

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor: Biologie (4)

**Švábi jako přenašeči a zdroj protozoárních infekcí
člověka**

**Cockroaches as vectors and a source of human
protozoan infections**

Autor: Elisabeth Maya Krause

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 980/55, 616 00 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Školitel: doc. RNDr. Andrea Bardůnek Valigurová, Ph.D.

Rok: 2026

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Beru na vědomí, že nejpozději odevzdáním slovesné vědecké práce do veřejné soutěže Středoškolská odborná činnost, stejně jako odevzdáním jejích příloh a dalších připojených děl, např. audiovizuálních, fotografických, výtvarných, architektonických apod. (dále jen „soutěžní dílo“), dochází ke zveřejnění díla podle § 4 odst. 1 zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „autorský zákon“). Totéž platí pro pozdější odevzdání doplněného, změněného, upraveného nebo opraveného díla.

Beru na vědomí, že zveřejněním díla, jehož součástí je vynález, se tento vynález stává součástí stavu techniky podle § 5 odst. 1, 2 zákona č. 527/1990 Sb., o vynálezech, průmyslových vzorech a zlepšovacích návrzích, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „patentový zákon“), což zakládá překážku pro udělení patentu podle § 3 odst. 1 patentového zákona.

Beru na vědomí, že vyhlášovatel soutěže je podle § 61 odst. 1 autorského zákona per analogiam oprávněn užít soutěžní dílo pro účely zajištění průběhu soutěže, zejména k zajištění transparentnosti soutěže a veřejnosti obhajob soutěžních prací. V odůvodněném rozsahu je tedy vyhlášovatel po dobu účasti autora v soutěži oprávněn zejména:

- zhotovovat rozmnoženiny díla, je-li to nezbytné k seznámení účastníků soutěže, porotců nebo veřejnosti se soutěžní prací;
- zapůjčit originál nebo rozmnoženinu díla účastníkům soutěže, porotcům nebo veřejnosti. Přitom dbá na bezpečné nakládání s dílem;
- vystavovat originál nebo rozmnoženinu díla v průběhu soutěžních přehlídek a doprovodných akcí;
- sdělovat dílo veřejnosti v nehmotné podobě, a to především počítačovou nebo obdobnou sítí.

Dále prohlašuji, že při tvorbě této práce jsem použila nástroj generativního modelu AI *ChatGPT* (<https://chat.openai.com>) za účelem jazykové úpravy textu, formulace vybraných pasáží a stylistická úprava textu. Po použití tohoto nástroje jsem provedla kontrolu a úpravu veškerého vytvořeného textu a přebírám za něj plnou zodpovědnost.

V Beně dne 5. 2. 2026

Poděkování

Tato práce byla zprostředkována JCMM a vypracována za finanční podpory JMK na Ústavu botaniky a zoologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity. Na tomto místě bych ráda podekovala své školitelce doc. RNDr. Andree Bardůnek Valigurové, Ph.D. za její trpělivé vedení, odborné rady, neocenitelnou pomoc v průběhu celé práce a čas, který mi věnovala. Rovněž bych chtěla vyjádřit díky doc. RNDr. Pavlovi Hyršlovi, Ph.D. za jeho pomoc s laboratorními koloniemi švábů a za možnost pracovat v insektáriu Ústavu experimentální biologie PřF MU. Děkuji také RNDr. Kristíně Křížové, Ph.D. a Mgr. Viktorii Bitušíkové za jejich pomoc s molekulárně-biologickými analýzami a zaškolení do příslušných metodických postupů.

Upřímné díky chci věnovat také svým rodičům za jejich dlouhodobou podporu, trpělivost a povzbuzování během celého mého studia. V neposlední řadě děkuji svému partnerovi, který mě po celou dobu psaní práce podporoval, motivoval a pomáhal mi překonávat náročnější období.



jihomoravský kraj



Anotace

Švábi jsou považováni za významné mechanické vektory lidských patogenů, zejména těch, které se šíří fekálně-orální cestou. Tato práce se zabývá výskytem vybraných protozoárních parazitů člověka v trávicím traktu švábů s cílem identifikovat jejich stadia, která by naznačovala dlouhodobé přetrvávání těchto organismů ve švábech, a tím i jejich potenciální roli jako rezervoáru nákazy. Cílem studie bylo pomocí mikroskopických a molekulárně-biologických metod detekovat potenciální lidské patogeny z řad prvoků ve střevě švábů získaných z chovných kolonií. Při vyšetření světelnou mikroskopií byl ve střevech švábů obecně pozorován bohatý střevní ekosystém, přičemž v zadní části střeva švábů z většiny analyzovaných kolonií byly zaznamenány četné vakuolární formy charakteristické pro rod *Blastocystis*. U některých vyšetřovaných jedinců byly navíc detekovány cysty měňavek rodu *Entamoeba*. Molekulární analýza však prokázala, že se v případě vyšetřovaných kolonií švábů nejednalo o lidské subtypy rodu *Blastocystis* ani o druh *Entamoeba histolytica*, který je významným patogenem člověka. Molekulárně identifikované izoláty rodů *Blastocystis* a *Entamoeba* ve skutečnosti představují linie specifické pro švábí hostitele a nepředpokládá se jejich patogenita pro člověka. Získané výsledky naznačují, že přestože střevo švábů poskytuje vhodné prostředí pro přežívání a v případě rodu *Blastocystis* dokonce i proliferaci těchto organismů, je nepravděpodobné, že by švábi chovaní v koloniích za standardizovaných podmínek představovali významné epidemiologické riziko pro člověka z hlediska potenciálního zdroje protozoárních infekcí.

Klíčová slova

Hmyzí vektor; střevo; parazit; *Blastocystis*; *Entamoeba*

Annotation

Cockroaches are considered important mechanical vectors of human pathogens, particularly those transmitted via the faecal–oral route. This study investigates the occurrence of selected human protozoan parasites in the digestive tract of cockroaches, with the aim of identifying developmental stages indicative of long-term persistence within the cockroach host and, consequently, their potential role as a reservoir of infection. The objective of the study was to detect potential human protozoan pathogens in the gut of cockroaches obtained from breeding colonies using microscopic and molecular biological methods. Light microscopic examination revealed a generally rich intestinal ecosystem in the cockroach gut. Numerous

vacuolar forms characteristic of the genus *Blastocystis* were observed in the hindgut of cockroaches from most analysed colonies. In addition, cysts of amoebae belonging to the genus *Entamoeba* were detected in some examined individuals. However, molecular analyses demonstrated that the examined cockroach colonies did not harbour human subtypes of *Blastocystis* nor the species *Entamoeba histolytica*, which is a significant human pathogen. The molecularly identified isolates of the genera *Blastocystis* and *Entamoeba* instead represent lineages specific to the cockroach host and are not expected to be pathogenic to humans. The results indicate that although the cockroach gut provides a suitable environment for the survival – and in the case of *Blastocystis*, even proliferation – of these organisms, cockroaches maintained in colonies under standardised conditions are unlikely to pose a significant epidemiological risk to humans as a source of protozoan infections.

Keywords

Insect vector; intestine; parasite; *Blastocystis*; *Entamoeba*

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Biologická charakteristika švábů	10
3.2	Druhy švábů a jejich ekologický význam	11
3.3	Morfologie a fyziologie trávicího traktu švábů	12
3.4	Střevní mikrobiota švábů	13
3.5	Protozoární infekce člověka	14
3.6	Způsoby přenosu parazitů mezi šváby a člověkem	16
3.7	Ekologické faktory ovlivňující výskyt parazitů u švábů	17
3.8	Význam švábů jako bioindikátorů	18
4	Materiál a metodika	19
4.1	Druhy švábů použité ve studii	19
4.2	Chov a údržba laboratorních kolonií švábů	20
4.3	Mikroskopické vyšetření stravného obsahu švábů	21
4.3.1	Pitva a odběr biologického materiálu	21
4.3.2	Nativní preparáty	21
4.3.3	Barvené preparáty	21
4.3.4	Identifikace nalezených prvoků	22
4.4	<i>In vitro</i> kultivace	23
4.5	Molekulární analýza trusu švábů	24
4.5.1	Odběr materiálu pro molekulární analýzu	24
4.5.2	Izolace DNA	24
4.5.3	Polymerázové řetězové reakce (PCR)	25
4.5.4	PCR amplifikace cílových úseků DNA (screeningová a specifická PCR)	25
4.5.5	Sekvenace amplikonů a bioinformatické zpracování	26
4.6	Potravní experimenty	27
4.6.1	Experimentální design	27
4.7	Prevence kontaminace a kontrolní postupy	28
5	Výsledky	29
5.1	Mikroskopické vyšetření střevního obsahu švábů	29
5.2	Molekulární analýza trusu švábů	30

5.2.1	Molekulární detekce rodu <i>Entamoeba</i>	31
5.2.2	Molekulární detekce rodu <i>Blastocystis</i>	31
5.2.3	Negativní nálezy	31
5.3	Výsledky potravních experimentů.....	32
5.3.1	Mikroskopická analýza střevního obsahu švábů	32
5.3.2	Molekulární analýza trusu švábů	32
6	Diskuze	34
6.1	Mikroskopické nálezy a jejich interpretace.....	34
6.2	Výhody a omezení použití mikroskopických metod	35
6.3	Přínos a interpretace molekulárních analýz.....	36
6.4	Potravní experimenty	37
6.5	<i>In vitro</i> kultivace	38
7	Závěr	40
8	Seznam použitých zkratk	41
9	Přílohy	42
10	Použitá literatura	50

1 Úvod

Švábi (řád Blattodea) patří mezi hmyz s **dlouhou evoluční historií a vysokou ekologickou plasticitou**, což jim umožňuje osidlovat široké spektrum přirozených i antropogenních prostředí. Díky své **všežravosti, schopnosti přežívat v různých podmínkách a častému kontaktu s kontaminovaným prostředím** jsou synantropní druhy švábů dlouhodobě považovány za potenciální přenašeče různých mikroorganismů, včetně parazitů [1–5]. Zatímco bakterie a parazitičtí červi přenášení šváby jsou relativně dobře prostudováni, úloha švábů v přenosu **parazitických prvků zůstává v mnoha ohledech nejasná** [5–7].

Parazitičtí prvoci představují významnou skupinu jednobuněčných eukaryotních organismů (Protista), z nichž řada druhů má zásadní význam pro lidské zdraví. Mezi lidsky patogenní protozoa patří zástupci několika hlavních taxonomických skupin, včetně kmene **Apicomplexa** (např. původci malárie, toxoplazmózy, kryptosporidiózy a kokcidiózy), **bičíkovci** (např. původci spavé nemoci a leishmaniózy) a **měňavky** kolonizující gastrointestinální trakt člověka [8–10]. Švábi jsou v literatuře popisováni jako **potenciální mechanické přenašeče** širokého spektra těchto patogenů, a to nejen střevních protozoí, ale i dalších mikroorganismů přítomných v kontaminovaném prostředí [2,11–15].

Tato práce se zaměřuje na studium parazitických prvků ve trávícím traktu laboratorně chovaných švábů s využitím kombinace **mikroskopických a molekulárně-biologických přístupů**. Zvláštní pozornost je věnována **odlišení lidských patogenů od endosymbiotických prvků běžné obývajících střeva švábů**, a posouzení role švábů jako potenciálních přenašečů či dalších hostitelů protozoárních parazitů člověka.

2 CÍLE PRÁCE

Hlavní cíl:

Cílem této práce je posoudit význam švábů jako potenciálních přenašečů a zdrojů protozoárních infekcí člověka, se zaměřením na detekci a identifikaci prvoků osídlujících trávicí trakt švábů chovaných v laboratorních koloniích a na posouzení faktorů, které mohou ovlivňovat jejich výskyt a diverzitu.

Dílčí cíle práce:

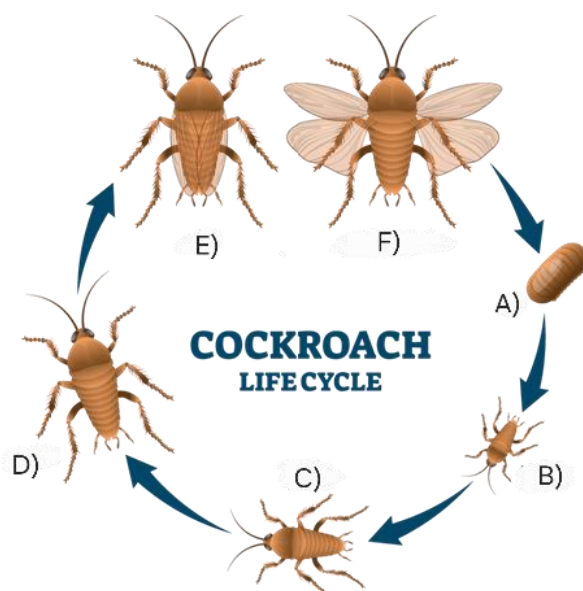
- Shrnout současné poznatky o biologii švábů a jejich roli v přenosu parazitických prvoků člověka.
- Charakterizovat druhy švábů studované v této práci, včetně jejich ekologických a biologických vlastností.
- Popsat a aplikovat postupy manipulace s koloniemi švábů, parazitologické pitvy, barvení a mikroskopického vyšetření střevního obsahu švábů.
- Provést potravní experimenty u vybraných druhů švábů s cílem identifikovat možné zdroje infekcí.
- Pomocí molekulárně-biologických metod ověřit, zda nalezené prvoky představují potenciální lidské patogeny.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Biologická charakteristika švábů

Švábi (třída Insecta, řád Blattodea) představují evolučně velmi starobylou skupinu hmyzu, jejíž původ sahá do období karbonu, tedy více než před 300 miliony let [4]. Díky své dlouhé evoluční historii se vyznačují vysokou ekologickou plasticitou a značnou schopností adaptace na široké spektrum environmentálních podmínek [4,16]. V současnosti je popsáno přibližně 4 600 druhů švábů, přičemž naprostá většina z nich obývá přirozené ekosystémy tropických a subtropických oblastí. Pouze omezený počet druhů, odhadovaný na přibližně 30, je synantropních a úzce vázaných na lidská obydlí [4].

Z ekologického hlediska jsou švábi výraznými všežravci a detritofágy. Jejich potrava zahrnuje rostlinné i živočišné zbytky, potraviny bohaté na sacharidy a lipidy, rozkládající se organický materiál, odpad i mikroorganismy [4,17]. Díky této potravní strategii hrají významnou roli v rozkladu organické hmoty a koloběhu živin v ekosystémech [17,18]. Zároveň se vyznačují vysokou fyziologickou odolností – jsou schopni přežívat dlouhá období bez potravy i vody a tolerují relativně široké rozmezí teplotních a vlhkostních podmínek [19,20].



Vývoj švábů je hemimetabolní, tedy nezahrnuje stádium kukly [21] (Obr. 1). Samice produkují ootéky, pevné vaječné schránky obsahující obvykle několik desítek vajíček; jejichž počet i způsob nošení se liší mezi jednotlivými druhy. U některých druhů je ootéka po vytvoření odkládána do prostředí, zatímco u jiných je po určitou dobu nošena samicí; u některých taxonů byla dokonce popsána i forma ovoviviparie nebo viviparie [16].

Obr. 1: Životní cyklus švába. A – vajíčko, B–D – nymfální instary, E – čerstvě vylíhlý dospělec (imágo), F – pohlavně dospělý, létající jedinec. (převzato z <https://ezpest-control.com/cockroach-control/>)

3.2 Druhy švábů a jejich ekologický význam

Švábi představují evolučně starou a mimořádně diverzifikovanou skupinu hmyzu, zahrnující několik tisíc popsaných druhů s výrazně rozdílnými ekologickými nároky, životními strategiemi a vztahem k člověku. Pouze relativně malá část těchto druhů je synantropních a trvale spjatých s lidskými obydlími, zatímco naprostá většina švábů obývá přirozené ekosystémy [16]. Urbanizované i volně žijící švábi zároveň hostí bohatou mikrobiotu na exoskeletu i v trávicím traktu, včetně bakteriálních skupin, které mohou mít vliv na jejich fyziologii i potenciální přenos patogenů [20,22]. V přirozených podmínkách se švábi vyskytují především v tropických a subtropických oblastech, a to zejména v lesních ekosystémech, kde obývají mikrohabitaty pod opadem listů, v tlejícím dřevě nebo v půdě. Tato prostředí se vyznačují vysokou dostupností organického materiálu a bohatou mikrobiální diverzitou [23]. Výrazná všežravost švábů a jejich schopnost využívat široké spektrum potravních zdrojů významně ovlivňují složení jejich střevní mikrobioty. Trávicí trakt švábů představuje **komplexní ekosystém**, v němž žije stabilní společenstvo virů, bakterií, kvasinek, prvoků a červů. Tato mikrobiota jim pomáhá **zpracovávat organickou hmotu**, ale může také ovlivňovat interakce s parazitickými organismy [24]. Tyto faktory mohou hrát zásadní roli ve výskytu a diverzitě endosymbiontů schopných kolonizovat střevo švábů, což je činí vhodným modelovým organismem pro studium vztahů mezi hostitelem, jeho mikrobiotou a parazitickými mikroorganismy [18].

Z hlediska medicínského významu jsou švábi tradičně považováni především za mechanické přenašeče širokého spektra patogenních či nepatogenních mikroorganismů (bakterií, virů, vajíček helmintů a prvoků), kteří se podílejí na pasivním šíření infekčních agens kontaminací povrchů či potravin [2]. K přenosu těchto organismů dochází buď pasivně na povrchu těla švábů, nebo prostřednictvím jejich trávicího traktu a následného vylučování trusem [1,2]. Nicméně existence stabilních komunit mikroorganismů v trávicím traktu, včetně různých střevních prvoků (např. nálevníci, bičíkovce, gregariny a měňavky), naznačuje, že švábi mohou být nejen mechanickými, ale i biologickými hostiteli různých skupin prvoků. Jako příklad lze uvést studii, jenž identifikovala četné typy protozoí ve střevě synantropního kosmopolita – ruse domácího (*Blattella germanica*) [18,25]. V posledních letech se objevují studie naznačující, že u některých mikroorganismů, zejména střevních prvoků, nemusí švábi fungovat pouze jako pasivní přenašeči, ale mohou představovat mezihostitele či dokonce hostitele finální [3,25], u nichž dochází k dlouhodobému přežívání nebo potenciálně i k

množení těchto organismů. Tento aspekt je předmětem intenzivního výzkumu a má významné implikace pro pochopení epidemiologie protozoárních infekcí a role synantropního hmyzu v jejich šíření [20,27].

Studium prvoků asociovaných se šváby vyžaduje zohlednění biologické a ekologické rozmanitosti jejich hostitelů. Laboratorní a terarijní chovy švábů se zaměřují především na druhy, které se dovedou dobře přizpůsobit umělým podmínkám, snadno se rozmnožují a vykazují stabilní životní cyklus [28]. Mezi nejčastěji chované patří zástupci rodů *Periplaneta*, *Blattella*, *Gromphadorhina* a *Blaberus* [21]. Tyto rody se vyznačují robustním tělem větších rozměrů (zejména rody *Gromphadorhina* a *Blaberus*) a vysokou tolerancí k proměnlivým podmínkám prostředí. Díky těmto vlastnostem jsou vhodné nejen pro chov v zajetí, ale také pro experimentální a výukové účely. Zároveň se mezi sebou liší ve svých ekologických nárocích, způsobu příjmu potravy a fyziologii trávicí soustavy, což se může odrážet ve složení jejich střevní mikrobioty, včetně přítomnosti různých taxonů prvoků [18]. Zahnutí zástupců různých rodů a ekologických skupin umožňuje nahlížet na vztahy mezi šváby a protozoárními endosymbionty v širším biologickém kontextu a přispívá k lepšímu pochopení faktorů, které ovlivňují výskyt a diverzitu těchto mikroorganismů. [22].

3.3 Morfologie a fyziologie trávicího traktu švábů

Trávicí systém švábů je anatomicky a funkčně přizpůsoben **všežravému způsobu života**, což se odráží v komplexní stavbě celého alimentárního kanálu. Podobně jako u jiného hmyzu se dělí na tři hlavní části – přední **střevo**, střední **střevo** a zadní **střevo**, které se navzájem liší svým embryonálním původem, histologickou organizací a primární funkcí [29]. **Přední střevo** je ektodermálního původu a je vystláno kutikulou. Začíná ústní dutinou a zahrnuje hltan, jícen, roztažitelné vole a svalnatý žaludek známý jako žvýkací žaludek neboli *proventriculus*. Vole slouží jako zásobárna potravy, kde dochází k jejímu dočasnému skladování a počátečnímu mechanickému zpracování. Proventriculus je vysoce specializovaná struktura s chitinózními zuby, které mechanicky rozemílají potravu na jemné části, aby umožnily efektivnější enzymatické trávení v následujících úsecích trávicího traktu [30]. Mezi žvýkacím žaludkem a středním střevem se nacházejí slepé výběžky střeva. **Střední střevo** představuje hlavní místo enzymatického trávení a vstřebávání živin, a je považováno za analogii „pravého žaludku“ obratlovců. Na rozdíl od předního a zadního střeva, které jsou vystlány kutikulární vrstvou, je epitel středního střeva tvořen glandulárními buňkami optimalizovanými pro produkci trávicích enzymů a absorpci nutrientů [29]. Luminální strana středního střeva je potažena peritroficou

membránou. Jedná se o tenkou, polopropustnou vrstvou bílkovin a chitinových mikrofibril, která obklopuje obsah střeva a chrání střevní epitel před mechanickým poškozením a invazí patogenů, přičemž umožňuje průchod trávicích enzymů a malých molekul [31]. Malpighiho trubice, které ústí na rozhraní mezi středním a zadním střevem, fungují jako hlavní vylučovací orgány švábů. Nejsou přímo součástí středního střeva, avšak jejich vývody významně ovlivňují chemické prostředí lumenu a metabolické procesy v trávicím traktu [29,32]. **Zadní střevo** je obvykle co do objemu největší částí trávicí trubice a dělí se na ileum (tenké střevo), kolon a rektum. Tyto části jsou vnitřně vystlány kutikulou, přičemž slouží k resorpci vody a minerálů a ke koncentraci nestrávených složek s následní tvorbou fekálních pelet. Díky relativně pomalému pohybu střevního obsahu, nízkému proudění trávicí tekutiny a vysokému obsahu organických zbytků se často považuje za ideální prostředí pro fermentační procesy a vznik symbiotických vztahů, které přispívají k trávení složitých polysacharidů, jako je celulóza [32].

Zadní část střeva poskytuje relativně stabilní mikrobiální prostředí s vysokou metabolickou aktivitou a představuje nejbohatší úsek trávicího traktu z hlediska osídlení mikroorganismy, včetně bakterií, kvasinek a různých prvoků [33]. Tento úsek často kolonizuje mikrobiota s vyšší diverzitou i abundancí mikroorganismů, což je důležité jak pro detekci parazitů, tak pro studium mezidruhových interakcí [24,33]. U řady hmyzích modelů bylo prokázáno, že mikrobiální populace a jejich funkce se mění podél délky trávicího traktu, přičemž koncentrace mikroorganismů obvykle stoupá směrem k zadní části, kde může vznikat prostředí příznivé pro anaerobní i mikroaerofilické populace [34]. Navíc, ve srovnání s předními úseky, kde dochází k rychlému průchodu potravy a intenzivní chemické degradaci nejprve působením travičkových enzymů a následně dalších hostitelských faktorů, poskytuje zadní střevo mikroorganismům delší rezidenční dobu, což zvyšuje pravděpodobnost jejich detekce [35]. Z výše uvedených důvodů se při laboratorním zpracování odebírá zejména zadní část trávicí trubice, ačkoliv výzkum často zahrnuje i ostatní úseky střeva [35].

3.4 Střevní mikrobiota švábů

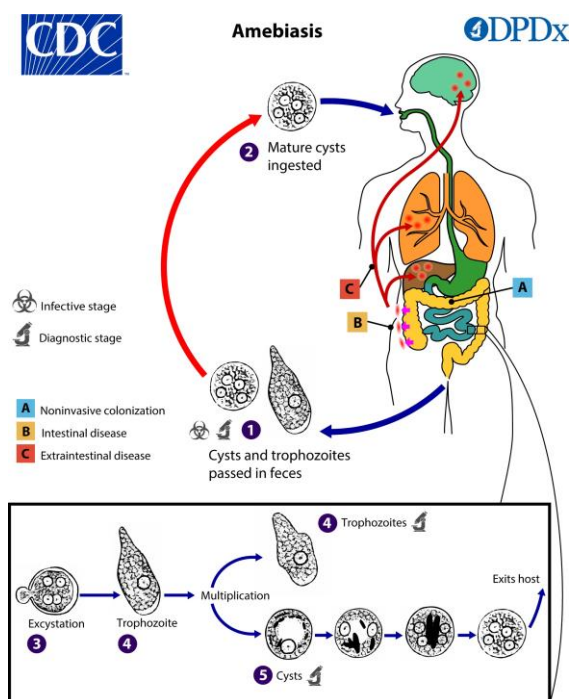
Jak již bylo zmíněno, střevo švábů je osídlen komplexním společenstvem mikroorganismů. Toto mikrobiální prostředí představuje nedílnou součást trávicího systému a ovlivňuje chemické i biologické podmínky ve střevním lumen [1,24]. Složení střevní mikrobioty švábů vykazuje relativní stabilitu a je do určité míry druhově specifické. Studie zaměřené na bakteriální společenstva ve střevě švábů poukazují na existenci tzv. core mikrobioty, která je sdílena napříč jedinci téhož druhu a vykazuje evoluční souvislosti s blízce příbuznými

skupinami, zejména s termity [23,24,37]. Tento vztah odráží dlouhodobou adaptaci mikrobiálních společenstev na detritofágní a všežravý způsob života hostitele. Vedle hostitelské specifity je střevní mikrobiota významně ovlivňována dietou. Experimentální studie prokázaly, že změny ve složení potravy mohou vést k posunům v relativním zastoupení jednotlivých taxonů bakterií ve střevě švábů, aniž by nutně došlo k úplnému narušení základní struktury mikrobiálního společenstva [24,38]. Tyto dietně indukované změny mohou ovlivňovat dostupnost živin, fermentační procesy a další mikroenvironmentální faktory ve střevě. Složení a stabilita mikrobiálních společenstev mohou významně ovlivňovat výskyt prvků a determinovat jejich kolonizační schopnost, přežívání ve střevním prostředí i interakce s hostitelem. Přítomnost prvků ve střevě švábů tedy nemusí odrážet pouze expozici infekčním stadiím (cystám) v kontaminovaném prostředí, ale i stav a složení střevní mikrobioty [1,18,24].

3.5 Protozoární infekce člověka

Prvoci zahrnují medicínsky významné parazitické taxony schopné vyvolávat jak střevní, tak systémová onemocnění u lidí. Většina těchto parazitů má životní cyklus zahrnující odolné formy (cystická stadia), které jim umožňují přežít mimo hostitelský organismus a šířit se fekálně-orální cestou [39]. Tyto organismy mohou kolonizovat různé části gastrointestinálního traktu a způsobovat klinicky významné střevní infekce člověka i zvířat [40,41].

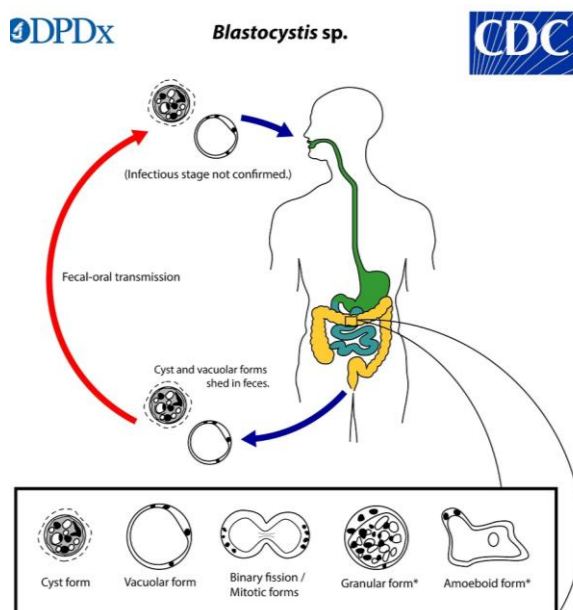
Entamoeba spp. (Amoebozoa, Archamoebae) představují skupinu améb kolonizujících střeva lidí i zvířat [1,18,24]. Některé druhy jsou patogenní a mohou vyvolat amébovou dysentérii či dokonce extraintestinální infekci. Šíří se fekálně-orální cestou prostřednictvím odolných cyst, které mohou přežít ve vnějším prostředí a po požití se excystují v trávicím traktu hostitele (Obr. 2). Kromě střevního postižení mohou některé



Obr. 2: Životní cyklus rodu *Entamoeba* (převzato z <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>). K infekci *E. histolytica* dochází požitím cyst, které se v tenkém střevě excystují a uvolní trofozoity. Trofozoity migrují do tlustého střeva a mohou zůstat omezeni na jeho lumen (A: neinvazivní infekce), přičemž i nadále dochází k vylučování cyst stolicí (asymptomatické nositelé). Trofozoiti mohou napadat střevní sliznici (B: střevní onemocnění) nebo se šířit krevním řečištěm do dalších orgánů (C: extraintestinální onemocnění). Trofozoiti se množí binárním dělením a produkují cysty.

patogenní druhy invadovat střevní stěnu a hematogenním rozsevem se šířit do dalších orgánů, například jater, což vede k závažným systémovým komplikacím. Jejich durhová diverzita je důležitá i pro tuto práci, protože různý zástupci rodu *Entamoeba* mohou být detekovány u švábů, čímž se stávají relevantními jako mechanický či biologický rezervoár pro šíření cyst v prostředí a případně i mezi hostiteli [42–44].

***Blastocystis* spp.** (SAR, Stramenopiles, Opalozoa) představují geneticky velmi různorodou skupinu protozoí, které kolonizují tlusté střevo lidí i zvířat [8]. Taxonomická historie rodu *Blastocystis* je komplikovaná; zpočátku byly tyto organismy zaměňovány za houbu, výtrusovce nebo cystu jiného organismu. Životní cyklus tohoto organismu není dosud zcela objasněn (Obr. 3) a přenos probíhá fekálně-orální cestou [41,45]. Jejich role jako patogenů je stále předmětem diskuse, neboť mohou být nalezeny jak v asymptomatických, tak v symptomatických jedincích, u nichž byly spojovány s příznaky jako jsou průjem, bolesti břicha, nadýmání či blíže nedefinované gastrointestinální potíže. Nedávné studie naznačují, že *Blastocystis* může být normální součástí anebo indikátorem zdravého střeva [46,47]. Člověk může hostit až 16 subtypů *Blastocystis* [48].



Obr. 3: Životní cyklus *Blastocystis* sp. (převzato ze <https://www.cdc.gov/dpdx/blastocystis/index.html>). Cysta (3–5 µm) je považována za infekční stádium, ale nebyla potvrzena. Převládající je vakuolární forma dosahující 5–40 µm, která je schopná se binárně dělit. Další formy zahrnují formy granulární a ameboidní, jejichž biologická role a další vývoj vyžadují další zkoumání.

Giardia intestinalis (Diplomonadida, Metamonada) je prvok jenž parazituje v duodenu [8]. Způsobuje střevní onemocnění zvané giardióza – infekce charakterizované průjmy, bolestmi břicha, nadýmáním či malabsorpcí. Šíří se fekálně-orální cestou prostřednictvím odolných cyst, které mohou kontaminovat vodu, potraviny či různé povrchy a po jejich požití excystují ve duodenu hostitele. Trofozoiti kolonizují duodenum a jejunum, kde se volně pohybují v lumen nebo se přichycují pomocí přísavných disků po stranách klků. Poškození mikrokloků epitelu vede ke snížení absorpce živin a malabsorpci, což je charakteristickým rysem giardiózy [49]. Na rozhraní jejunum a ileum znovu encystují, během encystace probíhá mitóza. Cysty jsou

vylučovány stolicí. Parazit má i zoonotický potenciál. Může přetrvávat i ve formě asymptomatické infekce, přičemž nerozpoznané nosičství přispívá k dalšímu přenosu [50].

***Cryptosporidium* spp.** jsou výtrusovci (Apicomplexa), která způsobují kryptosporidiózu – onemocnění spojené s průjemovitým onemocněním, dehydratací a zvracením [51,52]. K přenosu dochází fekálně-orální cestou. Po požití sporulovaných oocyst dochází k excystaci a uvolní se infekční sporozoiti [53]. Transformací sporozoitů vznikají endogenní stadia (trofozoiti a gamonti) jenž epicelulárně parazitují epiteliální buňky, nejčastěji v trávicím traktu, méně často však ve výstelce dýchacího systému, v játrech, slinivce břišní, žlučníku a dalších orgánech. Tlustostěnné oocysty jsou z hostitele vylučovány do prostředí, zatímco tenkostěnné oocysty jsou zdrojem autoinfekce. Oocysty jsou infekční bezprostředně po vyloučení stolicí a jsou velmi odolné vůči běžným dezinfekčním postupům. Existuje více než 40 uznaných druhů, které postihují různé hostitele, přičemž deset z nich představuje zoonotické riziko, osm postihuje hospodářská zvířata a tři drůbež [54]. U plně imunitně vybavených jedinců dochází často k samovyždravení, zatímco u imunokompromitovaných pacientů může průběh nemoci být život ohrožující [55].

Výše uvedené střevní protozoární infekce mají celosvětovou distribuci a jejich incidence je ovlivněna hygienickými a socioekonomickými podmínkami [15,56]. Šíření probíhá především prostřednictvím kontaminované vody, potravin nebo kontaktu s fekáliemi, což je důvod, proč jsou tyto parazity významné především v oblastech s nízkou úrovní sanitace. Nevyhýbají se však ani zemím s vyšší úrovní hygieny. Infekce parazitickými prvoky mohou probíhat asymptomaticky a bez klinických projevů, přičemž asymptomatictí nosiči představují významný rezervoár infekce. Švábi zde mohou fungovat především jako mechanický vektor [57], zatímco jejich role jako biologických hostitelů zůstává u většiny těchto patogenů nedostatečně prokázána [58]. Synantropní druhy švábů se často živí detritem a fekáliemi a snadno přecházejí mezi kontaminovanými substráty a potravinami, čímž zvyšují riziko přenosu infekčních stadií na člověka [6].

3.6 Způsoby přenosu parazitů mezi šváby a člověkem

Parazitické organismy spojené s gastrointestinálním traktem mohou být přenášeny mezi prostředím a hostiteli několika mechanismy. Prostřednictvím synantropních druhů švábů (Blattodea) se uplatňují především dva základní typy přenosu – mechanický a biologický – které můžou sloužit k šíření humánně vyznaných parazitů a jejich infekčních stadií [2].

Mechanický přenos spočívá ve fyzickém transportu infekčních stadií patogenů na povrchu těla švábů nebo v jejich trávicím traktu, aniž by v organismu švába docházelo k jejich vývoji či množení [7]. Infekční cysty nebo oocysty (sporocysty) se mohou zachytit na jejich kutikule nebo být pozřeny spolu s kontaminovaným materiálem a následně uvolněny do prostředí při kontaktu s potravinami, povrchy nebo vodou [2,3]. U střevních prvoků, jako jsou *Entamoeba* spp. nebo *G. intestinalis*, byla přítomnost cyst opakovaně prokázána jak na povrchu tak i ve střevním obsahu švábů, což ukazuje na jejich roli mechanických přenašečů [6,58].

Biologický přenos představuje situace, kdy patogen po určitou dobu přežívá ve střevě švába a může si zachovat infekčnost. Švábi však nejsou typickými biologickými vektory ve smyslu dokončení životního cyklu parazitů; jejich trávicí trakt může sloužit spíše jako přechodné rezervoárové prostředí prodlužující životnost infekčních stadií a zvyšující pravděpodobnost jejich dalšího přenosu [6,59].

Epidemiologický význam švábů je dán především schopností přenášet rezistentní cysty a oocysty prvoků, jako jsou *Entamoeba* spp., *G. intestinalis*, *Blastocystis* spp. a *Cryptosporidium* spp., které jsou odolné vůči podmínkám vnějšího prostředí a mohou dlouhodobě přežívat mimo hostitele [60]. Riziko přenosu je zvýšené zejména v prostředích s nedostatečnou hygienou a vysokou abundancí synantropního hmyzu [6,58].

3.7 Ekologické faktory ovlivňující výskyt parazitů u švábů

Výskyt parazitických prvoků u švábů je ovlivněn kombinací environmentálních a ekologických faktorů, které určují míru jejich expozice kontaminovaným zdrojům. Mezi nejvýznamnější patří teplota, vlhkost, dostupnost potravy, populační hustota a hygienická úroveň prostředí [3,61]. Teplé a vlhké mikroklima, které švábi preferují, vytváří zároveň příznivé podmínky pro přežívání infekčních stadií prvoků. Zvýšená relativní vlhkost podporuje dlouhodobou perzistenci cystických forem v prostředí i jejich setrvávání na povrchu těla nebo ve výkalech švábů [61]. Významným faktorem je rovněž typ potravy a míra kontaminace prostředí. Jedinci žijící v blízkosti odpadů, kanalizací a zdrojů fekální kontaminace vykazují vyšší prevalenci parazitů než švábi pocházející z hygienicky kontrolovaných prostředí [3,58]. Synantropní druhy, jako *Blattella germanica* a *Periplaneta americana*, které se běžně vyskytují v kuchyních, skladech potravin a kanalizačních systémech, jsou vystaveny vyššímu riziku kontaktu s infekčními stadii protozoí [27]. Naproti tomu laboratorně chované druhy udržované v izolovaných podmínkách vykazují nižší míru expozice exogenním parazitům [3,27,61].

Prevalence protozoárních parazitů ve švábech se tedy mezi jednotlivými studiemi výrazně liší v závislosti na typu prostředí, zdrojích potravy a použitých diagnostických metodách. Tyto faktory je proto nutné zohlednit při interpretaci laboratorních nálezů i při hodnocení potenciálního epidemiologického rizika [61].

3.8 Význam švábů jako bioindikátorů

Švábi mohou sloužit jako vhodné bioindikátory hygienického stavu prostředí a míry mikrobiální a parazitární kontaminace. Díky svému synantropnímu způsobu života, kontaktu s organickými zbytky a pohybu mezi kontaminovanými a čistými prostory odrážejí aktuální úroveň environmentální zátěže [4,62]. V prostředích s vysokým výskytem švábů byla opakovaně prokázána zvýšená přítomnost střevních bakterií, kvasinek a vývojových stádií střevních parazitů, včetně cyst prvoků. Analýza povrchových stěrů a střevního obsahu švábů tak může sloužit jako nepřímý ukazatel fekální kontaminace a hygienických podmínek prostředí [3,61,63]. Odolnost vůči nepříznivým podmínkám a dostupnost chovných kolonií činí ze švábů praktický a ekonomicky nenáročný modelový organismus pro studium mikrobiální a parazitární kontaminace prostředí. Jejich význam spočívá především v roli indikátorů hygienického stavu, nikoli pouze v jejich funkci potenciálních přenašečů patogenů [21].

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Druhy švábů použité ve studii

V experimentální části práce bylo použito několik druhů a kolonií švábů chovaných v laboratorních podmínkách v prostorách Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity (dále PřF MU). Část kolonií byla převzata z chovů jiných českých institucí, jejichž zakladatelé pocházeli z volného odchytu z různých geografických oblastí, zatímco další kolonie byly založeny z jedinců odchycených lokálně. Některé kolonie byly v laboratorních podmínkách udržovány po delší dobu, jiné byly na pracoviště zavedeny v nedávné době vedoucí této práce, pracující na Ústavu botaniky a zoologie PřF MU. Všechny použité kolonie byly k experimentálním účelům poskytnuty v rámci probíhajícího výzkumu se souhlasem odpovědných zaměstnanců obou pracovišť. Zvolené druhy se liší mírou vazby na člověka, ekologickými nároky i epidemiologickým významem, což umožňuje srovnávací hodnocení jejich potenciální role v přenosu prvků [1,23].

Blattella germanica je nejrozšířenější synantropní druh švába, délka těla 10–15 mm. Běžně se vyskytuje v lidských obydlích a provozech. Z epidemiologického hlediska patří mezi nejvýznamnější mechanické přenašeče mikroorganismů a parazitů [64].

Blatta orientalis je synantropní druh dorůstající 20–27 mm, typicky vázaný na chladnější a vlhké prostředí, často v kanalizačních systémech a sklepech. Je považován za epidemiologicky významný druh s častým kontaktem s odpady [22,65].

Periplaneta americana je velký synantropní druh (až 40 mm) kosmopolitního rozšíření. Patří mezi nejčastěji studované epidemiologicky významné druhy, u nichž byla opakovaně prokázána přítomnost různých bakterií, helmintů i parazitických prvků [66].

Periplaneta australasiae je menší druh rodu *Periplaneta* dorůstající 30–35 mm, preferující teplé a vlhké prostředí. Vyskytuje se v blízkosti organického materiálu a vegetace, což může zvyšovat pravděpodobnost kontaktu s půdními mikroorganismy [67].

Blaptica dubia pocházející z Jižní Ameriky a dorůstající délky 40–45 mm. V laboratorních chovech je běžně využíván jako modelový organismus a krmný hmyz. Jeho epidemiologický význam je považován za nízký, proto slouží jako vhodný kontrolní druh [21].

Gromphadorhina portentosa je velký nelétavý šváb dorůstající až 70 mm, běžně chovaný v laboratorních a výukových chovech. Epidemiologický význam tohoto druhu je nízký a je vhodný pro studium střevní mikrofauny v izolovaných podmínkách [68].

Gromphadorhina oblongonota je blíže příbuzný a morfologicky velmi podobný druhu *G. portentosa*, ale obvykle dorůstá ještě větších rozměrů. Je rovněž endemitem Madagaskaru [69].

Blaberus craniifer je tropický druh ze Střední Ameriky a Karibiku, dorůstající délky 45–55 mm. Běžně chovaný v laboratorních podmínkách. Epidemiologický význam je ve srovnání se synantropními druhy nízký [70].

Blaberus discoidalis je tropický druh dorůstající přibližně 50 mm, využívaný zejména v neurobiologickém a parazitologickém výzkumu [71].

Pycnoscelus femapterus je méně studovaný druh příbuzný *P. surinamensis*. Informace o jeho parazitární fauně jsou omezené, což umožňuje rozšíření poznatků o výskytu střevních prvocích v zástupcích této skupiny [72].

Blíže neurčený zástupce čeledě Blattidae, u něhož nebylo možné určit druh na základě morfologických znaků. Jedinci této skupiny pocházeli z Filipín a vykazují typické znaky synantropních švábů, včetně všežravosti a preference vlhkého prostředí.

4.2 Chov a údržba laboratorních kolonií švábů

Jednotlivé druhy byly chovány odděleně v plastových chovných nádobách s ventilačními otvory. Jako substrát byly použity dřevěné piliny, přičemž v nádobách byly umístěny i kartonové obaly sloužící jako úkryt a environmentální obohacení. Chovné nádoby byly pravidelně čištěny a substrát byl vyměňován v pravidelných intervalech. Chov probíhal v stabilních podmínkách při teplotě 26,5 °C a relativní vlhkosti 30 – 35 %. Světelný režim odpovídal fotoperiodě 16 : 8? (světlo: tma). Švábi byli krmeni převážně rostlinnou potravou,

zejména salátem, mrkví, okurkou a jablky, která zároveň sloužily jako hlavní zdroj tekutin. Doplňkově byli krmeni suchým chlebem a granulovaným krmivem pro kočky. V případě potřeby byla voda poskytována formou navlhčené vaty v Petriho misce.

4.3 Mikroskopické vyšetření stravného obsahu švábů

4.3.1 Pitva a odběr biologického materiálu

Kromě chovu švábů byla práce prováděna v laboratořích pracovní skupiny Parazitologie na Ústavu zoologie a ekologie PřF MU. Jedinci byli nejprve uspáni oxidem uhličitým, poté byli nůžkami ostříhnuté poslední 1-2 články zadečku a následně pinzetou opatrně vytaženo celé střevo. Okolní tuková tkáň byla odstraněna a k dalšímu zpracování byla používána převážně zadní část střeva. Střevo bylo umístěno do kapky hmyzího Ringerova roztoku na podložním sklíčku, jemně rozstřiženo a rozetřeno, aby se uvolnil střevní obsah. Preparát byl zakryt krycím sklíčkem a ihned vyhodnocen (do 1 hodiny) pod světelným mikroskopem. Pozorování probíhalo při zvětšení $100\times$ ($10\times$ okulár $\times$ $10\times$ objektiv) až $1000\times$.

4.3.2 Nativní preparáty

Nativní roztěrové a roztlakové (nebarvené) preparáty představují základní metodu mikroskopického vyšetření střevního obsahu. Umožňují pozorovat pohyblivá stadia prvoků, jejich chování a interakce s okolním prostředím. Tato metoda je vhodná zejména pro detekci bičíkovců a nálevníků, jejichž pohyb je důležitým diagnostickým znakem [73]. Preparát se připravuje, jak již bylo zmíněno, roztlakem/roztěrem střevního obsahu v Ringerově roztoku a zakrytím krycím sklíčkem. Vyšetření bylo provedeno bezprostředně po přípravě preparátu, aby se zachovala vitalita střevních organismů. Pozorování probíhalo při zvětšeních $100\times$, $200\times$, $400\times$ a $1000\times$ (s imerzí). Nativní preparát umožnil sledovat živé formy parazitů, a to zejména pohyb nálevníků, měňavek, hlístic a přítomnost bakteriální flóry.

4.3.3 Barvené preparáty

Pro přesnější morfologickou identifikaci prvoků byly používány fixované a barvené preparáty. Tyto metody umožňují lepší kontrast buněčných struktur, zvýraznění jader a odlišení parazitů od buněčného detritu a bakteriální flóry [73,74]. Barvené preparáty byly pozorovány při zvětšení $400\times$ až $1000\times$ (s imerzí). V této práci byly použity dvě základní metody barvení: **Lugolovo barvení** (jódovým roztokem) a **barvení podle Giemsy**.

Barvení nativního preparátu Lugolovým roztokem bylo v této práci využito jako rychlá orientační metoda pro mikroskopické vyšetření střevního obsahu švábů. Jódový roztok zvyšuje kontrast preparátu a umožňuje lepší rozlišení cystických forem prvoků jako jsou měňavky a zástupci rodu *Blastocystis*. Princip metody spočívá v reakci jódu s polysacharidy, především s glykogenem, který je přítomen v cytoplazmě některých protozoí. Díky tomu dochází ke zvýraznění vnitrobuněčných struktur, zejména jader a glykogenových vakuol, což usnadňuje morfologické hodnocení cystických stádií [75,76].

Postup: Barvení bylo prováděno přímo na čerstvě připraveném nativním preparátu v Ringerově roztoku, kdy byl na podložní sklíčko sterilní pipetou přikápnut 1% Lugolův roztok v poměru 1: 1 (Lugol: Ringerův roztok). Preparát byl následně jemně promíchán, zakryt krycím sklíčkem a ihned pozorován světelným mikroskopem.

Barvení podle Giemsy patří mezi nejčastěji používané metody v parazitologii. Barvivo zvýrazňuje jádra a cytoplazmu buněk, čímž usnadňuje morfologickou identifikaci střevních prvoků. Metoda je vhodná zejména pro pozorování zástupců rodů *Entamoeba*, *Giardia* a *Blastocystis* [77,78]. Giemsovo barvení umožňuje kontrastnější zobrazení protozoí a jejich odlišení od okolního buněčného detritu, bakterií a tukových kapének [73,79]. Metoda byla využívána zejména k potvrzení nálezů z nativních preparátů a k dokumentaci morfologických znaků pomocí digitální mikrofotografie.

Postup: Po přípravě nativního preparátu byl střevní obsah rozetřen na podložní sklíčko a ponechán k zaschnutí na vzduchu. Následně byly preparáty fixovány ponořením do methanolu po dobu 60 sekund, čímž došlo k usmrcení organismů a zachování jejich morfologické struktury. Po fixaci byly preparáty přeneseny do kyvety s Giemsovým roztokem, ve kterém byly ponechány po dobu 20–25 minut. Poté byla sklíčka třikrát krátce promyta vodou za účelem odstranění přebytečného barviva a následně ponechána k zaschnutí. Takto připravené preparáty byly pozorovány světelným mikroskopem při zvětšení 200× až 1000× (s imerzí).

4.3.4 Identifikace nalezených prvoků

Identifikace prvoků nalezených ve střevním obsahu švábů byla prováděna především mikroskopicky na základě definovaných morfologických znaků. Při vyhodnocování preparátů byla zohledněna kombinace několika kritérií, která umožňují orientační zařazení organismů do jednotlivých taxonů. Mezi sledované znaky patřil zejména tvar a velikost buněk, charakter cytoplazmy, počet a poloha jader, přítomnost bičíků nebo pseudopodií a v případě živých buněk

také charakter jejich pohybu. Pohybové rysy byly hodnoceny u nativních nebarvených preparátů, kde bylo možné rozlišit typický klouzavý pohyb měňavek, aktivní pohyb bičíkovců nebo koordinovaný pohyb nálevníků [73]. U měňavek (*Entamoeba* spp.) byla hodnocena přítomnost pseudopodií, velikost buněk a struktura jader, přičemž morfologická identifikace byla považována za orientační [74]. U rodu *Blastocystis* byla sledována zejména velikostní a tvarová variabilita buněk, počet a poloha jader, přítomnost a velikost centrální vakuoly, která je charakteristická pro vakuolární stadium tohoto rodu [78,80]. Získané údaje se zapisovaly do laboratorního deníku. Každý preparát se byl označen zkratkou odvozenou z druhu analyzovaného švába, jako i datem a typem barvení.

4.4 *In vitro* kultivace

Kultivace střevních prvoků v podmínkách *in vitro* byly v rámci této práce využívány především ke studiu dlouhodobě udržovaných xenických kultur (společně s bakteriemi nebo jinými mikroorganismy přítomných ve střevním obsahu), sledování jejich životaschopnosti a k následnému mikroskopickému vyšetřování. Použité kultury byly založeny na pracovišti Ústavu botaniky a zoologie PřF MU ještě před započítím předkládané odborné práce, a to z materiálu získaného ze střevního obsahu švábů a z vybraných lidských izolátů *Blastocystis* (sloužících jako pozitivní kontrola) [81]. Autorka práce se na samotném zakládání kultur neúčastnila; v průběhu této práce pracovala s již existujícími kulturami a podílela se na jejich udržování, pravidelném přetáčení a mikroskopické kontrole. Práce se živými lidskými izoláty a organismy potenciálně patogenními pro člověka byla prováděna pracovníky pracoviště v souladu s platnými bezpečnostními a etickými předpisy. Autorka práce s těmito izoláty nemanipulovala a podílela se pouze na mikroskopickém hodnocení již připravených preparátů.

Kultury s potvrzenou přítomností *Blastocystis* a měňavek byly udržované *in vitro* v Jonesovém médiu [82] v uzavřených kultivačních zkumavkách v inkubátoru při teplotě 37 °C. Kultury byly udržovány dlouhodobě – po dobu několika měsíců až více než jednoho roku - a pravidelně přeočkovány dvakrát týdně. Přeočkování spočívalo v přenosu části buněčné suspenze do čerstvého sterilního média za sterilních podmínek [81]. Veškeré manipulace s kulturami probíhaly v biohazard boxu, který byl před prací i po ní sterilizován UV světlem po dobu 30 minut. Bakterie z původního střevního izolátu byly považovány za přirozenou součást kultivačního systému. Kontrola složení a životaschopnosti kultur byla prováděna pravidelným mikroskopickým vyšetřením. Vzorky byly odebírány z horní vrstvy kultivačního média i z

oblasti těsně nad sedimentovaným materiálem na dně zkumavky, kde se často nacházela nejvyšší koncentrace sledovaných prvků. Odebraný materiál byl nanesen na podložní sklíčko a nativní preparát byl bezprostředně vyšetřen pod světelným mikroskopem.

4.5 Molekulární analýza trusu švábů

Molekulárně-biologické metody byly v této práci využity k detekci a identifikaci prvků na základě jejich genetické informace. Polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňuje cílenou amplifikaci specifických úseků DNA a představuje standardní nástroj v parazitologickém výzkumu [83,84], zejména v případech, kdy morfologická identifikace není dostatečná. PCR analýzy byly prováděny na DNA izolované z trusu. Metodika zahrnovala izolaci DNA, amplifikaci cílových genetických oblastí pomocí univerzálních i druhově specifických PCR reakcí, následnou detekci amplifikačních produktů elektroforézou a u vybraných vzorků také sekvenační analýzu PCR produktů [85].

4.5.1 Odběr materiálu pro molekulární analýzu

Pro molekulární analýzu byl využit trus laboratorně chovaných švábů. Před odběrem byli jedinci po dobu tří týdnů izolováni a třikrát týdně přemísťováni do čistých krabiček, krmeni jednotnou potravou, aby se minimalizoval vliv rozdílů v dietě na složení střevního. Po této aklimatizační fázi byl čerstvý trus jednotlivých druhů odebrán do sterilních mikrozkmavek. Každý druh švába byl chován odděleně v samostatné kolonii, přičemž trus jedinců z jedné kolonie byl sloučen (tzv. pooling vzorků) do jedné mikrozkmavky. Bylo dbáno, aby ve všech mikrozkmavkách bylo co nejpodobnější množství materiálu s cílem zajistit srovnatelné podmínky pro molekulární analýzu. Odebrané vzorky byly bezprostředně po odběru zmrazeny na -20 °C a uchovávány při nízké teplotě až do doby izolace DNA. Tento postup umožnil stabilizaci genetického materiálu a minimalizoval jeho degradaci před dalším zpracováním [86].

4.5.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena ze zmrazených fekálních vzorků švábů pomocí komerčního kitu **PSP Spin Stool DNA Kit** (Invitek Molecular GmbH, Německo) podle protokolu výrobce [87]. Tento typ materiálu (trus) obsahuje směs DNA hostitele, střevních prvků a dalších mikroorganismů přítomných ve střevním obsahu, včetně zbytků potravy hostitele. Výsledná

izolovaná DNA tak zahrnovala jak DNA švábů, tak DNA organismů přítomných ve jejich střevním obsahu. Po izolaci byla DNA uchovávána při -20 °C až do dalšího zpracování. Koncentrace a kvalita izolované DNA byly stanoveny spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop a vyjádřeny v ng/μl. Použitelnost izolované DNA pro následné molekulární analýzy byla ověřena úspěšností PCR amplifikace [87].

4.5.3 Polymerázové řetězové reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je laboratorní metoda umožňující selektivní amplifikaci specifických úseků DNA *in vitro*. Princip PCR spočívá v opakovaném cyklování tří základních kroků: denaturace dvoušroubovice DNA, nasedání oligonukleotidových primerů na komplementární sekvence cílové DNA a následné prodlužování nově syntetizovaného řetězce katalyzované DNA polymerázou. Díky opakování těchto cyklů dochází k exponenciálnímu nárůstu množství cílového fragmentu, což umožňuje získat dostatečné množství amplifikovaného produktu i z velmi malého množství výchozí DNA [88].

V této práci byla PCR využita k detekci a druhově specifické identifikaci prvků, konkrétně rodů *Entamoeba* a *Blastocystis*, a to na základě analýzy SSU rRNA (18S rRNA).

4.5.4 PCR amplifikace cílových úseků DNA (screeningová a specifická PCR)

Postup PCR analýzy v této práci zahrnoval kombinaci screeningové univerzální PCR a druhově či subtypově specifických PCR reakcí, které dohromady umožnily ověřit přítomnost cílových taxonů a rozlišit jednotlivé genetické linie.

Univerzální PCR (**snPCR**) byla provedena prvně, probíhala ve dvou na sebe navazujících krocích a byla zaměřená na konzervované úseky genomu typické pro sledované prvoky. Složení reakčních směsí a teplotní profily reakcí byli optimalizované na základě literatury [89,90]. Reakční směs pro druhý krok snPCR měla obdobné složení pouze s tím rozdílem, že jako templát byl použitý 1 μl nepřečištěného PCR produktu z první reakce. Tato reakce sloužila jako počáteční screening pro detekci DNA měňavek rodu *Entamoeba* a umožnila tak identifikovat vzorky vhodné pro následnou specifickou amplifikaci. U vzorků pozitivních ve screeningové reakci následovala druhově/specificky cílená PCR, využívající primery navržené pro přesnou identifikaci vybraných taxonů.

Specifické PCR (**ssPCR**) na reakce byly zaměřeny detekci jednotlivých linií *Entamoeba histolytica* a na amplifikaci cílových úseků charakteristických pro rod *Blastocystis* s možností jejich následné subtypizace. Cyklovací podmínky a složení reakční směsi druhově specifické PCR pro rod *Entamoeba* odpovídaly standardním protokolům optimalizovaným pro dané primery [91], a byly stejné jako u druhově nespecifické amplifikace popsané výše. Pro detekci zástupců rodu *Blastocystis* byla použita amplifikace dle zveřejněné studie [92] s primery amplifikujícími úsek malé ribozomální podjednotky 18S [93,94]. Agarózová gelová elektroforéza a vizualizace PCR produktů

PCR produkty byly vyhodnoceny pomocí agarózové gelové elektroforézy. Tato metoda umožnila ověřit přítomnost amplikonů očekávané velikosti a posoudit kvalitu amplifikace [95].

Agarózový gel (2%) byl připraven rozpuštěním 1 g agarózy pro DNA elektroforézu (SERVA, Německo) v 50 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru (TRIS, EDTA, kyselina boritá). Směs byla v Erlenmeyerově baňce následně zahřátá v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění. Po ochlazení na ~60 °C bylo do agarózového gelu přidáno detekční interkalační barvivo GoodView (SBS Genetech, Čína) a roztok byl nalit do formy se vsazeným hřebínkem. Po ztuhnutí gelu byl tento přemístěn do elektroforetické vany připojené ke zdroji elektrického proudu. Do jednotlivých jamek byl pipetován PCR produkt smíchaný s nanášecím barvivem (6x TriTrack loading dye, Thermo Fisher Scientific, USA) a zároveň také molekulární velikostní marker O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), který sloužil k odhadu velikosti vzniklých amplikonů [95]. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100V po dobu 30 min. Přítomnost DNA fragmentů byla vizualizována na transiluminátoru pod UV světlem a zdokumentována fotograficky.

4.5.5 Sekvenace amplikonů a bioinformatické zpracování

Vybrané pozitivní amplikony PCR (pro rody *Entamoeba* a *Blastocystis*) byly dále analyzovány sekvenací za účelem potvrzení specifity amplifikace a porovnání získaných sekvencí s referenčními databázemi.

PCR produkty byly před sekvenací přečištěny enzymatickou metodou s pomocí **EPPIC Fast Kitu** (A&A Biotechnology, Polsko) přesně podle protokolu výrobce, který umožňuje odstranění zbytkových primerů a nukleotidů [96]. Přečištěné PCR produkty sloužily jako templát pro přípravu Sangerovy sekvenační reakce s použitím kitu **BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit** (Applied Biosystems via Thermo Fisher Scientific, USA). Každý vzorek

byl sekvenován z obou stran (forward i reverse primerem). Pro zlepšení kvality signálu a redukci sekvenačních artefaktů byl použit **BDX64 Dye Enhancing Buffer** (Molecular Cloning Laboratories – MCLAB, USA) a byly aplikovány optimalizované podmínky cyklování doporučené výrobcem kitu [97]. Připravené sekvenační reakce byly přečištěny pomocí **BigDye XTerminator™ Purification Kit** (Thermo Fisher Scientific, USA) [98] a analyzovány kapilární elektroforézou na automatickém sekvenátoru **ABI 3130 Genetic Analyzer**. Data byla vyhodnocena softwarem **Sequencing Analysis Software v5.3.1** (Thermo Fisher Scientific, USA) a **Sequencher 5.0** (Gene Codes Corporation, USA). Získané sekvence byly následně porovnány s již publikovanými sekvencemi uloženými v databázi **GenBank** (National Center for Biotechnology Information – NCBI, USA), aby byla určena druhová příslušnost amplifikovaných organismů.

4.6 Potravní experimenty

Složení potravy může ovlivňovat střevní mikroprostředí, a tím i přítomnost parazitů [18,38]. Cílem potravních experimentů bylo zjistit, zda rozdílné krmivo může u vybraných druhů švábů vést ke změnám v zastoupení prvoků, se zaměřením na rody *Entamoeba* a *Blastocystis*. Dalším cílem experimentu bylo otestovat, zda krmení švábů zbytky ovoce a zeleniny z kompostu (zdroj organického odpadu větší skupiny lidí) a salátem zakoupeným v supermarketu (obtížně omyvatelná potravina) může vést ke kontaminaci švábů lidskými patogeny.

4.6.1 Experimentální design

Do potravních experimentů byly zařazeny čtyři druhy laboratorně chovaných švábů: *Periplaneta americana*, *P. australasiae*, *Blattella germanica* a *Gnathophilus portoricensis*. Každý druh byl vystaven třem typům potravy: 1) **ledový salát**, 2) **kompostované zbytky rostlinné potravy** a 3) **granule pro kočky** sloužící jako negativní kontrola.

Každá kombinace „druh švába × typ potravy“ byla umístěna v samostatné chovné nádobě. Celkem tak vzniklo 12 experimentálních skupin švábů (kolonií), které byly udržovány a analyzovány současně. Nešlo tedy o replikace v čase, ale o paralelní test tří dietních režimů u čtyř druhů švábů. Experimentální skupiny švábů byli dvakrát týdně krmeni po dobu dvou měsíců, přičemž délka krmné expozice byla u všech skupin stejná. Na konci potravního experimentu byly pro molekulárně-biologickou analýzu ze všech experimentálních skupin

odebrán trus stejným postupem, jaký je popsán v kapitole 4.5.1. Následně byli jednotliví jedinci usmrceni a podrobeni vyšetření pomocí mikroskopických metod popsanych v kapitole 4.3. Každá zkumavka s odebraným trusem byla označena druhem, dietní skupinou a datem odběru.

4.7 Prevence kontaminace a kontrolní postupy

Při všech laboratorních postupech byla dodržována **opatření minimalizující riziko křížové kontaminace** mezi experimentálními skupinami švábů i odebranými vzorky. Chovné nádoby byly při každém čištění dezinfikovány 70% etanolem a pro každou skupinu byly použity samostatné nástroje. Práce se střevním obsahem, trusem a kultivačními suspenzemi probíhala v oddělených pracovních zónách a pro každou metodu (mikroskopie, kultivace, izolace DNA, PCR) bylo používáno samostatné vybavení. Nástroje a pracovní plochy byly mezi jednotlivými odběry dezinfikovány 70% etanolem nebo byly použity jednorázové sterilní pomůcky. Při izolaci DNA a přípravě PCR reakcí byly používány špičky s filtrem a sterilní materiál, aby se zabránilo aerosolové kontaminaci. Manipulace s kultivacemi probíhala v digestoři, v laminárním boxu nebo na sterilní pracovní ploše za sterilních podmínek. Vzorky DNA byly uchovávány v označených mikrozskumavkách při -20 °C. Molekulární analýzy zahrnovaly standardní kontrolní postupy, včetně negativní kontroly (PCR bez DNA) a pozitivní kontroly s ověřeným vzorkem DNA. Gelová elektroforéza byla doplněna molekulárním markerem pro ověření velikosti amplifikačních produktů. Tato opatření zajistila spolehlivost a reprodukovatelnost všech provedených laboratorních analýz.

5 VÝSLEDKY

5.1 Mikroskopické vyšetření střevního obsahu švábů

Nativní preparáty střevního obsahu ukázaly širokou morfologickou diverzitu eukaryotních i prokaryotních organismů, stejně jako výrazné rozdíly v množství organického detritu mezi jednotlivými vzorky. Přesto bylo možné ve většině preparátů identifikovat opakující se skupiny organismů tvořící přirozenou součást střevní mikrobioty švábů. Dominantní složku tvořil bakteriální biofilm různé hustoty, doplněný množstvím nestrávených částic potravy, jejichž zastoupení odráželo aktuální dietu, druh i fyziologický stav jedinců. Nejchudší mikrobiota byla pozorována u *Blattella germanica*, jejíž preparáty byly často téměř prázdné a obsahovaly pouze ojedinělé bakterie a drobný detrit. Naopak druhy jako *Blaberus craniifer*, *Blaberus discoidalis* nebo *Gromphadorhina portentosa* vykazovaly velmi bohatý střevní obsah s přítomností pestré mikrobiální flóry i rozmanitých eukaryotických endosymbiontů. Mezi často pozorované organismy patřily **gregariny** (Alveolata, Apicomplexa, Eugregarinorida), typičtí střevní komenzálové švábů. Nejčastěji byly pozorovány jejich gamonti (pohlavní stádium), ojediněle trofozoiti (vegetativní stádium). V některých preparátech (např. *B. discoidalis* nebo *G. portentosa*) tvořily poměrně četnou složku střevního mikrobiomu. Rovněž **nálevníci** (Alveolata, Ciliophora) byli častou složkou střevního ekosystému. Byly pozorovány jak aktivně pohybující se trofozoiti, tak encystující stádia a cysty. U některých nálevníků byla dobře patrná ciliatura, orální aparát, makronukleus i mikronukleus. Pozorováno bylo též dělení nálevníků. Výrazná abundance nálevníků byla zaznamenána například u *B. discoidalis*, u níž se tato skupina vyskytovala opakovaně a ve vysoké hustotě. K dalším prvokům přítomným napříč preparáty patřili **bičíkovci** (Excavata, Metamonada) a **měňavky** (Amoebozoa, Archamoebae). Jejich taxonomická identifikace však nebyla cílem této práce. V řadě preparátů byla pozorována i **vajíčka hlístic** různého stupně vývoje a ojediněle též drobné larvy. Jejich výskyt byl výrazný zejména ve vzorcích pocházejících z přírodně živených nebo kompostových diet. V následující části jsou prezentovány pouze nálezy, kde bylo možné jednoznačně identifikovat a dokumentovat prvky jenž morfologicky připomínali vývojová stadia humánních parazitů.

V několika preparátech byly identifikovány **kulovité cystické útvary** dosahující velikosti 35–50 µm. Typickou byla přítomnost několika velkých kulovitých jader (2 a více) a homogenní granulární cytoplazma (Obr. 4). Morfologie cyst se shodovala s charakteristikami uváděnými pro cysty *Entamoeba* spp. a byly mikroskopicky detekované v koloniích *G. portentosa*, *B. craniifer* a *Periplaneta australasiae*. Byla pozorované i cysty se 2 nebo 4 jádry o velikosti 15-

20 μm , které připomínaly cysty *E. histolytica* (Obr. 5, 6). Trofozoiti s morfologickými charakteristikami rodu *Entamoeba* zachyceni nebyli.

Hojně detekovaným organismem byly průhledné kulovité buňky připomínající drobné kapénky tuku, jež svou morfologií odpovídali **vakuolární formě** rodu *Blastocystis*. Buňky o průměru 2-15 μm byli charakteristické drobnými periferně uloženými jádry, úzkým lemem cytoplazmy a přítomnosti velké centrální vakuoly (Obr. 7, 8). Ojedinele byly pozorovány buňky s intravakuolárními granulemi, které byly obvykle o něco větší (20-25 μm) a připomínaly granulární formy rodu *Blastocystis* (Obr. 9). Preparáty barvené Lugolovým roztokem vykazovaly nepravidelné zvýraznění detritu, hlenu a bakteriálních shluků. Vakuolární formy se však téměř vůbec neobarvily (Obr. 7, 8). Na roztěrech barvených podle Giemsy byli dobře rozpoznatelné od jiných kulovitých struktur díky téměř neobarvené cytoplazmě a tmavěji zbarvenými periferními jádry (Obr. 10–13). V několika případech bylo možné zaznamenat i dělení (Obr. 13). Vakuolární formy *Blastocystis* byly detekovány u více druhů švábů (*Periplaneta americana*, *P. australasiae*, *B. discoidalis*, *B. cranifer*, *Blaptica dubia*).

Kultivace *Blastocystis* ze švábů v podmínkách *in vitro* poskytla doplňkový pohled na **životaschopnost těchto izolátů pocházejících z odlišných druhů švábů**. Kvalita a bohatství těchto kultur se mezi jednotlivými druhy švábů lišila. Pro porovnání morfologických znaků a rozměrů buněk byla využita **lidská kultura *Blastocystis* subtypu ST3**, kde na nativních preparátech byly pozorovány dobře vyvinuté vakuolární formy o průměru 10–30 μm . Tyto byly výrazně větší a měly pravidelněji kulovitý tvar (Obr. 14), než tomu bylo u švábů. Pozorované dělicí se vakuolární formy lidského subtypu (Obr. 15 a 16) morfonologicky odpovídaly buňkám přítomným ve střevním obsahu švábů, ale byly větší. Lidský subtyp se v xenických kulturách udržovaných při teplotě 37 °C (standart pro lidský subtyp) dobře množil, vykazoval četné vakuolární formy a zřetelné dělení buněk. Naproti tomu se švábí izoláty v kulturách množily jen omezeně a často se objevovaly malé, atypicky vypadající formy (Obr. 17).

5.2 Molekulární analýza trusu švábů

Molekulární analýza SSU rRNA byla provedena u **18 vzorků trusu** reprezentujících různé druhy a kolonie švábů. U všech vzorků byla testována přítomnost rodů *Entamoeba* a *Blastocystis* pomocí univerzálních a specifických PCR reakcí. Výsledky jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 1; Obr. 18).

5.2.1 Molekulární detekce rodu *Entamoeba*

Univerzální PCR (snPCR) zaměřená na rod *Entamoeba* poskytla **pozitivní výsledek u více než poloviny vzorků**, napříč více druhy švábů (Tabulka 1). Pozitivní amplifikace byla zaznamenána u téměř všech zkoumaných druhů švábů kromě *P. australasiae*, *P. americana* z Etiopie, *B. germanica*, blíže neurčený druh *Blattidae* sp. z Filipín, *G. oblongata* a *P. femapterus*. U vzorků s dostatečnou kvalitou sekvence byla identifikována přítomnost tzv. „**uncultured *Entamoeba***“ o délce 561–572 bp izolované rovněž ze švábů, s vysokou homologií k databázovým sekvencím (cca 95–97 %). Druhově specifická PCR byla u **všech analyzovaných vzorků negativní**, což jednoznačně vylučuje přítomnost patogenního druhu *E. histolytica* ve sledovaných koloniích švábů.

5.2.2 Molekulární detekce rodu *Blastocystis*

PCR zaměřená na SSU rRNA genu *Blastocystis* byla **pozitivní u většiny vzorků**, což potvrzuje, že *Blastocystis* je běžným endosymbiontem ve střevech laboratorně chovaných švábů, stejně jako *Entamoeba* spp. Pozitivní se ukázal být trus z následujících druhů švábů: *B. dubia*, *B. orientalis*, *P. australasiae*, *P. americana*, *B. cranifer* a *B. discoidalis* (Tabulka 1). Sekvenační analýza potvrdila přítomnost ***Blastocystis* sp.**, s délkou amplikonů **628–649 bp** a vysokou homologií databázovým záznamům (obvykle 95–100 %). U některých vzorků byly zaznamenány **smíšené amplikony**, což znemožnilo přesné určení subtypu.

5.2.3 Negativní nálezy

Některé kolonie vyšly v PCR analýzách **zcela negativně** jak pro rod *Entamoeba*, tak pro rod *Blastocystis*. Negativní byly následující vzorky: *G. oblongonata*, *P. femapterus*, *P. australasiae*, *P. americana* z Etiopie, *Blattidae* sp. z Filipín a *B. germanica* (Tabulka 1). Negativita může odrážet skutečnou absenci sledovaných prvoků, ale nelze vyloučit ani nízkou koncentraci DNA nebo přítomnost PCR inhibitorů u těchto izolátů.

Tabulka 1: Souhrn výsledků molekulární analýzy trusu švábů.

Číslo "švába" kolonie	Hostitel	Počet jedinců	snPCR (r. <i>Entamoeba</i>)	SEQ snPCR (r. <i>Entamoeba</i>); délka fragmentu (bp)	ssPCR (f. <i>histolytica</i>)	SSU rRNA <i>Blastocystis</i>	SEQ SSU rDNA (<i>Blastocystis</i>); délka fragmentu (bp)
30	Periplaneta australasiae	1	neg.	x	neg.	neg.	x
31	Gromphadorhina oblongonata	3	neg.	x	neg.	neg.	x
32	Blaptica dubia 1	19	posit.	uncultured Entamoeba, 571 bp., identický s 39	neg.	pozit.	Blastocystis sp., 628 bp
33	Blatta orientalis - Porto	11	posit.	smíšená sekvence	neg.	pozit.	Blastocystis sp., 649 bp
34	Pycnocelus femapterus	7	neg.	x	neg.	neg.	x
35	Gromphadorhina portentosa 1	12	posit.	uncultured Entamoeba, 572 bp.	neg.	neg.	x
36	Blatta orientalis Varna	11	posit.	uncultured Entamoeba, 570 bp.	neg.	pozit.	Blastocystis sp., 639 bp
37	Blattidae sp. Filipiny	3	neg.	x	neg.	neg.	x
38	Blatta orientalis Baku	26	posit.	smíšená sekvence	neg.	pozit.	smíšená sekvence; pouze z reverzu
39	Blaptica dubia 2	30	posit.	uncultured Entamoeba, 571 bp., identický s 32	neg.	pozit.	Blastocystis sp., 628 bp
40	Periplaneta australasiae	9	neg.	x	neg.	pozit.	Blastocystis sp., 639 bp
41	Periplaneta americana Etiopie, Awasa	5	neg.	x	neg.	neg.	x
42	Periplaneta americana Madagaskar	16	posit.	smíšená sekvence	neg.	pozit.	Blastocystis sp., 639 bp
43	Periplaneta americana Malawi	12	posit.	uncultured Entamoeba, 561 bp.	neg.	pozit.	Blastocystis sp., 639 bp
44	Blaberus craniifer	12	posit.	smíšená a pouze parciální sekvence	neg.	pozit.	Blastocystis sp., 629 bp
45	Gromphadorhina portentosa 2	16	posit.	smíšená a pouze parciální sekvence	neg.	neg.	x
46	Blatella germanica	11	neg.	x	neg.	neg.	x
47	Blaberus discoidalis	9	posit.	uncultured Entamoeba, 571 bp.	neg.	pozit.	Blastocystis sp., 629 bp

5.3 Výsledky potravních experimentů

Potravní experimenty byly prováděny u čtyř druhů švábů (*P. australasiae*, *P. americana*, *B. dubia* a *G. portentosa*) po dobu dvou měsíců, během nichž byli pravidelně krmeni jednou ze tří diet: ledový salát, kompost a granule pro kočky jako negativní kontrola. Všechny experimentální skupiny byly vyhodnoceny **mikroskopicky** (nativní preparát a nativní preparát obarven Lugolovým roztokem) a následně **molekulárně** pomocí analýzy SSU rRNA.

5.3.1 Mikroskopická analýza střevního obsahu švábů

Mikroskopická analýza ukázala, že: 1) **mikrobiální nálož se mezi jednotlivými skupinami s odlišnou potravou lišila** a kompost obvykle vedl k nejvyšší diverzitě, ale rozdíly nebyly zásadní; 2) nejčastěji byly pozorovány **bakterie, nálevníci, vakuolární formy *Blastocystis*** (Obr. 19, 20, 21 a 23). **a ojediněle cysty měňavek** (Obr. 22).

Ve švábovi druhu *P. australasiae* byl zachycený útvar připomínající mnohojadernou cystu nepatogenního druhu *Entamoeba coli*, ale jádra se zdály být nepravidelného tvaru i rozměru (Obr. 22).

5.3.2 Molekulární analýza trusu švábů

Univerzální PCR na rod *Entamoeba* (snPCR) vyšla u všech izolátů až na jednu kolonii (*B. dubia* krmena kompostem) negativně. **Druhově specifická PCR (ssPCR) na *E. histolytica***

(Tabulka 2) byla rovněž negativní u všech čtyř druhů švábů, rozdělených do dietních skupin. To odpovídá i předchozím výsledkům molekulární analýzy původních kolonií před provedením potravních experimentů (Tabulka 1).

Univerzální PCR na *Blastocystis* prokázala přítomnost tohoto prvoka u 75 % vzorků a sekvenace amplikonů přítomnost *Blastocystis* potvrdila. U některých vzorků vyšly **směsné sekvence**, což může indikovat smíšené infekce kolonie švábů nebo dokonce i samotných jedinců více izoláty *Blastocystis*. S ohledem na zaznamenanou falešnou pozitivitu u *G. portentosa*, u tohoto druhu vyšly všechny tři experimentální skupiny **negativně** pro oba testované rody – *Entamoeba* i *Blastocystis* (Tabulka 2; Obr. 18).

Tabulka 2: Souhrn výsledků molekulární analýzy trusu švábů z potravních experimentů.

Číslo "švába" kolonie	Hostitel	Počet jedinců	snPCR (<i>r. Entamoeba</i>)	ssPCR (<i>E. histolytica</i>)	SSU rRNA <i>Blastocystis</i>	SEQ SSU rDNA (<i>Blastocystis</i>), délka fragmentu (bp)
30S	<i>Periplaneta australasiae</i> _S	4	neg.	neg.	pozit.	<i>Blastocystis</i> sp., 639 bp
30K	<i>Periplaneta australasiae</i> _K	3	neg.	neg.	pozit.	<i>Blastocystis</i> sp., 639 bp
30N	<i>Periplaneta australasiae</i> _N	3	neg.	neg.	pozit.	<i>Blastocystis</i> sp., 639 bp
32S	<i>Blaptica dubia</i> _S	5	neg.	neg.	pozit.	<i>Blastocystis</i> sp., 628 bp
32K	<i>Blaptica dubia</i> _K	5	posit.	neg.	pozit.	<i>Blastocystis</i> sp., 628 bp
32N	<i>Blaptica dubia</i> _N	6	neg.	neg.	pozit.	<i>Blastocystis</i> sp., 628 bp
45S	<i>Gromphadorhina portentosa</i> _S	8	neg.	neg.	falešně pozit.	nespecifická amplifikace, uncultured (soil) eucaryote
45K	<i>Gromphadorhina portentosa</i> _K	12	neg.	neg.	neg.	x
45N	<i>Gromphadorhina portentosa</i> _N	20	neg.	neg.	neg.	x
48S	<i>Periplaneta americana</i> _S	4	neg.	neg.	pozit.	<i>Blastocystis</i> sp., 639 bp
48K	<i>Periplaneta americana</i> _K	3	neg.	neg.	pozit.	směsná sekvence; <i>Blastocystis</i> sp.
48N	<i>Periplaneta americana</i> _N	4	neg.	neg.	pozit.	směsná sekvence; <i>Blastocystis</i> sp.

6 DISKUZE

6.1 Mikroskopické nálezy a jejich interpretace

Mikroskopická vyšetření ukázala výrazné rozdíly v množství a složení střevního obsahu mezi jednotlivými druhy švábů. Mezi často detekované prvky patřily gregariny (Alveolata, Apicomplexa, Eugregarinorida), nálevníci (Alveolata, Ciliophora), měňavky (Amoebozoa, Archamoebae) a bičíkovci (Excavata, Metamonada), jež představují přirozené endosymbionty (včetně parazitů) švábů [99–102], kterými se tato práce nebude zabývat. Dále byly často přítomné hlístice (Nematoda) běžně obývající zadní střevo švábů [103] a vajíčka různých druhů červů. Tyto nálezy odpovídají publikovaným studiím uvádějícím, že šváby ve své zadní část střeva běžně hostí různé druhy hlístic.

Je to právě původ švábů (volně žijící vs. laboratorně chované) jenž je uváděn jako jeden z faktorů, který může ovlivňovat složení jejich střevních mikrobiálních společenstev [103]. Studie ukazují, že diverzita střevní mikrobioty a záchyt lidských patogenů je u divokých populací podstatně vyšší [104,105]. Například, historické nálezy u švábů potvrdili lidské patogenní (*Entamoeba histolytica*) i nepatogenní prvky (*E. coli*) ve střevě švábů *Periplaneta americana* odchycené z volné přírody (terénní studie z Káhiry) [106], což se v této práci nepotvrdilo ani s využitím citlivějších molekulárních metod. Zmiňovanou práci je potřeba ale interpretovat opatrně, protože byla založená na světelné mikroskopii bez molekulárního potvrzení nálezu.

Nejvýrazněji se v rámci této studie lišila kolonie druhu *Blattella germanica*, kde byl u angažovaných jedinců opakovaně pozorován téměř prázdný střevní lumen s minimem bakterií a s úplnou absencí prvků. Tento nález je překvapivý zejména vzhledem k tomu, že *B. germanica* je nejčastější synantropní druh švába, dlouhodobě spojovaný s přenosem patogenních mikroorganismů a různých parazitů [26,106,107]. Vzhledem publikovaným nálezům přirozených symbiontů jako jsou gregariny, měňavky a bičíkovci (*Lophomonas blattarum*) [26], absence mikroorganismů v našich vzorcích by mohla odrážet úbytek střevní mikrobioty v chovných podmínkách se standardizovanou dietou.

Na druhou stranu, druhy *Gromphadorhina portentosa*, *Blaberus discoidalis*, *B. craniifer*, *P. americana* a *P. australasiae* vykazovaly bohatou a druhově pestré mikrobiotu. Ve většině preparátů byly přítomny bakterie, nálevníci, hlístice, gregariny, fragmenty nestrávené potravy a četné cystické struktury. V několika vzorcích byly pozorovány útvary svými morfologickými

znaky odpovídající cystám rodu *Entamoeba* a přítomnost jeho zástupců byla potvrzena i molekulární detekcí. Rovněž byl zaznamenán výskyt zástupců rodu *Blastocystis*, jehož vakuolární formy byly mikroskopicky detekovány u většiny pitvaných jedinců a zároveň potvrzen molekulárně z trusu analyzovaných kolonií. Přítomnost dělicích se stadií připomínajících pučení či binární dělení lidského subtypu *Blastocystis* potvrzuje, že zde tento prvok je schopen kolonizovat střevo švábů což odpovídá předchozím studiím [108,109].

6.2 Výhody a omezení použitých mikroskopických metod

Rody *Entamoeba* nebo *Blastocystis* zahrnují jak patogenní, tak nepatogenní druhy (případně subtypy/izoláty), které nelze na základě mikroskopického obrazu spolehlivě odlišit [74,78,80]. Proto mikroskopické nálezy těchto organismů pretendované v této studii sloužily pouze k předběžné orientaci o přítomnosti sledovaných prvoků a k výběru vzorků pro molekulární identifikaci. Pro ověření potenciální přítomnosti lidských patogenů a pro odlišení prvoků specifických pro švábií hostitelé bylo nutné mikroskopickou identifikaci doplnit o molekulárně-biologické postupy. Omezení světelné mikroskopie při identifikaci střevních prvoků u švábů byla popsána i v dřívějších studiích, které upozorňují na vysokou tvarovou a rozměrovou variabilitu měňavek a *Blastocystis* a na nízkou spolehlivost jejich druhového rozlišení na základě samotných morfologických znaků bez využití molekulárních metod [44,100,109,110]. Tyto práce rovněž zdůrazňují, že mikroskopie je vhodná především jako orientační nástroj pro detekci přítomnosti protozoí, nikoli pro jejich přesnou taxonomickou identifikaci. Celkově mikroskopické vyšetření potvrdilo, že většina analyzovaných druhů švábů má velmi bohatou střevní mikrobiotu, což je v souladu s jejich všežravostí a ekologií. Zároveň však ukázalo, že pouhá morfologie nestačí ke spolehlivé identifikaci střevních prvoků a to zejména u druhů s vysokou morfologickou variabilitou [73].

Za hlavní výhodu nativních preparátů lze považovat zachování přirozené struktury a motility organismů, což usnadňuje jejich rozpoznání. Nevýhodou je však rychlá degradace preparátu, omezená životnost a zhoršená viditelnost v případě hustého nebo tukem kontaminovaného obsahu střeva. Navíc, v případě nadměrného množství Ringerova roztoku docházelo k pohybu preparátu, zatímco při nedostatku roztoku rychle vysychá a organismy rychle hynou. Podobné praktické limity práce s nativními preparáty byly popsány i v parazitologických studiích zaměřených na střevní prvoky švábů, kde je nativní mikroskopie uváděna jako metoda vhodná především pro sledování pohybu a základní morfologie živých forem, avšak s omezenou výpovědní hodnotou při hustém střevním obsahu nebo rychlé

degradaci preparátu [104,111]. Barvení nativního preparátu Lugolovým roztokem zvýšilo celkový kontrast preparátu a umožnilo lepší rozlišení buněčných struktur ve srovnání s nativním nebarveným preparátem. Použití Lugolova roztoku však postupně vedlo k usmrcení organismů, a proto nebylo možné sledovat jejich pohyb. Další nevýhodou tohoto barvení je omezená selektivita, kdy jódový roztok neobarvuje pouze cílové struktury prvoků, ale i další složky střevního obsahu, a to včetně buněčného detritu, bakterií a zbytků potravy. Z tohoto důvodu byla metoda využívána pouze k orientačnímu hodnocení a výsledky byly interpretovány v kombinaci s dalšími mikroskopickými a molekulárně-biologickými metodami [99]. Toto barvení bylo využíváno především při vyhodnocování potravních experimentů, kde umožnilo rychlé porovnání složení střevního obsahu mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Použití Lugolova roztoku jako orientačního barvicího činidla pro detekci cystických forem střevních prvoků je běžně popisováno i v klasických i modernějších studiích zaměřených na střevní faunu švábů, přičemž autoři shodně upozorňují na jeho omezenou selektivitu a nemožnost využití k přesné druhové identifikaci [105,111,112]. Tyto práce potvrzují, že Lugolovo barvení je vhodné především pro rychlé srovnávací analýzy a předběžné hodnocení mikrobiální zátěže [104].

6.3 Přínos a interpretace molekulárních analýz

Molekulární analýza přinesla několik jasných a důležitých zjištění. Nejvýraznějším z nich je, že potvrdila absenci *E. histolytica*. Historické práce sice občas uvádějí nálezy *E. histolytica* u švábů (např. v Káhiře [106]), avšak moderní fylogenetické studie [46], jasně ukazují, že švábi jsou hostiteli unikátních ribozomálních linií rodu *Entamoeba*, které jsou morfologicky neodlišitelné, ale geneticky zcela odlišné od lidských druhů [107,110]. Tomu odpovídá i fakt, že většina kolonií byla pozitivní na **rod *Entamoeba* (obecné snPCR)**, což je v souladu s mikroskopickými pozorováními odpovídajících cyst. Tyto nálezy tedy odrážejí přítomnost **nehumánních, hostitelsky specifických linií rodu *Entamoeba***, běžně se vyskytujících u švábů.

Výsledky pro **detekci a identifikaci *Blastocystis*** rovněž neprokázali přítomnost lidských subtypů (Tabulka 1). Zároveň byly pomocí těchto metod identifikované izoláty rodu *Blastocystis* specifické pro švábi hostitele, což je v souladu s předchozími publikovanými nálezy [60]. Kolonie pozitivní na *Blastocystis* byly pozitivní konzistentně i mikroskopicky, zatímco kolonie negativní vykazovaly negativitu napříč všemi metodami.

Prolínání zde uvedených výsledků je důležité — švábi, kteří byli pozitivní na *Entamoeba*, bývali často pozitivní i na *Blastocystis* a naopak (Tabulka 1). To naznačuje, že některé kolonie jsou stabilně kolonizované „švábími“ liniemi obou rodů prvoků, zatímco jiné zůstávají dlouhodobě bez infekce. Překvapivé je, že některé kolonie zůstaly **zcela neinfikované**, přestože byly dlouhodobě chovány ve stejném prostředí jako kolonie pozitivní. To naznačuje, že přenos v rámci chovu není samozřejmostí a může být limitován **individuální resistencí, odlišnostmi v obranných mechanismech či specifickým složením mikrobioty** u jednotlivých kolonií. Švábi si tak patrně mezi sebou nepředávají protozoární symbionty jen tak snadno, nebo se určité linie dokážou spontánně „očistit“.

6.4 Potravní experimenty

Výsledky potravních experimentů ukázaly, že typ podávané potravy měl na celkový charakter střevního obsahu méně výrazný vliv což je v souladu se studií [113], která ukázala, že i u dřevem a detritem se živících švábů zůstává struktura střevní mikrobioty stabilní a mění se jen minimálně v závislosti na typu přijímané potravy. Přestože jednotlivé diety (salát, kompost, granule pro kočky) představovaly rozdílné zdroje organického materiálu, celkové mikrobiální spektrum se mezi skupinami výrazně nelišilo. U všech diet byly pozorovány bakterie, nálevníci, bičíkovci, hlístice a cystické formy prvoků. To naznačuje, že střevní mikrobiota laboratorně chovaných švábů je relativně stabilní a není snadno ovlivnitelná krátkodobou změnou potravy. Mikroskopie přesto ukázala několik zajímavých trendů: kompostová dieta často vedla k bohatšímu a pestřejšímu střevnímu obsahu, zatímco u granulí byly některé preparáty téměř prázdné. Tyto rozdíly však nevytvářely jasný vzorec napříč druhy, což potvrzuje, že **individuální variabilita švábů převyšuje vliv diety**.

V potravních experimentech byla pozitivita pro rod *Entamoeba* zjištěna pouze u jednoho vzorku (kolonie *Blaptica dubia* krmena kompostem). Všechny ostatní experimentální skupiny vyšly negativně (Tabulka 2). Tento výsledek ostře kontrastuje s **předchozí analýzou původních velkých kolonií** (před započatým potravním experimentu), kde byla pozitivita pro rod *Entamoeba* běžná. Rozdíly mezi molekulární detekcí prvoka z trusu jednotlivých kolonií pravděpodobně odrážejí to, že **infekce není rovnoměrně rozprostřena v celé kolonii** a při rozdělení kolonie do menších experimentálních skupin vznikli i také jenž obsahovali převážně nenakažené jedince. Výsledek podporuje hypotézy, že: 1) přenos *Entamoeba* mezi jedinci **není velmi efektivní**, 2) malé skupiny jedinců mohou zůstat **dlouhodobě negativní**, a 3) **pozitivita kolonie nemusí automaticky znamenat pozitivitu všech jedinců**. To by mohlo vysvětlovat,

proč potravní experimenty vykázaly tak nízkou prevalenci *Entamoeba*, přestože původní kolonie pozitivní byla (Tabulka 1).

Ve švábovi *P. australasiae* krmeného kompostem byla zdokumentována cysta měňavky, která připomínala mnohojadernou cystu rodu *Entamoeba*. Nicméně molekulárně analyzovaný trus získaný z kolonií *P. australasiae* před a po provedení potravních experimentů vycházel opakovaně negativně, což naznačuje že 1) se jedná o jiný rod měňavky, 2) koncentrace DNA byla příliš nízká pro PCR detekci anebo 3) žádné stadium tohoto prvoka nebylo přítomné v analyzovaném trusu a jednalo se o náhodnou (jednorázovou) kontaminaci z kompostu.

Druhově specifická PCR na *E. histolytica* byla i v potravních experimentech rovněž **zcela negativní** (Tabulka 2), stejně jako v hlavní molekulární analýze. Tím se opět potvrzuje, že **žádný z testovaných švábů nebyl nositelem lidského patogenního druhu** a laboratorní kolonie švábů nepředstavují epidemiologické riziko ve vztahu k *E. histolytica* a to ani u kolonií krmených potenciálně kontaminovanou potravou jako je například kompost.

Na rozdíl od *Entamoeba* byly výsledky u rodu *Blastocystis* mnohem jednodušší. V potravních experimentech byly **téměř všechny skupiny pozitivní**, podobně jako v molekulární analýze původních kolonií (Tabulka 2). Jedinou výjimkou byly kolonie rodu *Gromphadorhina*, které opakovaně vyšly negativní v potravních experimentech i v molekulární analýze původních kolonií před započítáním potravního experimentu. Je však zajímavé, že v předcházejících analýzách provedených spolupracujícím týmem z jiné instituce vyšli ty samé kolonie obou druhů z rodu *Gromphadorhina* pozitivně. Toto překvapivé zjištění naznačuje, že *Gromphadorhina* nemusí být přirozeným hostitelem *Blastocystis* a mohlo dojít ke křížové infekci přednesené z jiné kolonie švábů, přičemž postupem času se kolonie spontánně očistila. Naopak, u většiny ostatních druhů švábů byla pozitivita velmi stabilní. To ukazuje, že *Blastocystis* je **endosymbiont běžně kolonizující šváby**, v koloniích se **udrhuje dlouhodobě** a jeho výskyt a abundance nejsou výrazně ovlivněny dietou použitou v experimentu [99].

6.5 *In vitro* kultivace

Kultivace *in vitro* poskytly doplňkový pohled na životaschopnost izolátů *Blastocystis* pocházejících z jednotlivých druhů švábů a **umožnila jejich srovnání navzájem ale i s lidským izolátem**. Zatímco lidský subtyp se v xenických kulturách při teplotě 37 °C dobře množil [114], švábí izoláty se v kulturách množily jen omezeně a postupně produkovali menší

atypicky vypadající formy. Tento rozdíl lze vysvětlit rozdílnými teplotními preferencemi – **běžná tělesná teplota švábů je výrazně nižší než 37 °C**, což pravděpodobně růst švábích linií *Blastocystis* kultivovaných v podmínkách *in vitro* potlačilo [111,115]. Dlouhodobě nepřeočkované kultury (cca 6 měsíců) byly v souladu s předpokladem silně degradované, s dominancí bakteriální složky a pouze sporadickým výskytem vakuolárních forem *Blastocystis*, což potvrzuje jejich postupné znehodnocení. Výsledky kultivací trusu švábů tedy podporují závěr, že **švábí linie *Blastocystis* jsou sice životaschopné i mimo střeva svého hostitele** (stejně jako lidský izolát), ale standardní **kultivační podmínky používané pro lidské subtypy jim zcela nevyhovují**. Zároveň kultivace ukazují, že **žádný z analyzovaných švábů neobsahoval ve svém trávicím traktu cysty lidských patogenů**, jenž by se v kultivačním mediu při teplotě 37 °C excystovaly a namnožily. Toto zjištění rovněž naznačuje, že laboratorní švábi použiti v tomto experimentu nepředstavují rezervoár pro lidské subtypy *Blastocystis* ani měňavky rodu *Entamoeba* patogenní pro lidi [44,110].

7 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala výskytem vybraných protozoárních parazitů člověka ve střevním traktu švábů chovaných v laboratorních koloniích s cílem posoudit jejich potenciální roli jako mechanických vektorů či rezervoárů lidských patogenů. Pomocí světelné mikroskopie byl ve střevech švábů pozorován bohatá střevní mikrobiota, přičemž v zadní části střeva byly u většiny analyzovaných kolonií zaznamenány vakuolární formy morfologicky odpovídající rodu *Blastocystis*. U některých jedinců byly rovněž detekovány cysty měňavek rodu *Entamoeba*. Molekulárně-biologické metody však prokázaly, že izoláty uvedených dvou rodů prvoků získaných z kolonií švábů se neshodují s druhy (příp. subtypy) lidských parazitů, ale jedná se o linie *Blastocystis* a *Entamoeba* jenž jsou specifické pro švábí hostitele, u kterých se nepředpokládá patogenita pro člověka.

Výsledky této studie ukazují, že střevo švábů poskytuje příznivé podmínky pro přežívání sledovaných organismů a v případě rodu *Blastocystis* (s vysokou pravděpodobností rovněž rodu *Entamoeba*) i pro jejich aktivní množení. Přesto se však ukazuje, že švábi chovaní v koloniích za standardizovaných podmínek nepředstavují epidemiologické riziko pro člověka z hlediska přenosu protozoárních parazitů. Studie tak přispívá k lepšímu pochopení vztahů mezi šváby a střevními protisty a zdůrazňuje význam kombinace morfologických a molekulárních metod při hodnocení potenciálních zdravotních rizik.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PřF MU – Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

PCR – Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce

snPCR – Semi-specific Polymerase Chain Reaction – semispecifická PCR

snPCR – Nested Polymerase Chain Reaction – dvoustupňová (vnořená) PCR

18S rRNA – 18S ribosomal RNA – 18S ribozomální RNA

SSU rRNA – Small Subunit ribosomal RNA – malá podjednotka ribozomální RNA

DNA – Deoxyribonucleic Acid – deoxyribonukleová kyselina

RNA – Ribonucleic Acid – ribonukleová kyselina

bp – base pair – pár bází

ST3 – *Blastocystis* subtype 3 – subtyp 3 rodu *Blastocystis* (nejčastější humánní subtyp, v této práci použit jako lidský referenční izolát)

TBE – Tris–Borate–EDTA buffer – TRIS–boritan–EDTA pufr

TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethane – tris(hydroxymethyl)aminomethan

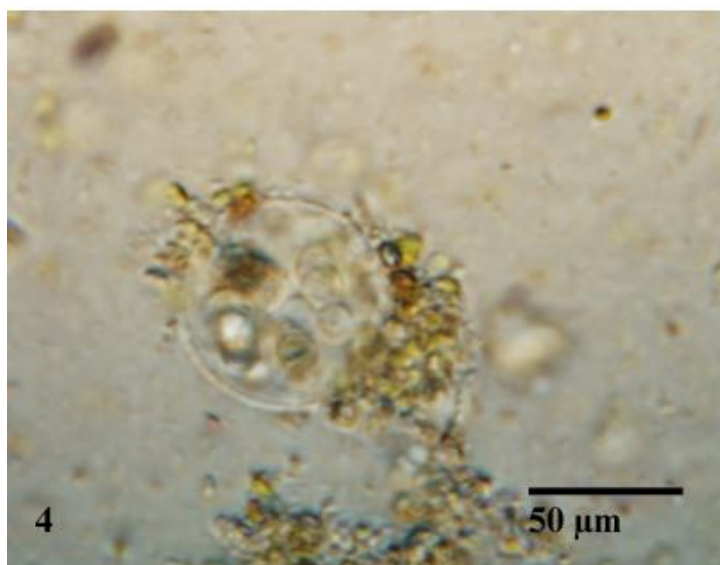
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid – kyselina ethylendiamintetraoctová

UV – Ultraviolet light – ultrafialové světlo

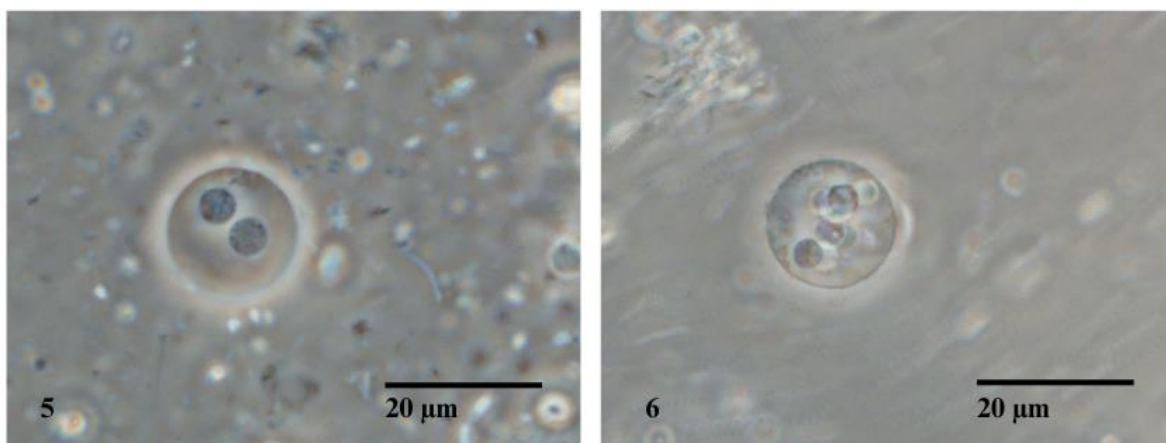
ABI – Applied Biosystems Instrument – zařízení značky Applied Biosystems

NCBI – National Center for Biotechnology Information – Národní centrum pro biotechnologické informace

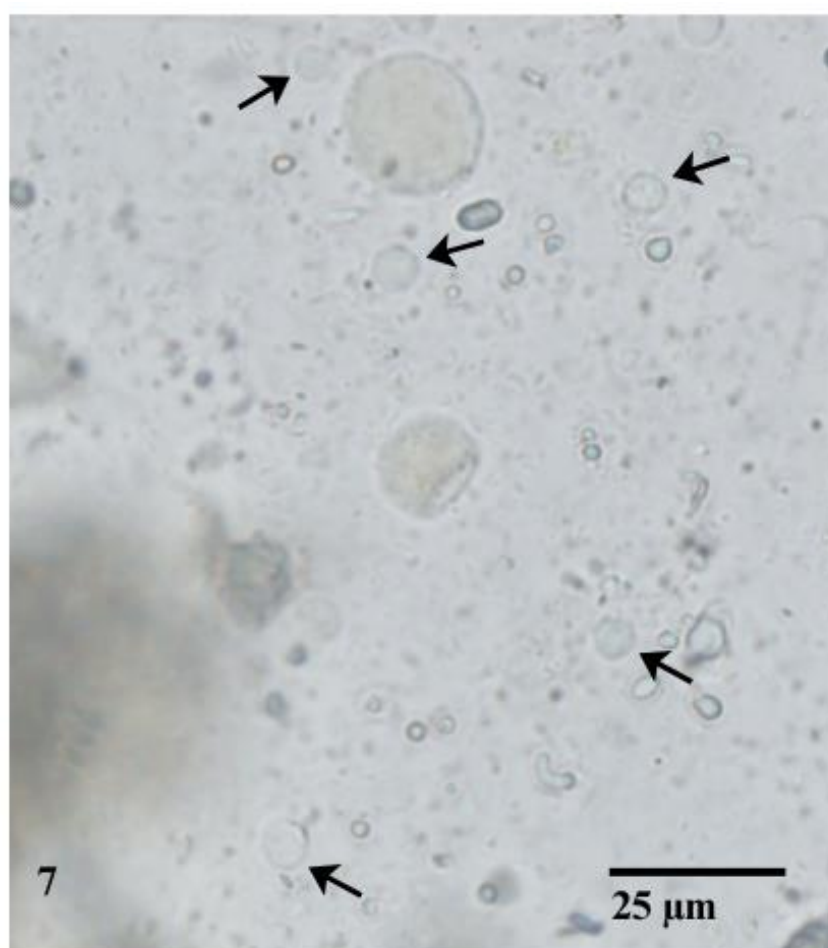
9 PŘÍLOHY



Obr. 4: Cysta *Entamoeba* sp. na nativním preparátu střevního obsahu *Gromphadorhina portentosa*. Pozorovat lze minimálně 8 jader.



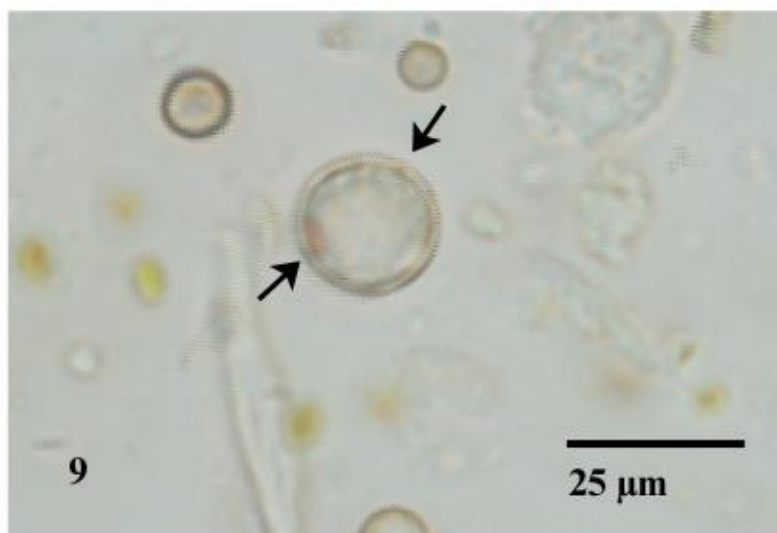
Obr. 5-6: Cysta *Entamoeba* sp. na nativním preparátu střevního obsahu *Blaberus cranifer* pod fázovým kontrastem. Pozorovat lze dvě (5) nebo osm jader (6).



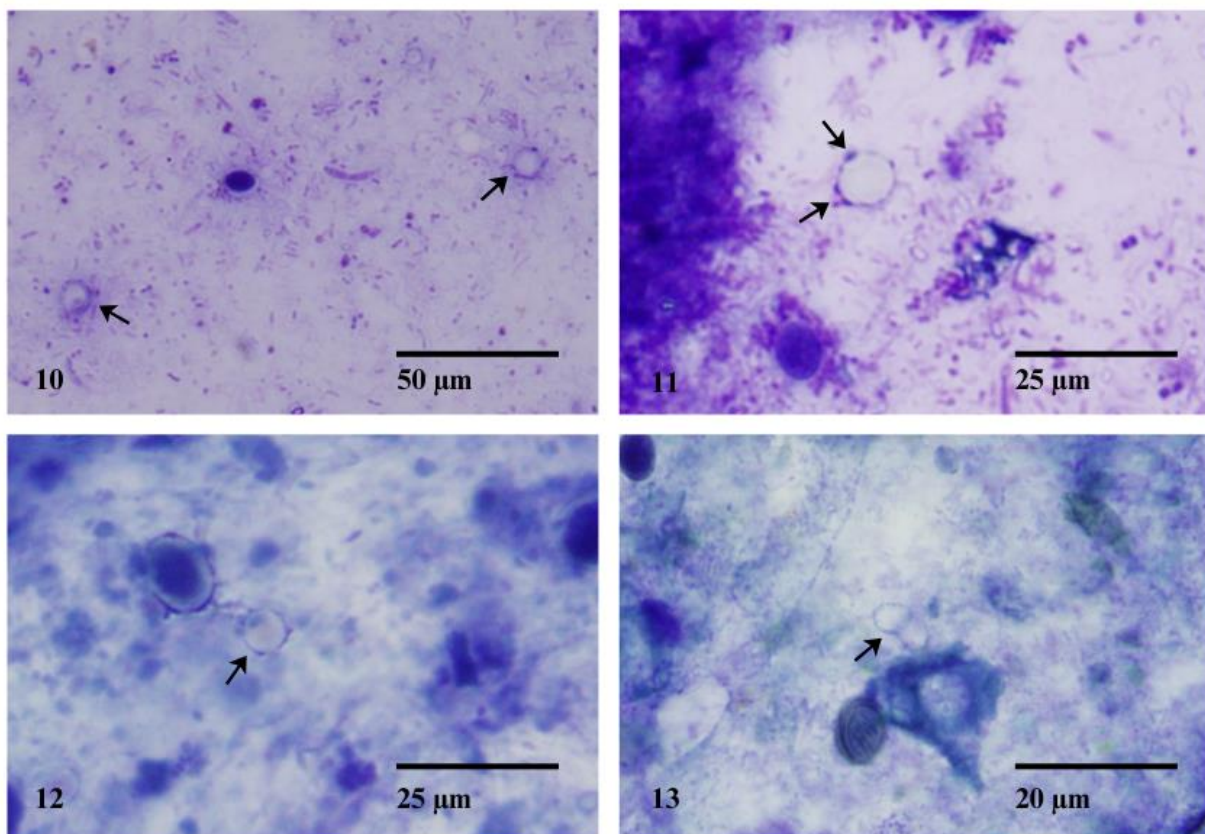
Obr. 7: Vakuolární forma *Blastocystis* sp. (šipky) na preparátu střevního obsahu *Blaptica dubia* barveném Lugolovým roztokem. Pozorovat lze 1–3 jádra.



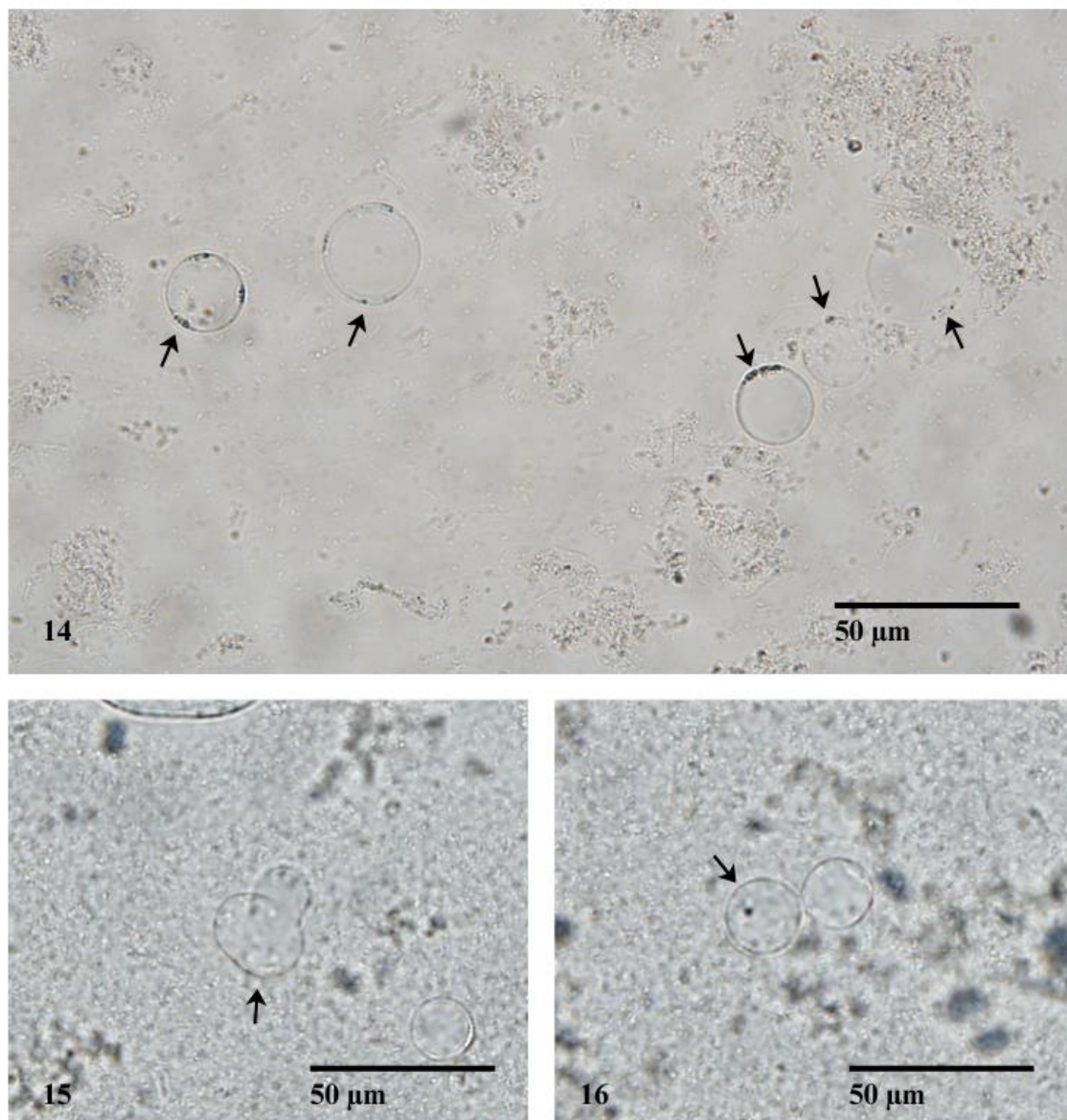
Obr. 8: Vakuolární forma *Blastocystis* sp. (šipky) na preparátu střevního obsahu *Periplaneta americana* barveném Lugolým roztokem. Pozorovat lze 1–4 jádra (šipky).



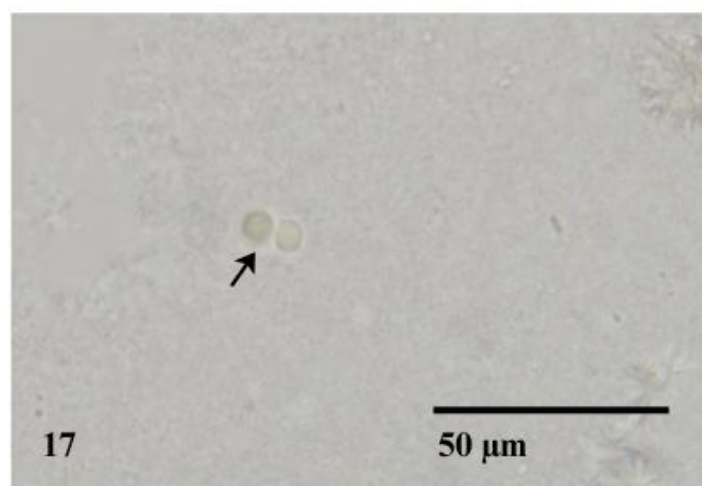
Obr. 9: Suspektní granulární forma *Blastocystis* sp. na nativním preparátu střevního obsahu *Gromphadorhina portentosa*. Pozorovat lze malá, periferně lokalizovaná jádra (šipka).



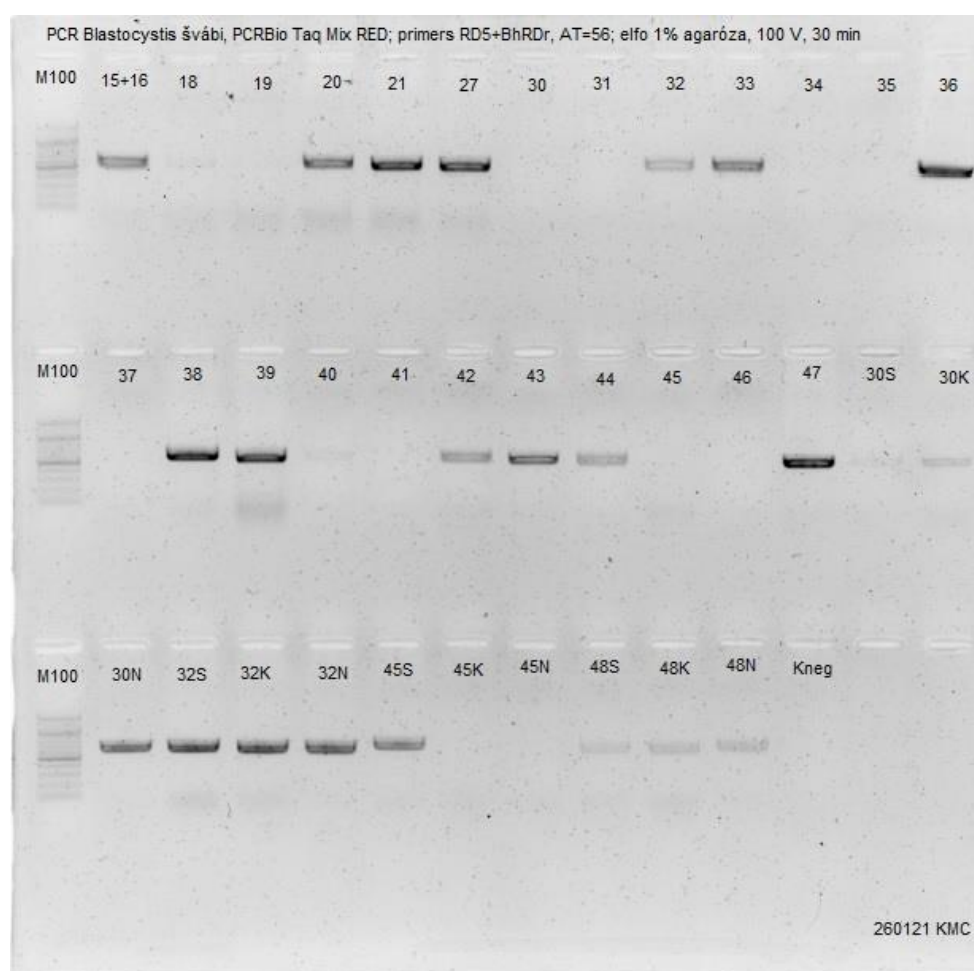
Obr. 10-13: Vakuolární formy *Blastocystis* sp. na roztěrech střevního obsahu *Blaptica dubia* (10), *Gromphadorhina portentosa* (11), *Periplaneta americana* (12) a *Periplaneta australasiae* (13), barevném podle Giemsy. Pozorovat lze čtyři až pět jader (šipky). Na obr. 13 je viditelné dělení vakuolární formy *Blastocystis* (šipka).



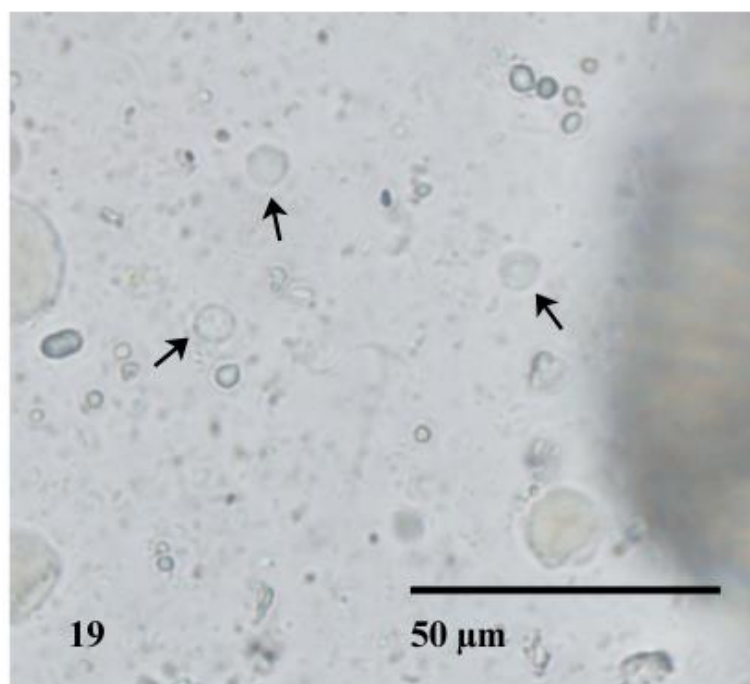
Obr. 14-16: Nativní preparáty připravené z kultur lidského subtypu *Blastocystis*. Pozorovat lze 2–10 jader (šipky). Na obr. 15 je viditelné dělení vakuolární formy (šipka) a na obr. 16 je přítomna dělící se vakuolární forma těsně před oddělením buněk (šipka).



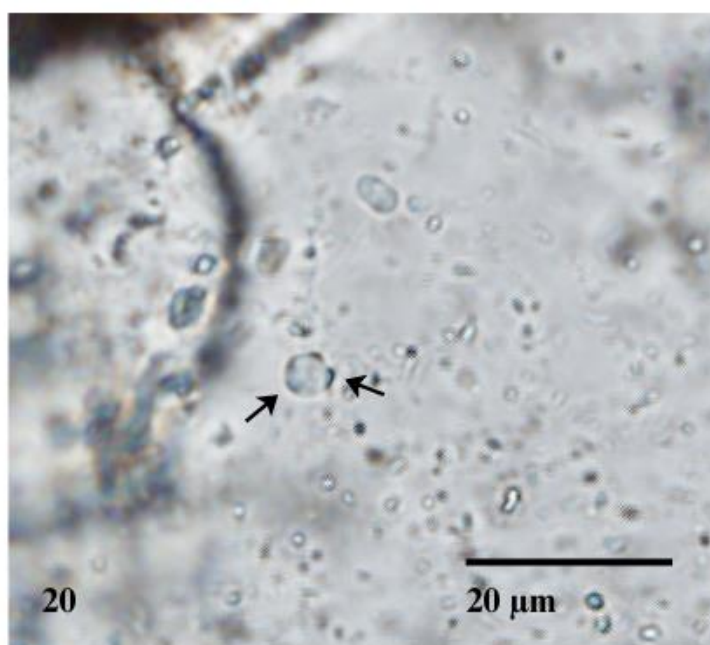
Obr. 17: Nativní preparát připraven z kultury *Blastocystis* sp. získaného z trusu *Periplaneta australasiae*. Pozorovat lze 1–2 jádra (šipky).



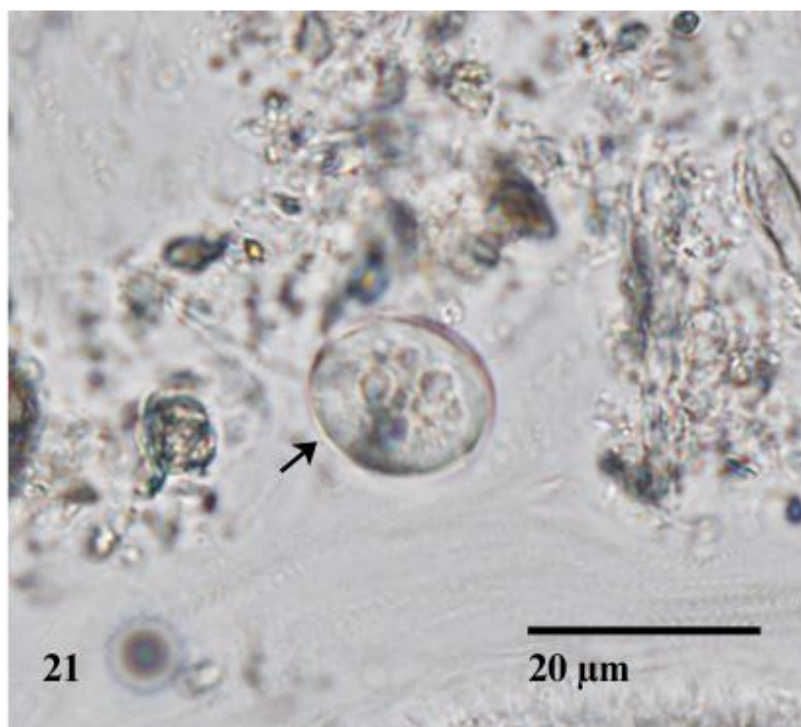
Obr. 18. Výsledky univerzální PCR reakce (čísla se shodují s čísly v Tabulkách 1 a 2)



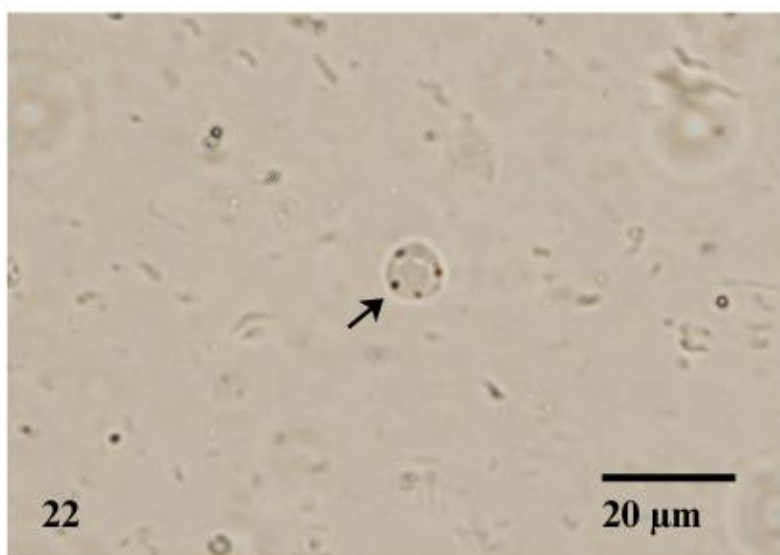
Obr. 19: Vakuolární formy *Blastocystis* sp. (šipky) pozorované v nativním preparátu střevního obsahu *Blaptica dubia* krmného salátem, barveném Lugolovým roztokem.



Obr. 20: *Blastocystis* sp. na nativním preparátu střevního obsahu *Periplaneta americana* krmným kompostem, barveném Lugolovým roztokem. Přítomna je vakuolární forma s čtyřmi jádry (šipky).



Obr. 21: Cysta *Entamoeba* na preparátu střevního obsahu *Periplaneta australasiae* krmeným granulemi pro kočky, barveném Lugolovým roztokem. Přítomna je cysta s minimálně 8 jádry.



Obr. 22: *Blastocystis* sp. na nativním preparátu střevního obsahu nymfy *Periplaneta americana* krmené salátem, barveném Lugolovým roztokem. Přítomna je vakuolární forma s čtyřmi jádry (šipky).

10 POUŽITÁ LITERATURA

1. Guzman J, Vilcinskas A. Bacteria associated with cockroaches: health risk or biotechnological opportunity? *Appl Microbiol Biotechnol.* prosinec 2020;104(24):10369–87.
2. Identification of cockroaches as mechanical vector for parasitic infections and infestations in Kuantan, Malaysia. *ResearchGate* [Internet]. 6. srpen 2025 [citován 27. leden 2026];
Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/328535390_Identification_of_Cockroaches_as_Mechanical_Vector_for_Parasitic_Infections_and_Infestations_in_Kuantan_Malaysia
3. Dokmaikaw a, Suntaravitun P. Prevalence of parasitic contamination of cockroaches collected from fresh markets in chachoengsao province, Thailand. *Kobe J Med Sci* [Internet]. 10. únor 2020 [citován 27. leden 2026];65(4):E118–23. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7447098/>
4. Bell WJ, Roth LM, Nalepa CA. Cockroaches: Ecology, behavior, and natural history. Baltimore, MD, US: Johns Hopkins University Press; 2007. xiii, 230 s. (Cockroaches: Ecology, behavior, and natural history).
5. Pai HH, Chen WC, Peng CF. Cockroaches as potential vectors of nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol.* listopad 2004;25(11):979–84.
6. Graczyk TK, Knight R, Tamang L. Mechanical transmission of human protozoan parasites by Insects. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. leden 2005 [citován 6. leden 2026];18(1):128–32. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC544177/>
7. Motevalli-Haghi SF, Shemshadian A, Nakhaei M, Faridnia R, Dehghan O, Malekzadeh Shafaroudi M, et al. First report of *Lophomonas* spp. in german cockroaches (*Blattella germanica*) trapped in hospitals, northern Iran. *J Parasit Dis Off Organ Indian Soc Parasitol.* prosinec 2021;45(4):937–43.
8. Adl SM, Bass D, Lane CE, Lukeš J, Schoch CL, Smirnov A, et al. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* [Internet]. 2019 [citován 25. leden 2026];66(1):4–119. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jeu.12691>
10. Lukeš J, Stensvold CR, Jirků-Pomajbíková K, Wegener Parfrey L. Are human intestinal eukaryotes beneficial or commensals? *PLoS Pathog* [Internet]. 13. srpen 2015 [citován 27. leden 2026];11(8):e1005039. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4536199/>
11. Stensvold CR, van der Giezen M. Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends Parasitol.* květen 2018;34(5):369–77.
12. Stanley SL. *Amoebiasis*. *Lancet Lond Engl.* 22. březen 2003;361(9362):1025–34.

13. Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* říjen 2008;21(4):639–65.
14. Guzmán-Guzmán IP, Nogueda-Torres B, Zaragoza-García O, Navarro-Zarza JE, Briceño O, Pérez-Rubio G, et al. The Infection, Coinfection, and abundance of intestinal protozoa increase the Serum Levels of IFABP2 and TNF- α in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Front Med.* 2022;9:846934.
15. Prevalence of intestinal parasitic infections among rural inhabitants of Hamadan city, Iran, 2012. ResearchGate [Internet]. 10. srpen 2025 [citován 27. leden 2026]; Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/265396777_Prevalence_of_Intestinal_Parasitic_Infections_Among_Rural_Inhabitants_of_Hamadan_City_Iran_2012
16. PNW186_Cockroaches.pdf [Internet]. [citován 27. leden 2026]. Dostupné z: https://wpcdn.web.wsu.edu/wp-puyallup/uploads/sites/415/2014/12/PNW186_Cockroaches.pdf
17. Enebe MC, Erasmus M. Blatticomposting – A perspective on cockroach-mediated waste valorization to nutrient-rich organic fertilizer for enhancing soil health. *Soil Adv* [Internet]. 1. říjen 2024 [citován 28. leden 2026];2:100012. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2950289624000125>
18. Pérez-Cobas AE, Maiques E, Angelova A, Carrasco P, Moya A, Latorre A. Diet shapes the gut microbiota of the omnivorous cockroach *Blattella germanica*. *FEMS Microbiol Ecol.* duben 2015;91(4):fiv022.
19. Blattodea - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. 2024 [citován 7. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/blattodea>
20. Cockroach | definition, description, pests, life cycle, taxonomy, facts, & species | Britannica [Internet]. 2025 [citován 7. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/animal/cockroach-insect>
21. Adedara IA, Mohammed KA, Da-Silva OF, Salaudeen FA, Gonçalves FLS, Rosemberg DB, et al. Utility of cockroach as a model organism in the assessment of toxicological impacts of environmental pollutants. *Environ Adv* [Internet]. červenec 2022 [citován 7. leden 2026];8:100195. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9390120/>
22. Schapheer C, González LM, Villagra C. Microorganism Diversity Found in *Blatta orientalis* L. (Blattodea: Blattidae) Cuticle and gut collected in urban environments. *insects* [Internet]. listopad 2024 [citován 10. leden 2026];15(11):903. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2075-4450/15/11/903>

23. Fang W, Fang Z, Liu Z, Yuan J, Zhang X, Peng H, et al. Phylogenetic analysis of bacterial community in the gut of american cockroach (*Periplaneta americana*). Wei Sheng Wu Xue Bao. 4. září 2013;53(9):984–94.
24. Tinker KA, Ottesen EA. The Core gut microbiome of the american Cockroach, *Periplaneta americana*, Is stable and resilient to dietary shifts. Appl Environ Microbiol. 15. listopad 2016;82(22):6603–10.
25. Protozoan cysts in faecal pellets of German cockroaches (*Blattella germanica*), with particular emphasis on *Lophomonas blattarum* - PubMed [Internet]. 2020 [citován 28. leden 2026]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32472401/>
26. Martínez-Girón R, Martínez-Torre C, van Woerden HC. The prevalence of protozoa in the gut of German cockroaches (*Blattella germanica*) with special reference to *Lophomonas blattarum*. Parasitol Res. listopad 2017;116(11):3205–10.
27. Patel A, Jenkins M, Rhoden K, Barnes AN. A systematic review of zoonotic enteric parasites carried by flies, cockroaches, and dung beetles. Pathogens [Internet]. leden 2022 [citován 14. leden 2026];11(1):90. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/1/90>
28. Huber I, Master EP, Rao BR. Cockroaches as models for neurobiology: applications in Biomedical Research. 1990;
29. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 1. září 2013 [citován 10. leden 2026];37(5):699–735. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
30. Chapman RF, Simpson SJ, Douglas AE. The insects: structure and function. 5 th ed. New York: Cambridge university press; 2013.
31. Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. Annu Rev Entomol. 1997;42:525–50.
32. Lampert N. Microenvironment and bacterial community structure in the gut of wood- and litter-feeding cockroaches. 12. únor 2018 [citován 29. leden 2026]; Dostupné z: <https://open.uni-marburg.de/handle/10.17192/z2018.0081>
33. Carrasco P, Pérez-Cobas AE. Succession of the gut microbiota in the cockroach *Blattella germanica*. Int Microbiol [Internet]. 2014 [citován 28. leden 2026];(17):99–109. Dostupné z: <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.212>
34. Frontiers | The integral role of the Black Soldier fly, *Hermetia illucens* L., microbiota in its life history [Internet]. 2025 [citován 6. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiomes/articles/10.3389/frmbi.2025.1517715/full>
35. Jaffar S, Ahmad S, Lu Y. Contribution of insect gut microbiota and their associated enzymes in insect physiology and biodegradation of pesticides. Front Microbiol [Internet]. 14.

- září 2022 [citován 6. leden 2026];13. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.979383/full>
36. Guzman J, Vilcinskas A. Bacteria associated with cockroaches: health risk or biotechnological opportunity? *Appl Microbiol Biotechnol.* prosinec 2020;104(24):10369–87.
 37. Schauer C, Thompson CL, Brune A. The bacterial community in the gut of the Cockroach *Shelfordella lateralis* reflects the close evolutionary relatedness of cockroaches and termites. *Appl Environ Microbiol.* duben 2012;78(8):2758–67.
 38. Bertino-Grimaldi D, Medeiros MN, Vieira RP, Cardoso AM, Turque AS, Silveira CB, et al. Bacterial community composition shifts in the gut of *Periplaneta americana* fed on different lignocellulosic materials. *SpringerPlus.* 2013;2:609.
 39. Fitri LE, Candradikusuma D, Setia YD, Wibawa PA, Iskandar A, Winaris N, et al. Diagnostic Methods of common intestinal protozoa: current and future immunological and molecular methods. *Trop Med Infect Dis* [Internet]. říjen 2022 [citován 6. leden 2026];7(10):253. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2414-6366/7/10/253>
 40. Other ntestinal protozoa and *Trichomonas vaginalis* - Medical Microbiology - NCBI Bookshelf [Internet]. 1996 [citován 6. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7889/>
 41. Dubik M, Pilecki B, Moeller JB. Commensal intestinal protozoa—underestimated members of the gut microbial community. *Biology* [Internet]. prosinec 2022 [citován 6. leden 2026];11(12):1742. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/12/1742>
 42. Dos Santos Zanetti A, Malheiros AF, de Matos TA, Dos Santos C, Battaglini PF, Moreira LM, et al. Diversity, geographical distribution, and prevalence of *Entamoeba* spp. in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Parasite Paris Fr.* 2021;28:17.
 43. Liu X, Bao G, Yue M, Fang Y, Gu Y, Li W, et al. Prevalence and molecular Identification of *Entamoeba* spp. in non-human primates in a zoological garden in Nanjing, China. *Front Vet Sci* [Internet]. 30. květen 2022 [citován 6. leden 2026];9. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2022.906822/full>
 44. T K, M I, P C, S K, T H, T N. Genetic diversity of *Entamoeba*: Novel ribosomal lineages from cockroaches. *PloS One* [Internet]. 21. září 2017 [citován 28. leden 2026];12(9). Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28934335/>
 45. Blastocystis hominis - Symptoms & causes - Mayo Clinic [Internet]. [citován 6. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/blastocystis-hominis-infection/symptoms-causes/syc-20351205>

46. Stensvold CR, Tan KSW, Clark CG. Blastocystis. Trends Parasitol. březen 2020;36(3):315–6.
47. Záhonová K, Low RS, Warren CJ, Cantoni D, Herman EK, Yiangou L, et al. Evolutionary analysis of cellular reduction and anaerobicity in the hyper-prevalent gut microbe Blastocystis. Curr Biol [Internet]. 2023 [citován 25. leden 2026];33(2023):2449–+. Dostupné z: https://asep.lib.cas.cz/arl-cav/cs/detail-cav_un_epca-0574496-Evolutionary-analysis-of-cellular-reduction-and-anaerobicity-in-the-hyperprevalent-gut-microbe-Blas/
48. Fu X, Lyu J, Shi Y, Cao B, Liu D, Yang X, et al. Epidemiological survey on prevalence and subtypes distribution of *Blastocystis* sp. in Southern Guizhou, China. Biomol Biomed. 8. květen 2025;25(7):1508–16.
49. Hagen KD, Nosala C, Müller A, Hilton NA, Holthaus D, Schulzke JD, et al. *Giardia*'s domed ventral disc architecture is essential for attachment and contributes to epithelial barrier disruption. Mol Biol Cell. 1. srpen 2025;36(8):ar93.
50. McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. březen 2014;52(3):712–20.
51. Valigurová A, Jirků M, Koudela B, Gelnar M, Modrý D, Šlapeta J. *Cryptosporidia*: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. Int J Parasitol [Internet]. 1. červenec 2008 [citován 25. leden 2026];38(8):913–22. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907003955>
52. Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison LJ, et al. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. Vet Res. 11. srpen 2017;48(1):42.
53. CDC - DPDx - *Cryptosporidiosis* [Internet]. 2024 [citován 5. únor 2026]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>
54. Rideout H, Cook AJC, Whetton AD. Understanding the *Cryptosporidium* species and their challenges to animal health and livestock species for informed development of new, specific treatment strategies. Front Parasitol. 2024;3:1448076.
55. CDC - DPDx - *Cryptosporidiosis* [Internet]. 2024 [citován 6. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>
56. Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP,.
57. Osman M, Safadi DE, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al. Prevalence and risk factors for intestinal Protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 14. březen 2016 [citován 6. leden 2026];10(3):e0004496. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004496>

58. Al-Azab AMA, Fadladdin YAJ, Alasmari SMN. Cockroaches as mechanical vectors of intestinal parasites in Sana'a City, Yemen. *J Parasitol Res.* 2025;2025:3583742.
59. Turner M, Peta V, Pietri JE. New insight into the relationship between *Salmonella Typhimurium* and the German cockroach suggests active mechanisms of vector-borne transmission. *Res Microbiol.* 2022;173(3):103920.
60. Farah Haziqah MT, Nur Asyiqin MN, Mohd Khalid MKN, Suresh K, Rajamanikam A, Chandrawathani P, et al. Current status of Blastocystis in cockroaches. *Trop Biomed.* 1. září 2017;34(3):741–5.
61. Badri M, Mohaghegh MA, Olfatifar M, Abdoli A, Zaki L, Asghari A, et al. The contamination of human residential environments by intestinal protozoan parasites in cockroaches: a systematic review, meta-analysis and future predictions (up to 2035). *Int J Environ Health Res.* listopad 2025;35(11):3604–21.
62. Liu J, Yuan Y, Feng L, Lin C, Ye C, Liu J, et al. Intestinal pathogens detected in cockroach species within different food-related environment in Pudong, China. *Sci Rep* [Internet]. 23. leden 2024 [citován 14. leden 2026];14(1):1947. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-52306-x>
63. Crespo A, de Armas Y, Capó V, Iglesias E, Palomares-Marín J, Fonte L, et al. Pathogens of medical importance identified in hospital-collected cockroaches: A systematic review. *Microorganisms* [Internet]. únor 2025 [citován 14. leden 2026];13(2):337. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/13/2/337>
64. (PDF) A review of alternative management tactics employed for the control of various cockroach Species (Order: Blattodea) in the USA. *ResearchGate* [Internet]. 16. říjen 2025 [citován 28. leden 2026]; Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/352365887_A_Review_of_Alternative_Management_Tactics_Employed_for_the_Control_of_Various_Cockroach_Species_Order_Blattodea_in_the_USA
65. Short JE, Edwards JP. Reproductive and developmental biology of the oriental cockroach *Blatta orientalis* (Dictyoptera). *Med Vet Entomol.* říjen 1991;5(4):385–94.
66. Roth LM. Introduction. In: Bell WJ, Adiyodi KG, editoři. *The american Cockroach* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1981 [citován 28. leden 2026]. s. 1–14. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-94-009-5827-2_1
67. Hadi UK, Retnani EB. Diversity and abundance of cockroaches (Insecta: Dictyoptera) in ships at Bau-Bau port. *J Entomol Zool Stud.* 2018
68. *Gromphadorhina portentosa* (Schaum, 1853) [Internet]. 1853 [citován 28. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.gbif.org/species/1994576>

69. *Gromphadorhina oblongonota* van Herrewege, 1973 [Internet]. [citován 28. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.gbif.org/species/165239610>
70. Jensen UG, Rothmann A, Skou L, Andersen SO, Roepstorff P, Højrup P. Cuticular proteins from the giant cockroach, *Blaberus craniifer*. Insect Biochem Mol Biol. únor 1997;27(2):109–20.
71. Legendre F, Grandcolas P, Thouzé F. Molecular phylogeny of Blaberidae (Dictyoptera, Blattodea) with implications for taxonomy and evolutionary studies. Eur J Taxon [Internet]. 3. březen 2017 [citován 28. leden 2026];(291). Dostupné z: <https://europeanjournaloftaxonomy.eu/index.php/ejt/article/view/415>
72. Roth LM. The cockroach genus *Pycnoscelus* Scudder, with a description of *Pycnoscelus femapterus*, sp. nov. (Blattaria: Blaberidae: *Pycnoscelinae*). Orient Insects [Internet]. 1. leden 1998 [citován 28. leden 2026];32(1):93–130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00305316.1998.10433770>
73. Bench Aids for the diagnosis of intestinal parasites -- Second edition [Internet]. 2019 [citován 27. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515344>
74. Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, Paltridge GP, Pillai DR, Procop GW, et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: Laboratory diagnosis of parasites from the gastrointestinal tract. Clin Microbiol Rev. leden 2018;31(1):e00025-17.
75. Iodine Solution for Parasitology. 2020 The hardy diagnostics manufacturing facility and quality management system is certified to ISO 13485.
76. Zanzani S, Epis S, Bandi C, Manfredi MT. What is your diagnosis? Fecal smear stained with Lugol's solution and Giemsa from a cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) presenting with liquid diarrhea. Vet Clin Pathol. červen 2014;43(2):293–4.
77. Pathologists TRC of. UK Standards for microbiology investigations [Internet]. 2024 [citován 27. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.rcpath.org/profession/publications/standards-for-microbiology-investigations.html>
78. Eymael D, Schuh GM, Tavares RG. [Standardization of *Blastocystis hominis* diagnosis using different staining techniques]. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(3):309–12.
79. Shetty N, Prabhu T. Evaluation of faecal preservation and staining methods in the diagnosis of acute *amoebiasis* and *giardiasis*. J Clin Pathol. červen 1988;41(6):694–9.
80. Šejnohová A. Výskyt střevního prvoka *Blastocystis* sp. u primátů v zajetí. 2021
81. Boutahar M, Belaouni M, Ibrahimi A, Eljaoudi R, Aanniz T, Er-Rami M. Prevalence of *Blastocystis* sp. in Morocco: Comparative assessment of three diagnostic methods and characterization of parasite forms in Jones' culture medium. Parasite. 2023;30:64.

82. Jones WR. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. Ann Trop Med Parasitol. červenec 1946;40:130–40.
83. Wong SSY, Fung KSC, Chau S, Poon RWS, Wong SCY, Yuen KY. Molecular diagnosis in clinical parasitology: when and why? Exp Biol Med. listopad 2014;239(11):1443–60.
84. Front matter. in: diagnostic medical parasitology [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [citován 28. leden 2026]. s. i–xxii. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555819002.fmatter>
85. Suchońska B, Kaczmarek A, Wesołowska M, Młocicki D, Sałamatin R. Molecular Identification of *Blastocystis* Subtypes in the cervix: A study on polish patients. J Clin Med. 3. červen 2025;14(11):3928.
86. Ng DPK, Koh D, Choo SGL, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. Clin Chim Acta [Internet]. 1. květen 2004 [citován 28. leden 2026];343(1):191–4. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898104000464>
87. Instruction manual PSPSpinStool_StoolPlusKit.pdf [Internet]. 2013 [citován 28. leden 2026]. Dostupné z: https://www.nordicbiolabs.dk/storage/B544295808B0D310AD733C6D75ACF20F1FBB0D757E7D5C1E2F02A86328F6DE6D/530ad576edf04c5b9b9ba07647991102/pdf/media/b22247c1dd464632a34191da2c9fd9ef/Instruction%20manual%20PSPSpinStool_StoolPlusKit.pdf
88. Khehra N, Padda IS, Zubair M. Polymerase chain reaction (PCR). in: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [citován 28. leden 2026]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
89. Jirků-Pomajbíková K, Čepička I, Kalousová B, Jirků M, Stewart F, Levecke B, et al. Molecular identification of *Entamoeba* species in savanna woodland chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). Parasitology. květen 2016;143(6):741–8.
90. Verweij JJ, Pit DS, van Lieshout L, Baeta SM, Dery GD, Gasser RB, et al. Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. Trop Med Int Health TM IH. září 2001;6(9):726–31.
91. Suzuki T, Yoshida S, Hara H. Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. Br J Nutr. srpen 2008;100(2):297–305.
92. Lhotská Z, Jirků M, Hložková O, Brožová K, Jirsová D, Stensvold CR, et al. A study on the prevalence and subtype diversity of the intestinal protist *Blastocystis* sp. in a gut-healthy human population in the Czech republic. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 6. říjen 2020

- [citován 5. únor 2026];10. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2020.544335/full>
93. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *blastocystis*. Protist. únor 2006;157(1):77–85.
94. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. Parasitol Int. prosinec 2016;65(6 Pt B):763–71.
95. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp JoVE. 20. duben 2012;(62):3923.
96. EPPiC Fast [Internet]. [citován 28. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.aabiot.com/en/eppic-fast>
97. BDX64 (BigDye® Enhancing Buffer) [Internet]. [citován 28. leden 2026]. Dostupné z: <https://www.carolinabiosystems.cz/cs/265-bdx64-bigdye-enhancing-buffer.html>
98. Applied Biosystems BigDye XTerminator Purification Kit | Al-Faiha For Laboratory & Scientific Supplies Co [Internet]. [citován 28. leden 2026]. Dostupné z: <https://sahoury.com/product/4376487>
99. Kotyk M. Diverzita vybraných skupin střevních prvoků u švábů (Blattodea bez Isoptera). 26. březen 2024 [citován 3. únor 2026]; Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/188927>
100. Pecina L. Diversity, morphology and phylogeny of endosymbiotic ciliates of the order *clevelandellida* (*Ciliophora armophorea*) in cockroaches Bratislava: Comenius University Bratislava Faculty of Natural Sciences; 2024.
101. Strand MA, Brooks MA. Pathogens of Blattidae (cockroaches). Bull World Health Organ. 1977;55 Suppl 1(Suppl 1):289–96.
102. Decoursey JD. *Endamoeba Histolytica* and Certain Other Protozoan Organisms Found in Cockroaches in Cairo, Egypt. Article. 1956.
103. Vicente CSL, Ozawa S, Hasegawa K. Composition of the cockroach gut microbiome in the presence of parasitic nematodes. Microbes Environ [Internet]. září 2016 [citován 4. únor 2026];31(3):314–20. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5017809/>
104. Protozoan and nematode parasites of the american coackroach *Periplaneta americana* (L.) from Bulgaria. ResearchGate [Internet]. 7. srpen 2025 [citován 3. únor 2026]; Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/288597847_Protozoan_and_Nematode_Parasites_of_the_American_Coackroach_Periplaneta_americana_L_from_Bulgaria

105. Paul S, Sardar S, Ghosh J. Characterizing gut fauna of american cockroach: Presence of *Lophomonas striata* and *Iodamoeba bütschlii*. J Parasit Dis [Internet]. 1. září 2025 [citován 3. únor 2026];49(3):659–70. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12639-025-01788-1>
106. DeCoursey JD, Otto JS. *Endamoeba Histolytica* and certain other protozoan organisms found in cockroaches in Cairo, Egypt. J N Y Entomol Soc [Internet]. 1956 [citován 3. únor 2026];64:157–63. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/25005606>
107. Strand MA, Brooks MA. Pathogens of Blattidae (cockroaches). Bull World Health Organ [Internet]. 1977 [citován 3. únor 2026];55(Suppl 1):289–96. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2366773/>
108. Zaman V, Ng GC, Suresh K, Yap EH, Singh M. Isolation of *Blastocystis* from the cockroach (Dictyoptera: Blattidae). Parasitol Res [Internet]. 1. leden 1993 [citován 28. leden 2026];79(1):73–4. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00931221>
109. Yoshikawa H, Wu Z, Howe J, Hashimoto T, Geok-Choo N, Tan KSW. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. J Eukaryot Microbiol. 2007;54(1):33–7.
110. "Phylogeny and diversity of *Entamoeba* in cockroaches, with an emphasis " by Mustafa Husain Fakhri [Internet]. 2015 [citován 3. únor 2026]. Dostupné z: <https://scholarworks.uark.edu/etd/24/>
111. Balch he the cultivation of *Nyctotherus ovalis* and *Endamoeba blattae*. Science. 9. září 1932;76(1967):237.
112. Lucas CLT. Two new species of *Amoeba* found in cockroaches: with notes on the cysts of *Nyctotherus ovalis* leidy. Parasitology [Internet]. srpen 1927 [citován 3. únor 2026];19(2):223–35. Dostupné z: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/two-new-species-of-amoeba-found-in-cockroaches-with-notes-on-the-cysts-of-nyctotherus-ovalis-leidy/AED6693ED50CD29AB874AB111CB0DA05>
113. Microenvironment and bacterial community structure in the gut of wood- and litter-feeding cockroaches [Internet]. 2017 [citován 10. leden 2026]. Dostupné z: <https://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2018/0081/pdf/dnl.pdf>
114. Features of *Blastocystis* spp. in xenic culture revealed by deconvolutional microscopy - PubMed [Internet]. 2015 [citován 5. únor 2026]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25994314/>
115. Chen L. Züchtungsversuche an parasitischen protozoen von periplaneta orientalis. Hamburg: Schiffs- und Tropenkrankheiten zu Hamburg; 1933.