy.....	23
2.3.5.3. Améboidní forma	24
2.3.5.4. Cysty.....	25
2.3.6. Životní cyklus	26
2.4. Epidemiologie a prevalence.....	28
2.5. Klinický význam	29
2.5.1. Přenos.....	29
2.5.2. Klinické příznaky	29
2.5.3. Diagnostika	30

2.5.4. Terapie	31
3. Materiál a metody	32
3.1. Jednokroková PCR.....	32
3.2. Nested PCR.....	34
3.3. Elektroforéza.....	35
3.4. Sekvenování.....	35
3.5. Fylogenetické analýzy	35
3.5.1. Příprava alignmentu	35
3.5.2. Tvorba fylogenetických stromů	36
4. Výsledky.....	37
4.1. PCR a sekvenování	37
4.1.1. Nested PCR	37
4.1.2. Klasická jednokroková PCR	38
4.2. Fylogenetické analýzy	39
5. Diskuse	41
6. Souhrn / Summary	42
7. Seznam použité literatury	43

1. ÚVOD

Blastocystis je parazitický prvok, který se běžně vyskytuje ve střevním traktu širokého spektra hostitelů včetně člověka.

Přestože byl objeven již na počátku 20. století, pokrok ve výzkumu byl postupný a náročný vzhledem k malému počtu laboratoří pracujících na výzkumu tohoto parazita.

Taxonomické zařazení bylo kvůli polymorfní povaze *Blastocystis* dlouhou dobu nejasné a až na základě fylogenetických analýz byl prvok zařazen do velmi různorodé skupiny organismů, tzv. Stramenopila.

Blastocystis je geneticky velmi variabilní organismus a jednotlivé izoláty získané od mnoha druhů zvířat a lidí se dělí do několika podtypů.

Zvířata a lidé se nakazí po požití cysty. Vzhledem k tomu, že se *Blastocystis* běžně nachází jak u zdravých tak i nemocných jedinců, je jeho patogenita sporná.

Biologie *Blastocystis* byla lépe pochopena až v posledních letech, ale stále se jedná o rozporuplný organismus, který je třeba prozkoumat a objasnit mnoho aspektů jeho biologie.

Cílem mé diplomové práce je pomocí molekulárních metod stanovit ve vybraných vzorcích původem z domácích a divokých prasat *Blastocystis* a odhadnout na základě výsledků jejich prevalenci.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*)

Prasata zaujímají významné postavení mezi hospodářskými zvířaty, jejich zdravotní stav je jedním z rozhodujících faktorů úspěšnosti produkce vepřového masa (Svoboda, Drábek, 2005).

Zdravotní stav domácích prasat chovaných v užitkových chovech je ovlivňován stájovým prostředím ve dvou směrech:

1. Vytváří podmínky pro rozvoj značného množství patogenů, kterým jsou prasata vystavována
2. Prostředí ovlivňuje obranyschopnost organismu

2.1.1. Mikroklima stájí

V technologických systémech chovu prasat v našich klimatických podmínkách jsou zvířata chována trvale v uzavřených stájových objektech, které jsou pro ně celoživotním prostorem. Z hlediska požadavků na mikroklima patří prasata mezi nejnáročnější hospodářská zvířata (Pulkrábek et al., 2005).

Požadavky na mikroklima jsou značně rozdílné podle jednotlivých kategorií (např.: dochov selat, výkrm prasat, kojící prasnice, plemenní kanci, atd.).

Teplota

Teplota je hlavní klimatický faktor, nadřazený ostatním faktorům teplotně-vlhkostního komplexu (Pulkrábek et al., 2005). Prasata vydávají minimum energie na udržení konstantní tělesné teploty, pokud teplota vnějšího prostředí odpovídá tzv. termoneutrální zóně. Obecně platí, že dospělým prasatům, vzhledem k typu termoregulace a tukového krytí, které plní funkci tepelného izolátoru, spíše vyhovuje nižší teplota (12 – 20 °C). Fyzikální termoregulace (výparem vody z povrchu těla a sliznic) je relativně slabě vyvinuta. Prasatům více vadí náhlé změny, než pozvolné výkyvy teplot, na které se mohou adaptovat. Rychlé teplotní

změny mohou vyvolat onemocnění změnou množství infekčních činitelů nebo oslabením rezistence prasat (Svoboda, Drábek, 2005).

Relativní vlhkost vzduchu

Posuzuje se vždy ve vztahu k teplotě. Vlhkost vzduchu podstatně ovlivňuje výdej tepla z organismu a jeho tepelnou bilanci. Pokud je relativní vlhkost mezi 50 – 80 %, je považována za optimální a nemá vliv na zdravotní stav prasat. Vyšší nebo nižší vlhkost vzduchu má za následek vyšší zatížení infekčními činiteli (Svoboda, Drábek, 2005).

Rychlost proudění vzduchu

Posuzuje se vždy společně s teplotou a vlhkostí. Při nízkých teplotách proudění vzduchu urychluje výdej tepla z organismu. Při optimálních teplotních podmínkách se požaduje rychlost proudění 0,1 – 0,3 m/s, při nižších teplotách by se rychlost proudění měla snížit a při vyšších teplotách zvýšit (Pulkrábek et al., 2005).

2.1.2. Možnosti přenosu nákaz

Nejvyšší riziko zavlečení nákaz do chovu představují nově příchozí infikovaná prasata. Důležitou úlohu při šíření nákaz také sehrávají drobní hlodavci, mouchy a ptáci (Svoboda, Drábek, 2005).

2.1.3. Parazitární nemoci

Parazité jsou jedno- či vícebuněčné organismy, které cizopasí na úkor jiných, převážně větších živočichů. Dělí se na ektoparazity, kteří cizopasí na povrchu hostitelského organismu, a endoparazity, kteří parazitují ve vnitřních dutinách či orgánech hostitele (Vodňanský et al., 2009).

Invazivní choroby prasat většinou nevyvolávají přímé ztráty uhynutím, ale snižují odolnost proti infekčním chorobám, vyvolávají různé orgánové choroby a podstatně snižují přírůstky, zvyšují spotřebu krmiv a zhoršují kvalitu masa.

Parazitární choroby jsou nebezpečné pro mladá zvířata. Starší prasata si jsou schopna vytvořit antiparazitní imunitu (Kursa et al., 1987).

Infekční a parazitární nemoci způsobují asi 30% celkových ztrát v chovu a výkrmu prasat (Drábek, 2001).

Balantidióza

Původce: *Balantidium coli* (vakovka střevní)

Balantidium coli (či zcela nově *Neobalantidium coli* – viz Pomajblíková et al., 2013) je komenzál tlustého střeva, má vejčitý tvar a měří 100 – 200 x 30 – 100 µm. Ve vnějším prostředí nebo za nevhodných podmínek vytváří odolné cysty o rozměrech 60 x 60 µm. Nejčastěji se přenáší fekálně-orální cestou odolnými cystami. Klinicky se balantidióza projevuje jako akutní nebo chronický průjem (Dražan et al., 1987). Nálevníci se normálně živí střevním obsahem. V některých případech však pronikají do střevní sliznice (vylučují hyaluronidázu) a působí zde hluboké vředy, které mohou perforovat. Balantidióza je zoonotické onemocnění. (Volf, 2007).

Ezofagostomóza

Původce: *Oesophagostomum dentatum* (zubovka prasečí)

Dospělí paraziti se lokalizují v tlustém a slepém střevě. Onemocnění probíhá za příznaků chronické kolitidy. Přenáší se výhradně orálně požitím invazivní larvy. Po požití larvy pronikají do střevní sliznice, kde prodělávají další vývoj.

Střevní forma se vyskytuje u prasat, která se dosud nesetkala s invazí, nedochází ke zřetelné reakci ve střevní sliznici. Po 17 – 23 dnech opouštějí střevní stěnu a dospívají ve střevě.

Uzlíková forma se vyskytuje u prasat, která se již s invazí setkala, ve střevní stěně dochází k zánětlivé reakci s následným opouzdřením parazita a s tvorbou uzlíků. Ty představují obrannou reakci organismu proti invazi, larvy

však mohou v uzlících přežít 3 měsíce i déle, a pokud neuhynou, vracejí se do střeva, kde dospívají (Dražan et al., 1987).

Hyostrogilóza

Původce: *Hyostrogilus rubidus* (vlasovka prasečí)

Hyostrogilóza je onemocnění převážně prasnic a selat. Paraziti se lokalizují v žaludku. K infekci dochází orálně požitím invazivní larvy, které zůstávají v žaludku, zavrtávají se do žlázek žaludeční sliznice, kde prodělávají celý další vývoj a poté se vrací do žaludku, kde dospívají. Dospělí paraziti se zachycují na sliznici žaludku a sají krev (Dražan et al., 1987).

Strongyloidóza

Původce: *Strongyloides ransomi* (hádě prasečí)

Dospělí jedinci jsou lokalizováni v tenkém střevě. Nejčastějším způsobem nakažení je pronikání larev neporušenou kůží. Invaze přes kůži může být tak značná, že dochází k jejímu viditelnému poškození (drobné krváceniny a ekzémy). Invazivní larvy pronikají do podkoží a svaloviny, dále do lymfatického a krevního oběhu, krví jsou zaneseny do plic. Larvy poté pronikají do průdušnice a vykašláváním se dostávají do hltanu a do trávicího ústrojí, kde pohlavně dospívají. Onemocnění se projevuje průjmem s obsahem odloupané sliznice a krve, zvracením (Dražan et al., 1987).

Škrkavčitost (askaridóza)

Původce: *Ascaris suum* (škrkavka prasečí)

Škrkavka je velký oblý červ bílé, nažloutlé nebo narůžovělé barvy. Dospělý samec měří 15 – 25 cm a samice 20 – 40 cm. Přenáší se fekálně – orální cestou prostřednictvím vajíček, z nichž se v tenkém střevě uvolní larva, která migruje v organismu a dostává se pak zpět do trávicího ústrojí, kde dospívá. Hostitele ochuzuje o důležité živiny, narušuje jej svými endotoxiny a vyvolává

chronické onemocnění střev, jater a plic při migraci v průběhu svého vývoje. Příznaky jsou rozdílné podle věku a odolnosti napadeného organismu a podle intenzity invaze. Slabá invaze probíhá bez příznaků. Při silnější invazi pozorujeme nejprve kašel, nechutenství, střídání průjmu se zácpou, zvýšenou teplotu, těžký dech a celkové oslabení organismu. Při silné invazi může dojít k úhynu (Kursa et al., 1987).

U prasat se dále vyskytují i další parazitární onemocnění např.: cysticerkóza, echoinokokóza, kokcidióza, kryptosporydióza, sarkocystza, trichuróza a další.

2.2. Prase divoké (*Sus scrofa*)

Maximální věk: 10 – 12 (25) let

Hmotnost: 75 – 300 kg

Biotop: lesní a polní prostředí, hlavně v nížinách a středních polohách

Potrava: všežravec (rostlinná a živočišná)

Způsob života: aktivní po soumraku, tlupy 10 – 30 kusů bachyní a dorůstajících jedinců.

2.2.1. Potrava

Prase divoké požívá vše, co zrovna tvoří potravní nabídku. V průběhu roku však vždy převládá rostlinná potrava, zatímco živočišná potrava je přijímána spíše sporadicky. Z živočišné potravy požívají uhynulá nebo střelená zvířata (i vlastního druhu). Rostlinnou potravu prasata sbírají na povrchu půdy nebo si jí vyrývají. Požívají luční trávu a jetel. Sbírají lesní plody (např. dub, buk, jedlé kaštiny) a ovoce z keřů (např. vinné hrozny). Na loukách vyhledávají červy a larvy hmyzu, ale také kořeny pampelišek, plané mrkve, cibulky planě rostoucích šafránů a mnoho dalšího. Ze zemědělsky obhospodařovaných kulturních plodin se prasata zajímají o okopaniny (např. brambory, řepa) a dále o kukuřici a pšenici (Hespeler, 2007). Prase divoké často migruje daleko za potravou (Pikula, 2002).

2.2.2. Biologie

Prase divoké žije po celý rok v tlupách, často velmi početných. Nejčastěji v tlupách 10 – 30 zvířat, ale pokud jsou příznivé podmínky pro obživu mohou se vyskytovat i stáda s 80 – 100 kusy (Matoušek, Kernerová, 2011). Bachyně a mladí jedinci jsou základem tlupy. Kňourci lončáci opouštějí rodinnou tlupu ve věku 15 až 18 měsíců, od té doby žijí jako samotáři. Kňouři pak vyhledávají společnost bachyní pouze v době rozmnožování (od listopadu do dubna). Bachyně se od tlupy oddaluje pouze v období porodu a zhruba 14 dní po něm (Pikula, 2002).

Divoká prasata jsou noční zvířata, spící ve dnech na chráněných místech, v houštinách, rákosí. Za šera se vydávají hledat potravu a při svém tahu postupují lesem a loukami zpravidla proti větru (Matoušek, Kernerová, 2011).

2.2.3. Parazitární nemoci

Mezi nejčastější parazity napadající divoká prasata patří hlavně plicnivky, svalovci a sarkosporidie.

Plicní červivost

K původcům plicní červivosti patří rody *Protostrongylus* a *Metastrongylus*. Velké plicnivky mohou být dlouhé 4 – 10 cm a vyskytují se především v průdušnici a velkých průduškách. Malé plicnivky (1 – 3 cm) parazitují především v jemných průdušinkách a v plicní tkáni (Vodňanský et al., 2009). Mezihostiteli jsou žížaly, které prasata požírají ve velkém množství. Napadení plicnivkami však jen zřídka kdy vede k přímému uhynutí. Při silných invazích dochází k celkovému oslabení jedince a selata mohou zaostávat ve vývinu (Hespeler, 2007).

Trichinelóza

Původci: *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*

Svalovci (trichiny) parazitují jako larvy v příčně pruhované svalovině, jako pohlavně diferenciování parazité pak v tenkém střevě. Trichinelóza je

zoonotické onemocnění. Člověk se infikuje larvami při požití syrového či nedostatečně tepelně opracovaného masa. Onemocnění může mít smrtelný průběh. Mezi volně žijící zvěří představuje hlavní zdroj nakažení člověka trichinelami divoké prase. Dnes však, kdy je celoplošně zavedeno povinné vyšetření každého kusu, bylo nebezpečí infekce trichinelami maximálně potlačeno. Ovšem v rozvojových zemích zůstává tato nemoc významným problémem (Vodňanský et al., 2009).

Sarkocystóza

Původci: *Sarcocystis suicanis*, *S. suihominis*

Sarkosporidie jsou celosvětově rozšířené kokcidie, tvořící cysty, a jsou nejrozšířenějšími svalovými parazity. Cysty jsou nejčastěji lokalizovány v kosterní svalovině, svalovině bránice, jazyka, v jícnu a srdeční svalovině. Sporocysty jsou velké 12,6 x 9,3 μm , cysty uložené ve svalovině jsou velké 1500 x 100 μm . Sarkocysty produkují sarkotoxin, který se skládá ze dvou frakcí, a to aglutininu a vlastního toxinu. Prasata se infikují orálně požitím sporocysty. Prasata jsou mezihostiteli a definitivním hostiteli jsou např. psi, lišky a lidé. Po přenesení do organismu prasete dochází ke zvýšení tělesné teploty, ztrátě hmotnosti a může se vyskytnout i celková slabost a křeče. K přenosu na člověka dochází nedostatečně tepelně opracovanými masem (Dražan et al., 1987).

2.3. *Blastocystis*

2.3.1. Základní charakteristika

Blastocystis je anaerobní parazitický prvok, který se vyskytuje ve střevním traktu u mnoha druhů zvířat včetně člověka a je celosvětově rozšířen (Tan, 2004; Poirier et al., 2010). V dnešní době je znám jako běžně se vyskytující střevní parazit u lidí (Yoshikawa et al., 2007).

Prvok rodu *Blastocystis* byl objeven již před 100 lety ve fekálním vzorku získaném od člověka a byl původně považován za neškodnou kvasinku a ještě celé půl století zůstal nedostatečně prostudován (Yoshikawa et al., 2000).

V podstatě se jedná o bezbičíkaté, převážně sférické buňky, které obsahují jedno nebo více jader. Mají hladké a drsné endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex a mitochondrie (Stenzel, Boreham, 1996; Tan et al., 2002). *Blastocystis* má mitochondrie s kristami. Jsou to ale anaerobní mikroorganismy a to zřejmě vedlo k tomu, že tyto jejich mitochondrie vykazují některé znaky hydrogenosomů (Tan et al., 2002, Stechmann et al., 2008).

Blastocystis je parazitický organismus, který osidluje zadní část trávicího traktu mnoha druhů zvířat, a to jak bezobratlých, např. švábů (Suresh et al., 1997; Yoshikawa et al., 2007), tak i obratlovců jako jsou plazi (želvy, krokodýli, ještěři, hadi, Suresh et al., 1997), ptáci (např.: holubi, slepice, kachny, Abe et al., 2002; Abe et al., 2003) i savci (hlodavci, šelmy, lichokopytníci i sudokopytníci, primáti včetně člověka, Abe et al., 2003).

Jak vychází v posledních letech najevo, je *Blastocystis* z hlediska morfologického i molekulárního značně proměnlivý organismus. Teprve v posledních dekáдах docházelo k rozpoznávání významu pečlivé standardizace v popisu jednotlivých podtypů a k jejich kategorizaci. Právě tato genetická variabilita je (pravděpodobně) zodpovědná za některé rozporupné výsledky různých studií týkajících se patogenity *Blastocystis*: některé podtypy jsou zřejmě pro daného hostitele patogennější než jiné (Menounos et al., 2008).

2.3.2. Historie

Blastocystis byl poprvé popsán začátkem roku 1900 Alexeieffem (Tan et al., 2002), který navrhl jméno *Blastocystis enterocola*. Jméno *Blastocystis hominis* používané současnou literaturou navrhl Brumpt v témže období pro organismus, který vyizoloval z lidského fekálního vzorku (Stenzel, Boreham, 1996).

Dřívější studie ukazovaly na to, že se jedná o klidová stadia bičíkovců, kvasinky, nebo že se jedná pouze o nestrávený rostlinný materiál či plíseň (Tan, 2008), ale až Zierdt v roce 1967 zařadil *Blastocystis* mezi prvoky (Sohail, Fischer, 2005).

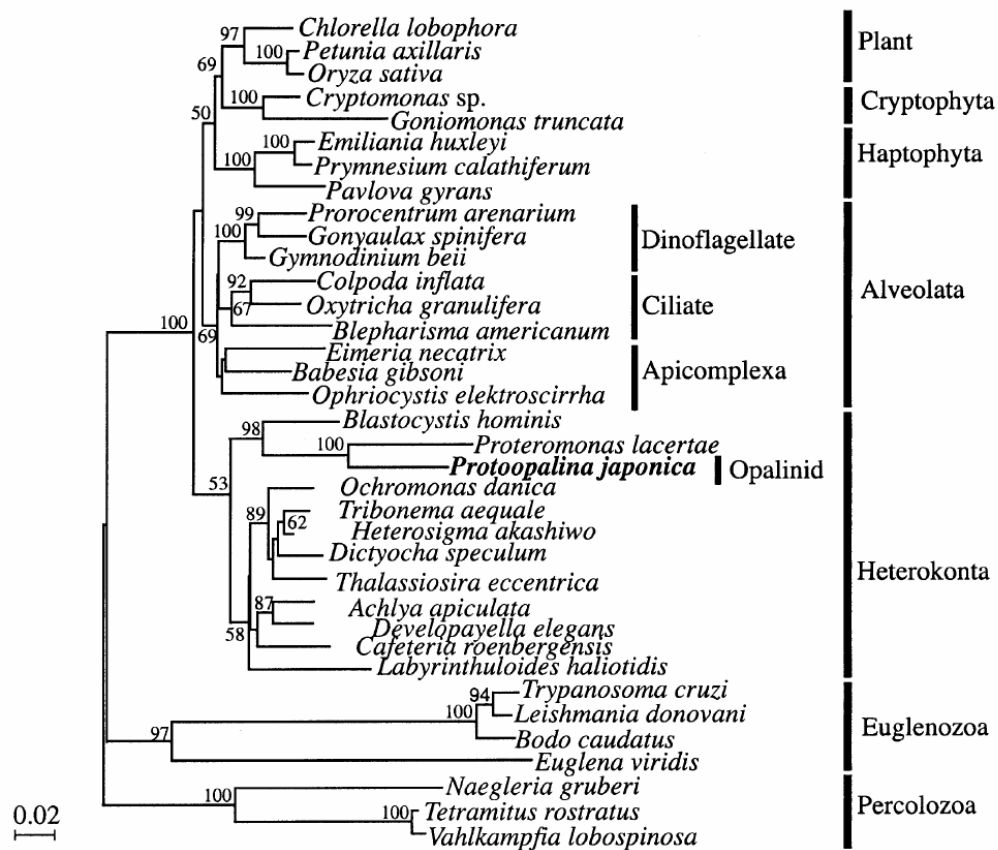
Na základě molekulární analýzy SSU rDNA bylo stanoveno, že *Blastocystis* patří mezi Stramenopila. Toto taxonomické zařazení bylo následně potvrzeno dalšími analýzami sekvencí genů (Stensvold et al., 2007).

2.3.3. Taxonomické zařazení rodu *Blastocystis*

Blastocystis je střevní parazit, který byl zařazen do velmi různorodé skupiny organismů, tzv. Stramenopila (obr. č. 1), a je jediným známým členem této skupiny, který je spojen s patogenitou u lidí (Tan et al., 2010).

Říše Stramenopila zahrnuje mnoho různých skupin, zejména tzv. „hnědé“ řasy (např. rozsivky, chaluhy, zlativky a další) a oomycéty (např. *Phytophthora*) (Adl. et al. 2012).

Zástupci říše Stramenopila se vyznačují tím, že jeden ze dvou jejich bičíků je vybaven mastigonemy (vlákna, která lemují bičík). Je zajímavé, že *Blastocystis* nemá bičíky (v žádném ze stadií životního cyklu), není pohyblivá a její zařazení do skupiny Stramenopila tak není podpořeno morfologickými znaky. Na základě molekulárních studií je zařazena do nově vytvořené třídy, třída Blastocystea, jež patří do podkmene Opalinata společně s opalinkami a bičíkovci rodu *Proteromonas* a *Karotomorpha* (Cavalier-Smith 1998).



Obr. č. 1: Fylogenetická pozice *Blastocystis*. *: Heterokonta = Stramenopila. Z obrázku je patrné, že *Blastocystis* tvoří monofyletickou skupinu s bičíkovci rodu *Proteromonas* a opalinkami reprezentovanými zde rodem *Protoopalina*. Čísla uvedená u jednotlivých větví jsou hodnoty bootsrapů (strom byl konstruován metodou neighbor-joining).

Zdroj: Nishi et al., 2005

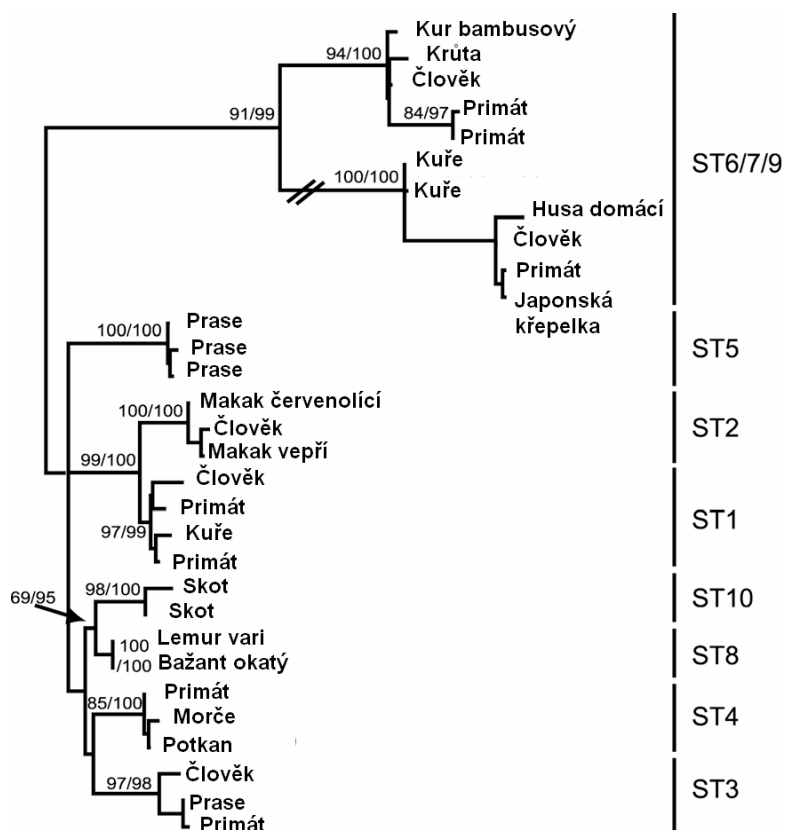
2.3.4. Genetická rozmanitost – podtypy

Blastocystis je geneticky velmi variabilní organismus (Menounos et al., 2008). Jednotlivé izoláty (obr. č. 2) získané od mnoha druhů zvířat a od lidí se dělí do několika podtypů. Dříve byly pro detekci podtypů používány různé molekulární metody (např. RAPD a RFLP), což vedlo k tomu, že různí autoři používali rozdílná označení pro stejné podtypy.

Proto se Stensvold (2007) pokusil o sjednocení jejich terminologie na základě analýzy genu pro rRNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA). Na základě této metody byly *Blastocystis* rozděleny do 9 hlavních podtypů (Noël et al., 2005). Vzhledem k tomu, že se zájem o tohoto parazita neustále zvyšuje,

přibývají i nové podtypy a v současné době je již popsáno 13 podtypů (Parkar et al., 2010, Stensvold et al., 2012).

S přibývajícím údaji o tomto prvokovi se zvyšuje podezření, že některé podtypy mohou být patogenní více, jiné méně. Zdá se, že různé podtypy jsou specifické jen pro určité hostitele nebo může být jejich rozšíření geograficky omezeno (Menounos et al., 2008; Whipps et al., 2010).



Obr. č. 2: Rozdělení podtypů podle izolátů získaných od jednotlivých hostitelů. Strom byl zkonstruován pomocí metody maximální věrohodnosti a bayeské analýzy. Čísla uvedená u jednotlivých větví jsou hodnoty bootstrapů a posteriorní pravděpodobnosti, bootstrapy a posteriorní pravděpodobnost nižší než 50% nejsou zobrazeny. Izoláty byly získány z uvedených hostitelských organismů. ST označuje jednotlivé podtypy Blastocystis.

Zdroj: Stensvold et al., 2009, upraveno

2.3.4.1. Distribuce podtypů u hostitelských organismů

Podtypy 1 až 4 se často vyskytují v epidemiologických průzkumech u lidí. Ostatní podtypy se u lidí vyskytují jen sporadicky (Parkar et al, 2010). Nejčastějšími podtypy, které byly přítomny u lidí, jsou podtyp 3 a podtyp 4. Navíc v rámci podtypu 3 dochází pravděpodobně pouze k přenosu z člověka na člověka a tyto infekce jsou zřejmě i jedinými, jež jsou lidského (a ne zoonotického) původu (Tan, 2008; Stensvold et al., 2012). Podtyp 3 se sice vyskytuje i u mnoha dalších hostitelů, nezdá se však, že by různé linie *Blastocystis* podtypu 3 byly schopny často měnit hostitele (Stensvold et al., 2009).

Oproti tomu podtyp 4 byl diagnostikován především u primátů a hlodavců a je pravděpodobné, že podtyp 4 může být geograficky omezen hlavně na Evropu a Severní Ameriku (Stensvold et al., 2012).

Podtyp 2 byl v epidemiologických průzkumech označen jako dominantní podtyp u primátů. Navíc panuje do jisté míry domněnka, že v zemích, kde lidé žijí v blízkém kontaktu s opicemi (např. Nepál), mohou opice být možným zdrojem nákazy podtypem 2 u lidí (Yoshikawa et al 2009). Tento podtyp byl také diagnostikován u ptáků (kachny, krůty a kuřat) (Tan, 2004) a u prasat (Tan, 2008).

Podtyp 5 je považován za specifický podtyp, vyskytující se pouze u prasat a skotu (Yan et al., 2007). Z důvodu vysoké prevalence byl podtyp 5 přijat jako hlavní podtyp *Blastocystis* u prasat. Ovšem existují i další studie, které se přiklání k tomu, že hlavním podtypem u prasat je podtyp 1 (Stensvold et al., 2009). Prasata však mohou být i hostiteli podtypu 2 a 3 (Tan, 2008).

Podtypy 6 a 7 byly opakovaně nalezeny v rámci vícero studií hlavně u ptáků a je zde velmi pravděpodobné, že hlavními zvířecími hostiteli jsou skutečně ptáci. Podtyp 6 se např. vyskytuje u kuřat (Noël et al., 2003; Yoshikawa et al., 2004), perliček, bažantů (Abe et al., 2003) a podtyp 7 např. u kachen (Noël et al., 2003), hus (Abe, 2004), koroptví, tetřevů (Abe et al., 2004).

Podtyp 8 a 9 byly izolovány jen ve velmi málo případech a tudíž je o nich jen nepatrné množství informací. Podle fylogenetických analýz jsou tyto dva podtypy nejvíce příbuzné podtypům 4 a 5. Podtyp 8 byl nalezen u lidí, opic a bažantů. Podtyp 9 byl zaznamenán pouze u lidí (Tan, 2008). Podtyp 10 byl

nalezen u primátů a sudokopytníků a podtypy 11, 12 a 13 u zvířat ze zoologické zahrady (klokani, sloni, žirafy) (Stensvold et al., 2009).

O genetické rozmanitosti tohoto prvoka se ví jen velice málo a kromě analýz SSU rDNA nebyly dosud provedeny žádné rozsáhlé analýzy, které by mohly objasnit rozmanitost, rozšíření a specifikaci podtypů (Stensvold et al., 2012).

2.3.5. Morfologie jednotlivých forem

Blastocystis je polymorfní prvok, u něhož jsou popsány čtyři hlavní formy: vakuolární, granulární, améboidní a cysty (Yin et al., 2010). Ve skutečnosti *Blastocystis* může vytvářet zarážející množství forem v rámci jedné kultury, proto není mnohdy snadné určit, která forma je pro daný izolát charakteristická (Tan et al., 2008). Kromě čtyř hlavních forem se u *Blastocystis* vyskytují ještě další dvě vzácnější formy multivakuolární a avakuolární.

2.3.5.1. Vakuolární a granulární forma

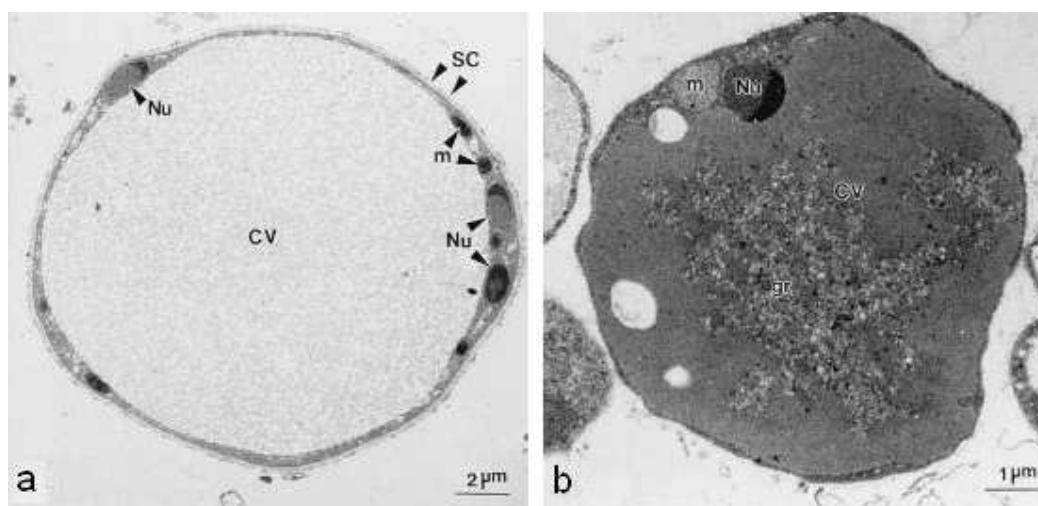
Za typickou buněčnou formu *Blastocystis* je považována především vakuolární forma, která se nejčastěji vyskytuje v kulturách a je běžně mikroskopicky diagnostikována u lidí a zvířat (Tan, 2002).

Vakuolární a granulární formy (obr. č. 3) se od sebe liší především obsahem vakuoly a jsou obvykle sférického tvaru. Vakuolární formy se značně liší ve velikosti, rozmezí je od 2 do 200 μm s průměrem od 4 do 15 μm (Stenzel, Boreham, 1996; Tan, 2008). Granulární formy jsou často o něco větší než vakuolární formy, průměr činí 10 až 60 μm (Stenzel, Boreham, 1996). Vakuolární i granulární formy jsou citlivé na teplotní změny, osmotický tlak a vystavení vzduchu (Zierdt, 1991).

Vakuolární forma se vyznačuje velkou centrální vakuolou, která zaujímá přibližně 90% buňky. Cytoplazma a mitochondrie jsou touto centrální vakuolou odsunuty na periferii pod povrch buňky (Stenzel, Boreham, 1996; Tan, 2008). Vakuolární formu tedy obklopuje jen tenká vrstva cytoplazmy. Vakuola obvykle obsahuje jemně zrnitý nebo vločkovitý materiál (Tan et al., 2002).

V případě granulární formy může centrální vakuola obsahovat granula několika morfologických typů (Stenzel, Boreham, 1996).

Význam a funkce centrální vakuoly a granulí není zcela známa, ale předpokládá se, že by mohla hrát roli v reprodukci a metabolismu (Vdovenko, 2000). Jedna z navrhovaných funkcí centrální vakuoly je, že by v ní v případě nedostatku živin mohlo docházet v buňce k autofagii (Yin et al., 2010). Mitochondrie neobsahují cytochromy a chybí jim i další typické mitochondriální enzymy (Sohail, Fischer, 2005). Mitochondrie vykazují některé metabolické znaky hydrogenosomu (Stechmann et al., 2008). Golgiho komplex se nachází v blízkosti jádra. Jader může být i několik (až čtyři) a v průměru jsou velká přibližně 1 μm (Stenzel, Boreham, 1996).



Obr. č. 3: Vakuolární a granulární forma. **a) vakuolární forma, CV:** centrální vakuola, **Nu:** jádra, **SC:** povrchové vrstvy, **m:** mitochondrie, **b) granulární forma, CV:** centrální vakuola, **Nu:** jádro, **m:** mitochondrie, **gr:** granule

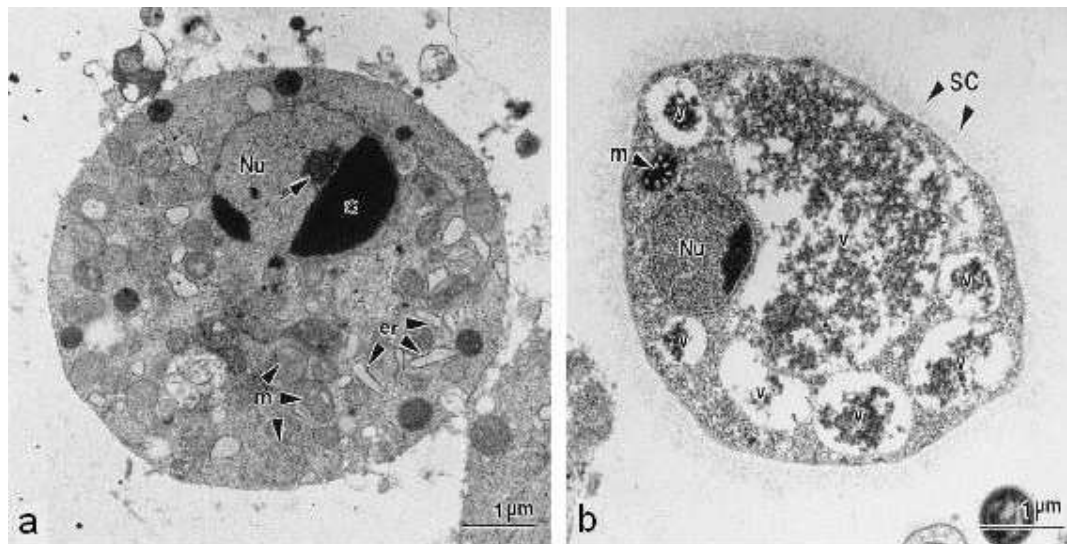
Zdroj: Stenzel, Boreham, 1996

Buňky *Blastocystis* jsou často obklopeny povrchovou vrstvou o různé tloušťce, která je někdy označovaná jako fibrilární plášť. Povrchová vrstva obsahuje řadu sacharidů a předpokládá se, že hraje určitou roli při zachytávání a degradaci bakterií, které mají vliv na výživu buňky. Tento plášť může také sloužit jako ochrana před osmotickým šokem nebo jako mechanická bariéra, zabraňující vazbě proteinů imunitního systému. Je často silnější u čerstvě

izolovaných *Blastocystis*, ale postupně, během dlouhodobé laboratorní kultivace, dochází k tenčení. Důvod tohoto ztenčování je neznámý (Tan, 2008).

2.3.5.2. Multivakuolární a avakuolární formy

Multivakuolární formy (obr. č 4b) jsou menší než vakuolární a granulární formy, jejich buňky dosahují v průměru 5 až 8 μm (Stenzel, Boreham, 1996). Avakuolární forma (obr. č. 4a) neobsahuje žádné vakuoly, oproti tomu v multivakuolárních formách se nachází více malých vakuol. Není zřejmé, zda tyto vakuoly jsou vzájemně oddělené, nebo se jedná o propojenou síť. Malá velikost a odlišnost těchto dvou forem může být způsobena tím, že se buňky mohou nacházet v různé fázi excystace (Tan, 2008). Buňky obsahují jedno nebo dvě jádra. Multivakuolární formy mají na povrchu silný glykoproteinový plášť, který zřejmě slouží k zachytávání bakterií. Oproti tomu avakuolární forma tento plášť postrádá (Tan et al., 2002).



Obr. č. 4: Avakuolární a multivakuolární forma. **a) avakuolární forma**, Nu: jádro, m: mitochondrie, er: drsné endoplasmatické retikulum, **b) multivakuolární forma**, Nu: jádro, m: mitochondrie, SC: fibriální vrstva, v: vakuoly

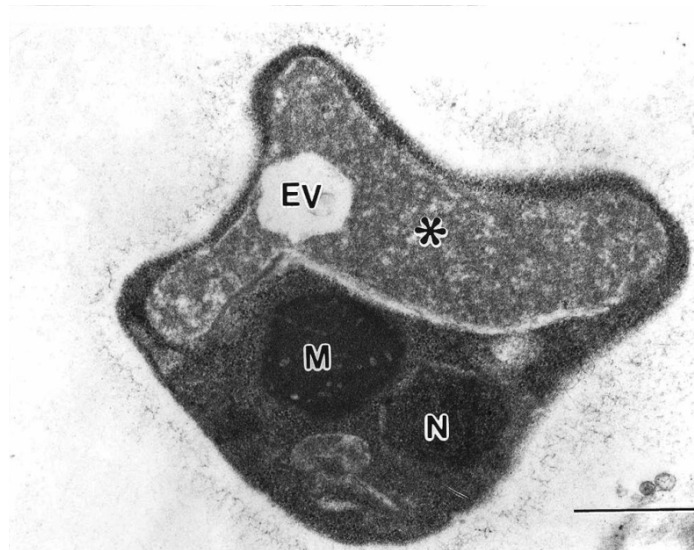
Zdroj: Stenzel, Boreham, 1996

2.3.5.3. Améboidní forma

Améboidní forma (obr. č. 5) se vyskytuje jen výjimečně a její morfologický popis není jednoznačný.

Dunn et al. (1989) popsali tuto formu jako nepravidelnou buňku s rozšířenými pseudopodii. Velikost byla poměrně malá, v průměru od 2,6 do 7,8 μm . Ve vakuolách byly pozorovány pohlčené bakterie, které pravděpodobně slouží k výživě (Tan et al., 2002). Centrální vakuola, Golgiho komplex, povrchová vrstva ani mitochondrie nebyly nalezeny (Stenzel, Boreham, 1996).

Transmisní elektronová mikroskopie však ukázala, že buňky obsahují centrální vakuolu, Golgiho komplex a mitochondrie uvnitř rozšířených pseudopodií (Tan, 2008). Tyto formy byly pozorovány u starých kultur a po léčbě antibiotiky. Améboidní forma je spojována s onemocněním u zvířat i lidí (Sohail, Fischer, 2005).



Obr. č. 5: Améboidní forma, *: centrální vakuola, **EV:** prázdná vakuola, **M:** mitochondrie, **N:** jádro

Zdroj: Tan, 2008

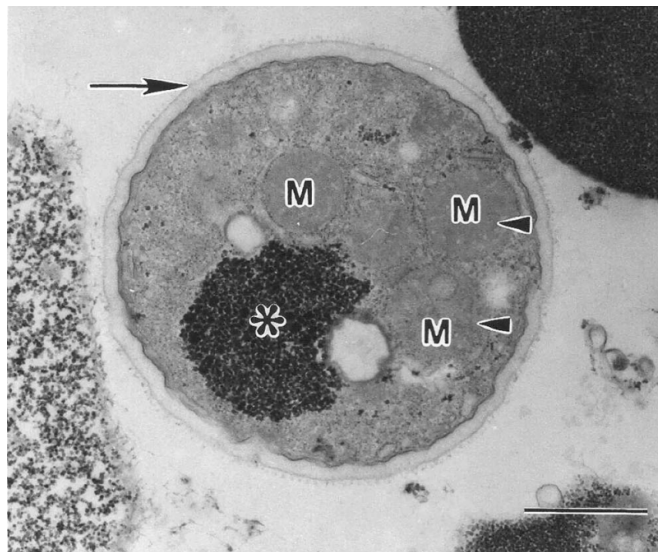
2.3.5.4.Cysty

Cysty (obr. č. 6) jsou nejnověji popsanou formou *Blastocystis*. Velikost je v průměru od 2 do 5 μm , což je nejspíš příčina toho, proč nebyly nalezeny již dříve.

Cysty mají převážně vejčitý nebo kulovitý tvar a jsou chráněny silnou stěnou složenou z několika vrstev (Moe et al., 1999). Cytoplasma cyst může obsahovat jedno až čtyři jádra, glykogenová zrna, tukové kapénky a malé vakuoly (Tan, 2008). Mitochondrie v cystách mají jen slabě vyvinuté krysty.

Cysty *Blastocystis* spp. vykazovaly různé morfologické rozdíly při srovnání s cystami *Blastocystis hominis*, a to především ve velikosti (např. fekální vzorek získaný od opic makaků obsahoval cysty o průměru od 12 do 15 μm (Stenzel et. al., 1997).

Byly popsány dva typy cyst: s vnějším fibriálním pláštěm a bez vnějšího fibriálního pláště. Cysty s vnějším fibriálním pláštěm byly přítomny v trávicím traktu a cysty bez vnějšího fibriálního pláště byly vyloučeny ve výkalech (Zaman et al., 1997).



Obr. č. 6: Cysta s výraznou dvouvrstvou stěnou, *: snížené množství glykogenu, **M:** mitochondrie

Zdroj: Tan, 2008

Cysty, jak mnohé studie naznačují, jsou nejodolnější formou *Blastocystis* a mohou přežívat ve vodě při pokojové teplotě až 19 dní. Jsou však citlivé na extrémní teplo, chlad a na běžné dezinfekční prostředky (Tan et al., 2002). Cysty jsou s největší pravděpodobností zodpovědné za přenos *Blastocystis* (Sohail, Fischer, 2005).

2.3.6. Životní cyklus

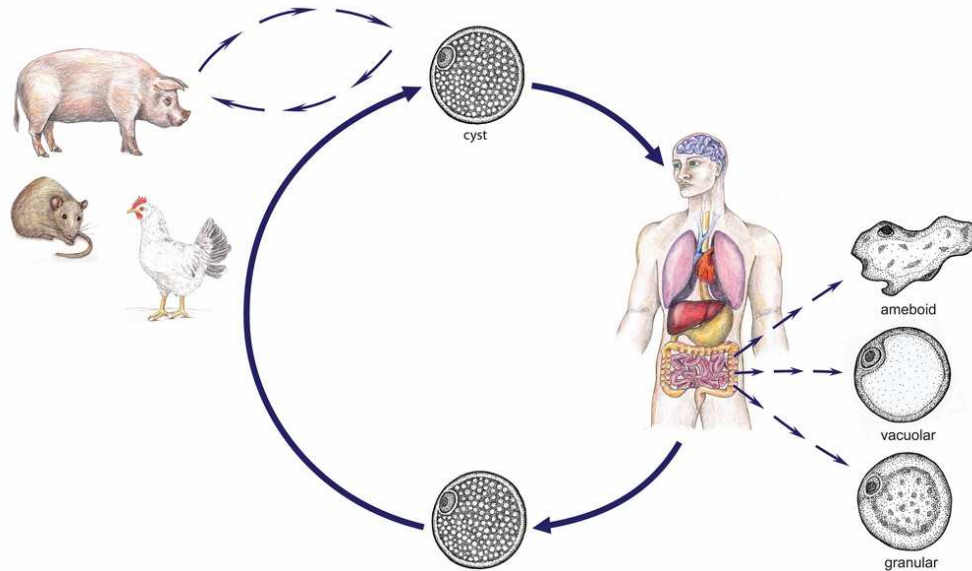
Ohledně životního cyklu *Blastocystis* (obr. č. 7) panují dosud značné rozpory. Tyto rozdíly jsou do značné míry způsobeny předpokladem, že by tento prvek mohl mít více způsobů asexuálního rozmnožování. (Tan, 2008).

Podle různých autorů se mohou uplatňovat následující způsoby rozmnožování: binární dělení, schizogonie, sporulace, pučení, endodyogonie a tvorba zvláštních váčků (Stenzel, Boreham, 1996; Suresh, 2002). Avšak jediný způsob, který byl pozorován v *in vitro* kultuře, bylo binární dělení, kdy se cysty vyvinuly do vakuolárních forem během 24 hodin a vytvářely vždy dvě dceřiné buňky. Mikrofotografie prokázala, že buněčné dělení vakuolární formy již začalo, zatímco parazit byl stále ještě ve formě cysty (Moe et al., 1999). Význam jednotlivých morfologických forem v životním cyklu parazita není zcela jasný.

Zvířata a lidé se nakazí po požití cysty (Tan, 2004). Ty jsou běžnější ve starších výkalech než v čerstvých, což naznačuje, že tato forma se vyvíjí v reakci na opuštění hostitele nebo na změny životního prostředí. Při požití cysty novým hostitelem dochází během průchodu tlustým stěvem k excystaci a poté k přeměně na vakuolární formu, která je následně uložena ve výkalech, kde pravděpodobně dochází opět k přeměně na cystu. Čerstvé vyloučené cysty mohou být pokryty fibrilární vrstvou, která se postupně ztrácí během rozvoje cyst (Tan, 2008).

Podle řady studií je obtížné stanovit, v jakém pořadí se jednotlivé formy *Blastocystis* vyvíjejí. Stenzel a Boreham (1996) popsali, jak by mohl vypadat proces přeměny cysty po přenesení do hostitelského organismu orální cestou. Cysty by mohly excystovat na avakuolární formy a z té na multivakuolární nebo améboidní. V jedné z těchto forem jsou poté vyloučeny do vnějšího prostředí, kde se opět přemění na cysty. Ty jsou pak požitý novým hostitelem a cyklus se opakuje.

Ovšem životní cyklus a způsoby reprodukce nebyly dosud dostatečně prozkoumány, proto by bylo zapotřebí dalších studií, které by pomohly k jejich objasnění (Stenzel, Boreham, 1996).



Obr. č. 7: Životní cyklus *Blastocystis*. Návrh životního cyklu *Blastocystis* s možnými změnami jednotlivých forem v tlustém střevě hostitelského organismu a potencionálním zvířecími hostiteli. K infekci dochází požitím cysty.

Zdroj: Falzon, 2012, upraveno

2.4. Epidemiologie a prevalence

V důsledku toho, že dříve nebyly dostatečné údaje o epidemiologii *Blastocystis*, byly značné mezery v poznatcích o geografickém a demografickém rozšíření, způsobu přenosu, rozšíření podtypů, patologii a dalších. Až v posledních letech i přes rozdíly v diagnostických metodách byl obnoven zájem o tohoto parazita a byly částečně objasněny určité aspekty jeho biologie (Tan, 2010).

Blastocystis je celosvětově rozšířen a není divu, že je jedním z nejčastěji izolovaných parazitů v epidemiologických průzkumech (Tan, 2008).

Vyšší výskyt infekce byl zaznamenán v rozvojových zemích (30-50%) ve srovnání s vyspělými zeměmi (1,5-10%). Vzorby byly odebrány od zdravých dospělých jedinců bez klinických příznaků (Sohail, Fischer, 2005).

Vyšší prevalence výskytu *Blastocystis* v rozvojových zemích je pravděpodobně způsobena nižší sociálně ekonomickou úrovní, špatnou hygienou životního prostředí. Převážně díky nedostatku pitné vody, špatné kanalizaci a odvozu odpadu, jsou lidé vystaveny většímu riziku infekce (Tan, 2002).

Vyšší prevalence je také zaznamenána v řadě studií u dětí a mladistvých. Dále může být ovlivněna věkem pacientů, jejich imunitním systémem a faktory týkajícími se hygieny (Stenzel, Boreham, 1996).

Vedle přítomnosti u člověka je *Blastocystis* také běžně izolována u celé řady zvířat, zejména u členovců, obojživelníků, plazů, ptáků a savců. Některá zvířata však vykazují vyšší výskyt infekce než jiná. Zejména mezi ně patří potkani (60%), prasata (70 až 95 %) a ptáci (50 až 100 %), z nichž je prevalence nejvyšší u slepic domácích (95 až 100 %) (Lee, Stenzel, 1999). Je zajímavé, že tato skupina zvířat může být potencionálním zdrojem zoonotického přenosu na člověka, jak se ukazuje na základě fylogenetických a molekulárních metod (Tan, 2004).

Získání informací o hostitelské specifitě *Blastocystis* je nezbytné pro epidemiologické studie zabývající se přenosem a šířením parazita (Stensvold et al., 2009).

2.5. Klinický význam

2.5.1. Přenos

Blastocystis se přenáší fekálně-orální cestou, což je běžný způsob přenosu střevních parazitů (Morris et al., 2009; Yoshikawa et al., 2000).

U lidí žijících v těsném kontaktu se zvířaty může docházet k přenosu *Blastocystis* mezi zvířaty a lidmi (Yoshikawa et al., 2009). Přenos kontaminovanou vodou není nijak neobvyklý (Lee et al., 2012), vzhledem k tomu, že přenosnou formou parazita jsou cysty, které jsou odolné vůči vodě. Při analyzování vzorků odebrané od vojáků z thajské armády, byly *Blastocystis* nejčastějším střevním parazitem a to v 21,9%. Tato vysoká prevalence mezi vojáky byla spojena s nefiltrovanou nebo nepřevařenou vodou (Tan, 2008). Infekce podtypem 3 byly označeny jako lidského původu a je zde možnost, že dochází prostřednictvím tohoto podtypu k přenosu z člověka na člověka (Souppart et al., 2009). Nedávné studie naznačují, že krysy a kuřata by mohly být vhodnými kandidáty pro zvířecí model, který by pomohl objasnit patobiologii a přenos *Blastocystis* (Tan, 2008).

2.5.2. Klinické příznaky

Vzhledem k tomu, že se *Blastocystis* běžně nachází u zdravých i nemocných jedinců, nelze s jistotou určit, zda popsané klinické příznaky jsou způsobeny v důsledku infekce či nikoliv.

Ke klinickým příznakům, které byly popsány u nemocných pacientů, patří nespecifické gastrointestinální příznaky: nevolnost, nechutenství, úbytek váhy, bolesti břicha, nadýmání, plynatost a akutní nebo chronický průjem. (Jones et al., 2009; Vogelberg et al., 2010; Whipps et al., 2010)

Z těchto příznaků byly u pacientů nejčastěji zaznamenány bolesti břicha a průjem. Mezi další příznaky spojené s infekcí *Blastocystis* patří leukocyty ve stolici, eozinofilie (chronická eozinofilní leukémie) a kožní vyrážky, zejména kopřivka (Tan, 2008).

Některé studie naznačují, že *Blastocystis* je obecně neinvazivní parazit a jeho infekce se může vyskytnout prostřednictvím jiného invazivního patogenu.

Příznaky spojené s infekcí *Blastocystis* byly obecně závažnější u pacientů se sníženou imunitou, jako jsou např. pacienti s HIV/AIDS (Iguchi et al., 2009)

Syndrom podráždění střev (IBS- Irritable Bowel Syndrome) je funkční porucha střev, která je spojena s bolestmi břicha a poruchami vyprazdňování. Původně se lékaři domnívali, že jde o psychosomatické onemocnění, ale některé studie naznačují, že by toto onemocnění mohlo mít spojení s infekcí *Blastocystis* (Giacometti et al., 1999; Boorom et al., 2008)

Yakoob et al. (2010) naznačuje, že různé klinické příznaky by mohly být závislé na různých podtypech *Blastocystis*.

Ovšem možnost, že *Blastocystis* mohou zapříčínovat onemocnění, je stále předmětem diskuse s mnoha rozpornými zprávami (Vogelberg et al., 2010).

2.5.3. Diagnostika

Blastocystis byl nejčastěji zjišťován pomocí světelné mikroskopie. K diagnostice byla využívána vakuolární forma, která je typická svou velikostí a velkou centrální vakuolou. (Stenzel, Boreham, 1996).

Diagnostika je nejednoznačná vzhledem k polymorfní povaze organismu, která ve vlhkém mikroskopickém preparátu může vést k záměně s kvasinkami, výtrusovci rodu *Cyclospora* nebo tukovými kapénkami (Tan, 2008).

Nejčastěji se dnes k diagnostice *Blastocystis* používá trvalých barvených nátěrů ze vzorku stolice. Dalšími metodami jsou ELISA testy, ale ty se běžně nepoužívají a molekulární metoda PCR, která se používá k výzkumným účelům (Sohail, Fischer, 2005).

2.5.4. Terapie

U lidí se infekce spojená s *Blastocystis* nazývá blastocystóza (Boorom et al., 2008). Léčba osob nakažených *Blastocystis* je nejasná vzhledem ke sporné patogenezí organismu a častému spontánnímu vymizení příznaků nemoci (Tan, 2008). K léčbě blastocystózy se nečastěji používá antibiotikum metronidazol v různém dávkování. Mimo jiné se používají další léky (např. u onemocnění IBS byla aplikována kombinace metronidazolu a paromomycinu, což vedlo k odstranění parazita) (Vogelberg et al., 2010).

3. MATERIÁL A METODY

V roce 2011/2012 jsem v laboratoři AV ČR prováděla vyšetřování vzorků molekulárními metodami. K vyšetřování jsem po domluvě s Doc. Ing. Martinem Kváčem, Ph.D. použila sbírku již vyizolovaných vzorků DNA z parazitologické laboratoře AV ČR. Použity byly vzorky DNA od prasat domácích a prasat divokých pro jejich následné porovnání.

Z molekulárních metod jsem použila „klasickou“ jednokrokovou PCR, nested PCR, elektroforézu a sekvenování. Získané sekvence SSU rDNA *Blastocystis* jsme analyzovali fylogenetickými metodami.

3.1. Jednokroková PCR

Jednokroková PCR byla prováděna v termocykleru. Reakční směs pro amplifikaci SSU byla připravena podle tab. č. 1. V této reakční směsi byly použity specifické primery pro *Blastocystis ssp.*: jako forward primer byl použit BL18SPPF1 a jako reverse primer byl použit BL18SR2PP (Poirier et al., 2010), viz tab. č. 2. Bylo použito standardní nastavení teplotního cyklu (30 cyklů) s annealingovou teplotou 65°C a jednou minutou pro polymeraci.

V dalších experimentech byly použity primery SB83 (specifické pro podtyp 1) (tab. č. 3) a SB340 (specifické pro podtyp 5) (tab. č. 4) (Yakoob et al., 2010). Annealingová teplota byla 57°C.

Tab. č. 1: Složení reakční směsi primární amplifikaci SSU

Primární		
H ₂ O	-----	11,30
MgCl ₂	(25 mM)	1,20
10Xbuffer	-----	2,00
dNTP	10 mM	0,40
Forward primer	10 mM	0,40
Reverse primer	10 mM	0,40
BSA	(10mg/ml)	0,80
Taq polymeráza	(1U/1μl)	0,50
DNA	-----	3,00
sum	-----	20,00

Tab. č. 2: Použité primery v jednokrokové PCR

Primer	sekvence
BL18SPPF1	5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA-3'
BL18SR2PP	5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3'

Tab. č. 3: Použité primery v jednokrokové PCR

Primer	sekvence
SB 83F	5'-GAAGGACTCTCTGACGATGA-3'
SB 83R	5'-GTCCAAATGAAAGGCAGC-3'

Tab. č. 4: Použité primery v jednokrokové PCR

Primer	sekvence
SB340F	5'-TGTTCTTGTGTCTTCTCAGCTC-3'
SB340R	5'-TTCTTTCACACTCCCGTCAT-3'

3.2. Nested PCR

Nested PCR byla prováděna v termocykleru. Reakční směs pro sekundární amplifikaci SSU byla připravena podle tab. č. 5. V této reakční směsi byly použity specifické primery pro *Blastocystis ssp.* Pro primární PCR byl použit jako forward primer BL18SPPF1 (Poirier et al. 2010), jako reverse primer byl použit BhRDr (Scicluna et al., 2006). Pro sekundární PCR byl jako forward primer použit BL18SR2PP (Poirier et al., 2010) a jako reverse primer byl použit BLF (Menounos et al., 2008), viz tab. č. 6. Annealingová teplota byla 62°C.

Tab. č. 5: Složení reakční směsi pro sekundární amplifikaci SSU

Sekundární		
H ₂ O	-----	19,65
MgCl ₂	(25 mM)	1,80
10Xbuffer	-----	3,00
dNTP	10 mM	0,60
Forward primer	10 mM	0,60
Reverse primer	10 mM	0,60
-----	-----	-----
Taq polymeráza	(1U/1μl)	0,75
DNA	-----	3,00
sum	-----	30,00

Tab. č. 6: Použité primery v nested PCR

Primer	sekvence
BL18SPPF1	5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA-3'
BhRDr	5'-GAGCTTTTAACTGCAACAACG-3'
BL18SR2PP	5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3'
BLF	5'-CGAATGGCTCATTATATCAGTT-3'

3.3. Elektroforéza

Výsledky PCR byly ověřeny na horizontální elektroforéze. Gel pro elektroforézu byl připraven podle tab. č. 7. Elektroforéza probíhala při gradientu napětí cca 10 V.cm⁻¹ a trvala cca 1 hodinu. DNA byla zviditelněna ethidiumbromidem pod UV světlem. Gel prosvícený UV zářením na transluminátoru byl následně vyfocen digitálním fotoaparátem.

Tab. č. 7: Chemikálie pro přípravu gelu

Chemikálie	Množství
agaróza	0,5 g
TAE pufr	40 ml
ethidiumbromid	1 µl

3.4. Sekvenování

Sekvence DNA byla provedena společností MACROGEN. Analýza je založena na Sangerově metodě (Sanger et al., 1977).

3.5. Fylogenetické analýzy

3.5.1. Příprava alignmentu

Použité programy:

- BLAST
- CLUSTALx (Larkin et al., 2007)
- BioEdit (Hall, 1999)

Pro ověření původu získaných sekvencí jsem použila program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který vyhledává podobné sekvence. Pro vyhledávání algoritmem BLAST jsem využila veřejného serveru NCBI BLAST (národní centrum pro biotechnologické informace). Tento server zároveň zpřístupňuje databázi GenBank, odkud byly staženy sekvence pro analýzu a porovnání s mými sekvencemi. Pomocí programu CLUSTALx byly následně

sekvence alignovány – to spočívá v doplnění mezer na vhodná místa, aby odpovídající báze u různých sekvencí byly ve stejné pozici. Na výsledný alignment se nelze plně spolehnout díky vysoké variabilitě sekvencí v určitých oblastech, proto je nutné alignment zkontrolovat a provést případné úpravy v programu BioEdit.

3.5.2. Tvorba fylogenetických stromů

Použité programy:

- MRBAYES (Ronquist, Huelsenbeck, 2003)
- RAxML (Stamatakis, 2006)
- TreeView (Page, 1996)

Když je alignment hotov, počítají se fylogenetické stromy pomocí bayeské analýzy za použití programu MRBAYES. Dále byl použit program RAxML, který slouží pro hledání výsledného dendrogramu pomocí metody maximální věrohodnosti (ML - maximum likelihood). Stromy pak lze prohlížet v programu TreeView.

4. VÝSLEDKY

Na začátku vyšetřování jsem nejdříve vyzkoušela již publikovanou dvojici primerů SB83 a SB340, které jsou specifické pro podtyp 1 (SB83) a podtyp 5 (SB340) *Blastocystis*. Výsledky PCR však neodpovídaly očekávání na základě předběžných výsledků získaných již dříve Ivanou Horskou (2011): zdá se, že proklamovaná specifita, resp. citlivost těchto primerů je pro naše účely nedostatečná.

Proto jsem se v dalším kroku rozhodla pro metodu nested PCR, zaměřenou ne na jednotlivé podtypy, ale na *Blastocystis* jako takovou. První dvojice primerů, kde byl jako forward primer BL18SPPF1 a jako reverse primer byl použit BhRDr. Druhá dvojice primerů, kde byl jako vnější primer BL18SR2PP a jako vnitřní primer byl použit BLF.

Tyto výsledky již byly uspokojivé, přesto jsem vyzkoušela ještě několik kombinací primerů v klasické PCR (bez využití nested PCR). Několik produktů tohoto původu bylo osekvenováno. Na základě sekvencí bylo ověřeno, že jde skutečně o *Blastocystis*.

Na základě těchto experimentů výsledků jsem se rozhodla použít v práci tuto dvojici primerů: jako forward primer BL18SPPF1 a jako reverse primer BL18SR2PP. Tato dvojice byla funkční a již byla vyzkoušena ve studii Piorier et al. (2010).

4.1. PCR a sekvenování

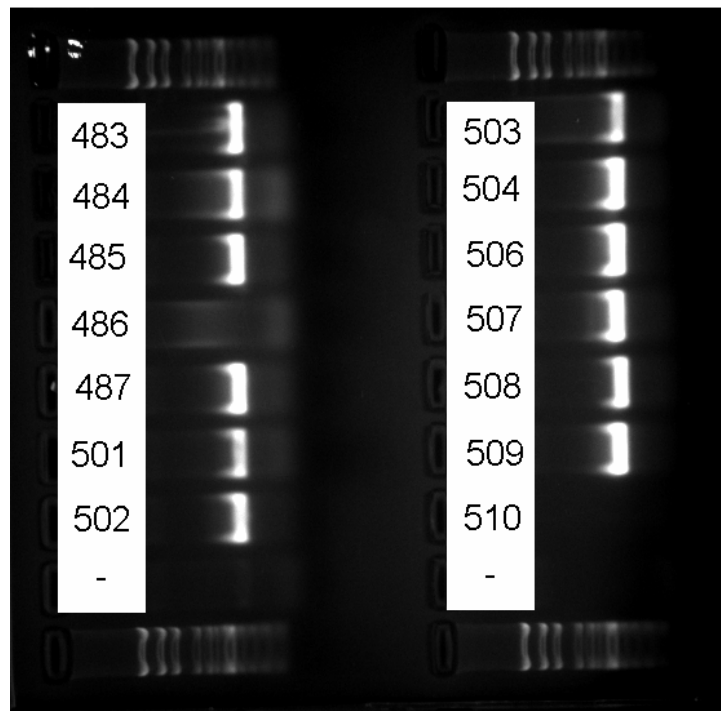
4.1.1. Nested PCR

Metodou nested PCR bylo analyzováno pouze 7 vzorků, z toho 4 od prasat domácích a 3 vzorky od prasat divokých. Tato metoda byla provedena pouze k tomu, abychom zjistili, zda daná dvojice primerů SB83 a SB340 jsou funkční.

4.1.2. Klasická jednokroková PCR

Celkem bylo metodou PCR analyzováno 110 vzorků DNA získaných z výkalů prasat. Z toho bylo 56 vzorků od prasat domácích a 54 od prasat divokých. Pozitivní výsledek ve formě proužku na elektroforetickém gelu (obr. č. 8) byl v 51 případech u prasat domácích a ve 36 případech u prasat divokých.

Sekvence byla provedena u 4 vzorků a ve všech čtyřech případech se jednalo o *Blastocystis*. Některé sekvence vykazovaly známky smíšených infekcí různými kmeny *Blastocystis* (zdvojený signál od určité pozice sekvence).



Obr. č. 8: Elektroforéza, výsledek jednoho z PCR produktů. Metodou PCR byla analyzována DNA od domácích prasat. Z obrázku je dobře patrné, kde byl záchyt *Blastocystis* pozitivní a kde negativní. Symbol,“-“označuje negativní kontrolu.

4.2. Fylogenetické analýzy

Při konstrukci fylogenetických stromů byly také použity sekvence SSU rDNA různých izolátů *Blastocystis*, které byly získány z databáze GenBank a jsou uvedeny v tab. č. 8.

Tab. č. 8: Přehled sekvencí z databáze GenBank, které byly použity při tvorbě fylogenetických stromů

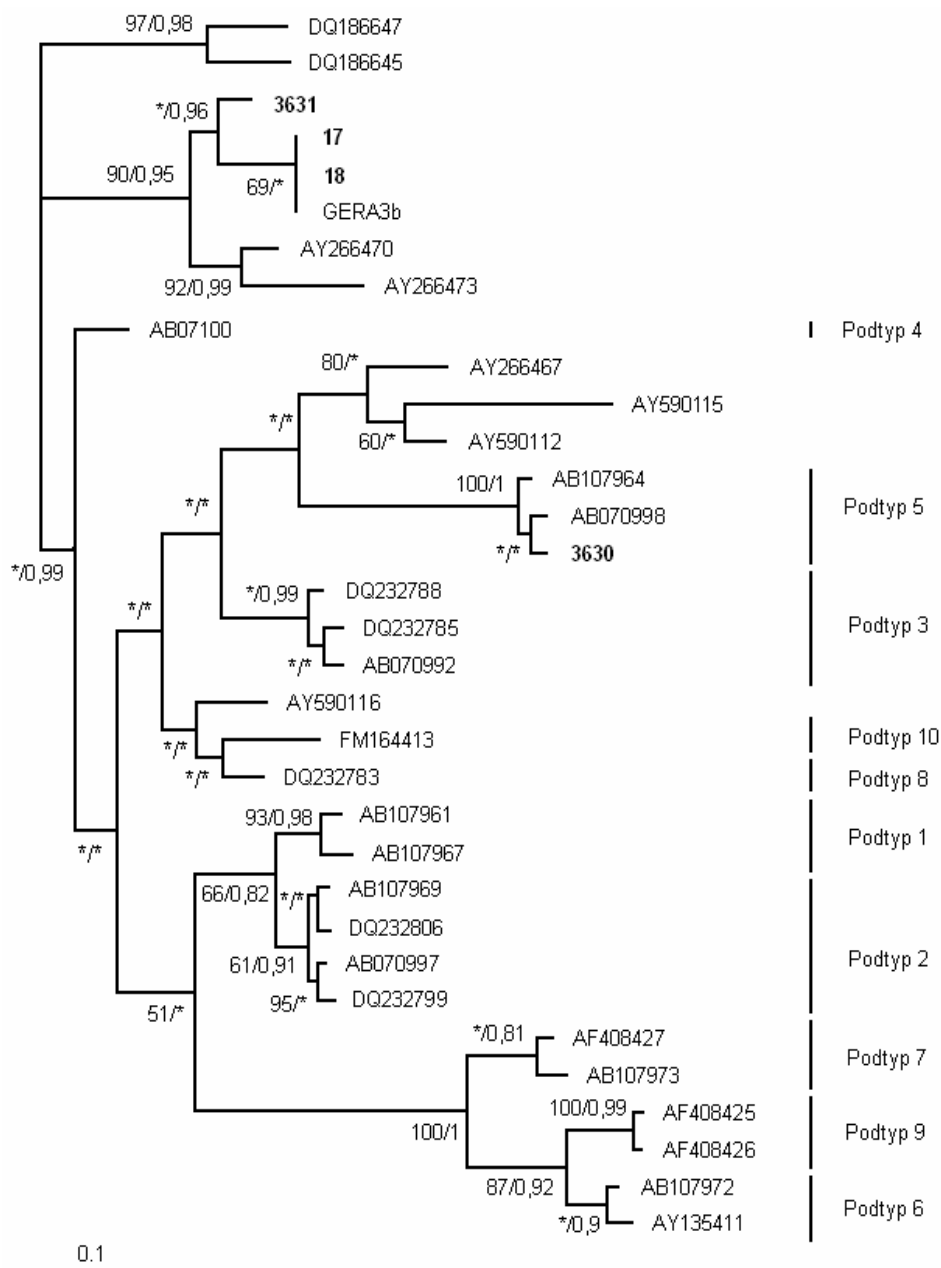
Accession Nr.	Hostitel	Accession Nr.	Hostitel
DQ186647	Šváb	AY590116	Ještěrka
DQ186645	Šváb	FM164413	Skot
GERA3b	Želva paprsčitá	DQ232783	Chápan vlnatý
AY266473	Ropucha japonská	AB107961	Prase
AY266467	Skokan černoskvřnný	AB070997	Makak červenolící
AY590115	Mořský had	DQ232799	Člověk
AY590112	Krajta	AF408427	Primát
AB107964	Prase	AB107973	Husa labutí
AB070998	Prase	AF408425	Primát
DQ232788	Člověk	AF408426	Primát
DQ232785	Člověk	AB107972	Kur bambusový
AB070992	Člověk	AY135411	Krůta

Sekvence, které jsem získala, a sekvence z databáze GenBank, byly analyzovány následujícími fylogenetickými metodami: maximální věrohodnosti (ML) a bayeskou analýzou (BA).

Před analýzou byl připraven alignment, který byl upraven v programu BioEdit – variabilní úseky (kde nebylo jisté, zda jsou sekvence správně alignovány) byly odstraněny. Sekvence byly na obou koncích „ořezány“, aby začínaly a končily všechny ve stejné pozici.

Výsledný fylogenetický strom (obr. č. 9) byl sestrojený na základě sekvencí, které jsem získala a ze sekvencí získaných z databáze GenBank. Z analyzovaných sekvencí byla jedna ze sekvencí zařazena do podtypu 5 (vzorek č. 3630). Podpora bootstrapovými hodnotami a posteriorní pravděpodobností

u podtypu 5 byla vysoká (100/1). Další tři sekvence (vzorky č. 3631, 17, 18) byly přiřazeny k izolátům získaných od studenokrevných hostitelů: želva paprscitá, ropucha japonská, skokan černoskvrnný. Podpora bootstrapovými hodnotami a posteriorní pravděpodobností byla vyšší (90/0,95).



Obr. č 9: Výsledný fylogenetický strom. Čísla uvedená u jednotlivých větví jsou bootstrapové hodnoty/ posteriorní pravděpodobnost. Symbol „*“ označuje bootstrapové hodnoty nižší než 50 a posteriorní pravděpodobnost nižší než 0,80. Mnou získané sekvence jsou v obrázku vyznačeny tučně.

5. DISKUSE

V roce 2011/2012 jsem v laboratoři AV ČR prováděla vyšetřování již vyzolovaných vzorků DNA získaných od prasat domácích a prasat divokých. Z molekulárních metod jsem použila nested PCR, „klasickou“ jednokrokovou PCR, elektroforézu, sekvenování a fylogenetické analýzy.

Celkem bylo analyzováno 110 vzorků DNA, z toho pozitivní výsledek byl v 87 případech. Celková prevalence byla u domácích prasat vyšší o 24 % než u prasat divokých. Z analyzovaných vzorků u prasat domácích byl v 91 % pozitivní výsledek a u divokých v 67 %. Vysoká prevalence u domácích prasat není nijak neobvyklá. Ve srovnání se studií, která byla provedena v roce 2002 Abe et al., jsou výsledky obdobné (uvádí 92 % záchyt u prasat domácích, kdy odebrané vzorky byly zkoumány pomocí světelné mikroskopie).

Při sekvenaci některé z analyzovaných vzorků vykazovaly zdvojené sekvence, což ukazuje na smíšenou infekci různými kmeny *Blastocystis*. Do budoucna by bylo vhodné tyto PCR produkty např. zaklonovat a tím zjistit, jaké kmeny *Blastocystis* se v jednotlivých produktech vyskytovaly.

Na základě sekvencí SSU rDNA byl zkonstruován fylogenetický strom pomocí metody maximální věrohodnosti a bayeské analýzy.

Z fylogenetického stromu vyplývá, že jedna ze získaných sekvencí patří do podtypu 5, což byl očekávatelný výsledek vzhledem k tomu, že podtyp 5 se běžně vyskytuje u prasat, jak již bylo uvedeno ve studiích autorů (Abe et al., 2002, 2003; Stendsvold et al., 2009; Tan et al., 2010). Ovšem u dalších tří sekvencí, které jsem získala, se vyskytla nečekaná příbuznost s izoláty od studenokrevných hostitelů: jejich hostiteli byla želva paprscitá, ropucha japonská či skokan černoskvrný. Tento nález by mohl naznačovat, že by prasata mohla být buď rezervoárem více kmenů *Blastocystis* a nebo mohou jejich zaživacím traktem jednotlivé kmeny od studenokrevných hostitelů pouze procházet.

6. SOUHRN

V roce 2011/2012 jsem v laboratoři AV ČR prováděla vyšetřování již vyzolovaných vzorků DNA molekulárními metodami. Byly použity vzorky DNA od prasat domácích a prasat divokých pro jejich následné porovnání.

Pomocí jednokrokové PCR bylo celkem analyzováno 110 vzorků (56 do prasat domácích a 54 od prasat divokých), ze kterých byly získány 4 sekvence SSU rDNA *Blastocystis*. Tyto sekvence byly analyzovány fylogenetickými metodami a byly zařazeny do podtypu 5 (vzorek č. 3630) a k izolátům získaných od studenokrevných hostitelů: želva paprscitá, ropucha japonská, skokan černoskvrnný (vzorky č. 3631, 17, 18).

Z analyzovaných vzorků DNA byl pozitivní výsledek v 91 % u prasat domácích a 67 % u prasat divokých. Celková prevalence byla u domácích prasat vyšší o 24 %.

SUMMARY

In 2011/2012, I examined already isolated DNA samples by molecular methods. These DNA samples from domestic pigs and wild pigs were used for their subsequent comparison.

With one-step PCR, a total of 110 samples were analyzed (56 from domestic pigs and 54 from wild pigs), out of these samples were obtained four SSU rDNA sequences of *Blastocystis*. These sequences were analyzed by phylogenetic methods; one of them belonged to the subtype 5 (sample No. 3630), the others proved related to isolates from cold-blooded hosts: *Geochelone radiata*, *Bufo japonicus*, *Rana nigromaculata* (samples No. 3631, 17, 18).

The analyzed DNA samples were positive in 91 % for domestic pigs and 67 % for wild pigs. The overall prevalence was higher for domestic pigs by 24 %.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABE N. (2004). Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Veterinary Parasitology*, 120: 235-242.
2. ABE N., NAGOSHI M., TAKAMI K., SAWANO Y., YOSHIKAWA H. (2002). A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Veterinary parasitology*, 106: 203-212.
3. ABE N., WU Z., YOSHIKAWA H. (2003). 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: 1214-128.
4. ADL S.M., SIMPSON A.G.B., LANE CH.E., LUKEŠ J., BASS D., BOWSER S.S., BROWN M.W., BURKI F., DUNTHORN M., HAMPL V., HEISS A., HOPPENRATH M., LARA E., GALL L.L., LYNN D.H., MCMANUS H., MITCHELL E.A.D., MOZLEY-STANRIDGE S.E., PARFREY L.W., PAWLOWSKI J., RUECKERT S., SHADWICK L., SCHOCH C.L., SMIRNOV A., SPIEGEL F.W. (2012). The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59: 429-493.
5. BÖHM-GLONING B., KNOBLOCH J., WALDERICH B. (1997). Five subgroups of *Blastocystis hominis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Tropical Medicine and International Health*, 2: 771-778.
6. BOOROM K., SMITH H., NIMRI L., VISCOLIOSI E., SPANAKOS G., PARKAR U., LI L.H., ZHOU X.N., OK U.Z., LEELAYOOVA S., JONES M.S. (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors*, 1: 40
7. CAVALIER-SMITH T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73: 203-266.

8. DRAŽAN J. a kol. (1987). Nemoci prasat. 1. vyd. Praha, *Státní zemědělské nakladatelství*, 240 s.
9. FALZON S. (2012). Blastocystis life cycle [online]. [cit. 31.1.2012]. Dostupný z <http://www.flickr.com/photos/27477707@N08/6793119301>
10. GIACOMETTI A., CIRIONI O., FIORENTINI A., FORTUNA M., SCALISE G. (1999). Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 18: 436-439.
11. HALL T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.
12. HESPELER B. (2007). Černá zvěř-způsob života, omezování škod, posuzování, způsoby lovu, využití zvěřiny. 1. vyd. Praha, *Gerada publishing*, ISBN: 978-80-247-1931-2.
13. IGUCHI A., YOSHIKAWA H., YAMADA M., KIMATA I., ARIZONO N. (2009). Expression of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis sp.* strain RN94-9. *Parasitology Research*, 105: 135-140.
14. JONES M.S., WHIPPS CH.M., GANAC R.D., HUDSON N.R., BOROOM K. (2009). Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitology Research*, 104: 341-345.
15. KURSA J. a kol. (1987). Zoohygiena a prevence II. 1. vyd. Praha, *Vysoká škola zemědělská Praha*, 198 s.
16. LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947–2948.

17. LEE L.I., CHYE T.T., KARMACHARYA B.M., GOVIND S.K. (2012). *Blastocystis sp.*: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasite & Vectors*, 5: 130
18. LEE M.G., STENZEL D.J. (1999). A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitology Research*, 85: 109-117.
19. MATOUŠEK V. (2001). Aktuální problémy chovu prasat se zaměřením na současnou populaci. 1. vyd. České Budějovice, *JU ZF*, ISBN: 80-7040-523-6.
20. MATOUŠEK V., KERNEROVÁ N. (2011). Chovatelské přístupy pro alternativní a ekologické chovy prasat. 1. vyd. České Budějovice, *JU ZF*, ISBN: 978-80-7394-299-1.
21. MENOUNOS P.G., SPANAKOS G., TEGOS N., VASSALOS C.M., PAPAPOPOULOU CH., VAKALIS N.C. (2008). Direct detection of *Blastocystis sp.* in human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. *Molecular and Cellular Probes*, 22: 24-29.
22. MOE K.T., SINGH M., HOWE J., HO L.C., TAN S.W., CHEN X.Q., YAP E.H. (1999). Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Research*, 85: 103-108.
23. NISHI A., ISHIDA K., ENDOH H. (2005). Reevaluation of the Evolutionary Position of Opalinids Based on 18S rDNA, and α - and β -Tubulin Gene Phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 60: 695-705.
24. NOËL CH., PEYRONNET C., GERBOD D., EDGCOMB V.P., DELGADO-VISCOGLIOSI P., SONGIN M.L., CAPRON M., VISCOGLIOSI E., ZENNER L. (2003). Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 126: 119-123
25. NOËL CH., DUFRÈNEZ F., GERBOD D., EDGCOMB V.P., DELGADO-VISCOGLIOSI P., HO L.C., SINGH M., VINTJENS R., SONGIN M.L., 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*, 348-355.
26. PAGE R.D.M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
27. PARKAR U., TRAUB R.J., VITALI S., ELLIOT A., LEVECKE B., ROBERTSON I., GEURDEN T., STEELE J., DRAKE B., THOMPSON R.C.A. (2010). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*, 169: 8-17.
28. PIKULA J., BEKLOVÁ M., PIKULA J. (2002). Biologie a ekologie lovné zvěře České Republiky. 1. vyd. Praha, *Agrospoj*, 552 s.
29. POIRIER P., WAWRZYNIAK I., ALBERT A., ALAOUI H., DELBAC F., LIVRELLI V. (2010). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* in human stool samples: a prospective study in patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, 10: 1128 – 1392.
30. POMAJBÍKOVÁ K., OBORNÍK M., HORÁK A., PETRŽELKOVÁ K. J., GRIM J. N., LEVECKE B., TODD A., MULAMA M., KIYANG J., MODRÝ D. (2013). Novel Insights into the Genetic Diversity of *Balantidium* and *Balantidium*-like Cyst-forming Ciliates. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2140.
31. PURKRÁBEK J. a kol. (2005). Chov prasat. 1. vyd. Praha, *Profi Press*, ISBN: 80-86726-11-8.
32. RONQUIST F., HUELSENBECK J.P., (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
33. SANGER F.S., NICKLEN S. and COULSON A.E. (1977). DNA sequencing with chain- termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74: 5463-5467

34. SCICLUNA S.M., TAWARI B. and Clark C.G. (2006). DNA Barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157: 77-85.
35. SOHAIL M.R., FISCHER P.R. (2005). *Blastocystis hominis* and travelers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 3: 33-38.
36. SOUPPART L., SANCIU G., CIAN A., WAWRZYNIAK I., DELBAC F., CAPRON M., DEI-CAS E., BOOROM K., DELHAES L., VISCOGLIOSI E. (2009). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolate in France. *Parasitology Research*, 105: 413-421.
37. STAMATAKIS A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 21: 2688-2690.
38. STECHMAN A., HAMBLIN K., PÉREZ-BROCAL V., GASTON D., RICHMOND G.S., VAN DER GIEZEN M., GRAHAM CLARK C., ROGER A.J. (2008). Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current Biology*, 18: 580-585.
39. STENSVOLD C.R., ALFELLANI M., CLARK C.G. (2012). Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 263-273.
40. STENSVOLD C.R., ALFELLANI M., NØRSKOV-LAURITSEN S., PRIP K., VICTORY E.L. MADDOX CH., NIELSEN H.V., CLARK C.G. (2009). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal For Parasitology*, 39: 473-479.
41. STENSVOLD C.R., ARENDRUP M.C., JESPERGAARD C., MØLBAK K., NIELSEN H.V. (2007). Detection *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59: 303-307.
42. STENSVOLD C.R., SURESH K., TAN K.S.W., THOMPSON R.C A., TRAUB R.J., VISCOGLIOSI E., YOSHIKAWA H., CLARK C.G. (2007).

- Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *TRENDS in Parasitology*, 23: 93-96.
43. STENZEL D.J. and BOREHAM P.F.L. (1996). *Blastocystis hominis* Revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 9: 563-584.
44. STENZEL D.J., LEE M.G., BOREHAM P.F.L. (1997). Morphological differences in *Blastocystis* cyst - an indication of different species. *Parasitology Research*, 83: 452-457.
45. SURESH K.G., ANUAR A.K. (2002). Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. *Trends in Parasitology*, 18: 528.
46. SVOBODA M., DRÁBEK J. (2005). Veterinární péče v chovech prasat. 1. vyd. Brno, *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*. ISBN: 80-7305-553-8.
47. TAN K.S.W, MIRZA H., TEO J.D.W., WU B., MACARY P.A. (2010). Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Current Infectious Disease Reports*, 12: 28-35.
48. TAN K.S.W. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology*, 126: 121-144.
49. TAN K.S.W. (2008). New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 639-665.
50. TAN K.S.W., SINGH M., YAP E.H. (2002). Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal of Parasitology*, 32: 789-804.
51. VDOVENKO A.A. (2000). *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitology Research*, 86: 8-10.
52. VODŇANSKÝ M., FOREJTEK P., WINKELMAYER R., PAULSEN P., RAJSKÝ D., MALENA M., VEČEREK V., LEBERSORGER P., ZEDKA

- H.F. (2009). Hygiena zvěřiny. 2. vyd. Brno, *Středoevropský institut ekologie zvěře*, ISBN: 978-80-7305-073-3.
53. VOGELBERG CH., STENSVOLD CH.R., MONECKE S., DITZEN A., STOPSACK K., HEINRICH-GRÄFE U., PÖHLMANN CH. (2010). *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitology International*, 59: 469-471.
54. VOLF P., HORÁK P. a kol. (2007). Paraziti a jejich biologie. 1. vyd. Praha, *Triton*, ISBN: 978-80-7387-008-9.
55. WHIPPS CH.K., BOOROM K., BERMUDEZ L.E., KENT M.L. (2010). Molecular characterization of *Blastocystis* species in Oregon identifies multiple subtypes. *Parasitology Research*, 106: 827-832.
56. YAKOUB J., JAFRI W., BEG M.A., ABBAS Z., NAZ S., ISLAM M., KHAN R. (2010). Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 106: 1033-1038.
57. YAN Y., SU S., YE J., LAI X., LAI R., LIAO H., CHEN G., ZHANG R., HOU Z., LOU X. (2007). *Blastocystis* sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitology Research*, 101: 1527-1532.
58. YIN J., YE A.J.J., TAN K.S.W. (2010). Autophagy is involved in starvation response and cell death in *Blastocystis*. *Microbiology*, 156: 665–677.
59. YOSHIKAWA H., ABE N., IWASAWA M., KITANO S., NAGANO I., WU Z., TAKAHASHI Y. (2000). Genomic Analysis of *Blastocystis hominis* Strains Isolated from Two Long-Term Health Care Facilities. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1324-1330.
60. YOSHIKAWA H., WU Z., HOWE J., HASHIMOTO T., NG G.C., TAN K.S.W. (2007). Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54: 33-37.
61. YOSHIKAWA H., WU Z., PANDEY K., PANDEY B.D., SHERCHAND J.B., YANAGI T., KANBARA H. (2009). Molecular characterization of

Blastocystis isolates from children and rhesus monkey in Kathmandu, Nepal. *Veterinary Parasitology*, 160: 295-300.

62. ZAMAN V., HOWE J., NG M. (1997). Observations on the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 83: 731-733.
63. ZAMAN V., HOWE J., NG M. (1997). Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 83: 306-308.
64. ZIERDT CH. H. (1991). *Blastocystis hominis* Past and Future. *Clinical Microbiology reviews*, 4: 61-79.