

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

Oportunní paraziti u pacientů geriatrických zařízení

Bakalářská práce

Autor: Lenka Černá

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich CSc.

6. května 2010

Annotation:

Opportunistic parasites in patients of geriatric facilities

The main aim of this work has been the screening of opportunistic intestinal parasites in old people. The older persons may be vulnerable by opportunistic parasites due to the aging of the immune system. Stool samples were collected from patients of different age and sex in a geriatric facility and from the elderly who live in their homes.

Light and fluorescent microscopy and molecular diagnostics (PCR) were used as the diagnostic methods. A sedimentation concentration method (M.I.F.C.) was used for the detection of protists, cysts and helminth eggs or larvae and the staining method Miláček et. Vítovec for the detection of cryptosporidia. Staining with calcofluor served for the detection of microsporidial spores. PCR was used for identification of microsporidia species in the stool samples.

Only mammalian microsporidia *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bienusi* were detected in the stool samples. Prevalence of microsporidia in patients of a geriatric facility was 8,3 % and in the second group 18 %. Most positive samples (33 %) were in the age category 47 – 60 years.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Oportunní paraziti u geriatrických pacientů“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona c. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce fakultou, a to v nezkrácené podobě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

Lenka Černá

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli panu Doc. RNDr. Olegu Ditrichovi CSc. za odborné vedení, pomoc a čas, který mi věnoval. Velký dík patří také celému kolektivu Laboratoře oportunních parazitů BC AVČR, PaÚ za cenné rady, odbornou pomoc a trpělivost.

Obsah:

Úvod	6
1 Současný stav	7
1.1 Imunitní systém a stárnutí	7
1.1.1 Imunosenescence.....	7
1.2 Člověk a parazit	8
1.2.1 Patogenní střevní paraziti.....	8
1.2.2 Střevní oportunní paraziti člověka	15
2 Cíle práce a hypotézy	24
2.1 Cíl práce	24
2.2 Hypotézy	24
3 Metodika	25
3.1 Charakteristika sledovaného souboru.....	25
3.2 Odběr vzorků.....	25
3.3 Metody	26
3.3.1 Mikroskopické hodnocení stolice.....	26
3.3.2 Molekulární diagnostika.....	28
3.4 Statistické vyhodnocení výsledků.....	33
4 Výsledky	34
4.1 Mikroskopické vyšetření stolice	34
4.1.1 Koncentračně sedimentační metoda M.I.F.C.	34
4.1.2 Barvení podle Miláčka a Vítovce.....	34
4.1.3 Barvení calcofluorem	34
4.2 Molekulární diagnostika (PCR)	35
4.2.1 Druhová identifikace a genotypizace mikrosporidií	37
5 Diskuze.....	41
6 Závěry	45
7 Literatura.....	46
8 Klíčová slova.....	55
9 Přílohy.....	56

Úvod

V současné době je demografický vývoj charakterizován stárnutím populace. Přibývá seniorů, velmi starých seniorů a osob dlouhověkých. V České republice jsou tyto tendence zjevné již dnes. Senioři tvoří zhruba pětinu populace, v Praze čtvrtinu. Podle Českého statistického úřadu žilo v ČR k poslednímu dni roku 2008 přes 1,5 milionu lidí, kterým je 65 a více let. V průběhu dalších let se předpokládá, že tento počet vzroste na 3-4 miliony a senioři budou tvořit až jednu třetinu populace, více informací na www.czso.cz. Tato situace s sebou přináší problémy, které se týkají lepšího pochopení potřeb a problémů geriatrických pacientů, zlepšování jejich zdraví a zajištění kvalitních zdravotnických a sociálních služeb.

Se stárnutím souvisí fyziologické změny imunitního systému jedince. Imunitní systém prochází během života funkční remodelací. Nejvýznamnější změny vykazuje specifická, buňkami zprostředkovaná, imunita. Pro změny imunitního systému, které lze definovat u starých lidí, se zavádí termín imunosenescence. Dochází při něm ke dvěma kontrastním jevům: snižování imunitní reakce a produkce autoimunních protilátek. Důsledkem těchto jevů může být nárůst autoimunitních chorob, větší výskyt nádorových onemocnění a v neposlední řadě i náchylnost k infekcím, jak bakteriálním, virovým, tak parazitárním (Rodriguez-Hernandez et al. 2009). Otázkou tedy zůstává, zda má imunosenescence vliv na zvýšený výskyt oportunních parazitů ve střevech geriatrických pacientů.

Tento výzkum je zaměřen na geriatrické pacienty a zjišťuje, zda věk hraje důležitou roli při výskytu oportunních parazitů v důsledku pokročilé fáze stárnutí a s tím spojené remodelaci imunitního systému. Vzorky stolice byly odebírány od pacientů geriatrických zařízení různého stáří a pohlaví a dále od starších jedinců, kteří tyto služby nevyužívají a žijí ve svých domácnostech. Práce se tedy dále pokusí určit, zda se umístění starší osoby do domova důchodců odráží ve frekvenci výskytu střevních oportunních parazitóz.

1 Současný stav

1.1 Imunitní systém a stárnutí

1.1.1 Imunosenescence

Imunitnímu systému je tradičně připisován ve vztahu ke stárnutí velký význam. Imunitní systém prodělává v průběhu života zásadní změny. Nejvýznamnější ontogenetickou dynamiku vykazuje specifická, buňkami zprostředkovaná, imunita (Krejsek et al. 2005). Nedávné studie naznačují, že imunitní systém starších jedinců prochází kontinuálními funkčními změnami. Imunitní odpověď je nejsilnější v pubertě, kdy dominuje aktivita subsetu Th1 T-lymfocytů, a postupně klesá s věkem, kdy nacházíme imunitní odpověď zprostředkovanou Th2 T-lymfocyty. Tomuto poklesu imunitní odpovědi a celkové remodelaci říkáme imunosenescence (Caruso et al. 2009, Ramos – Casals et al. 2003, Rosato et Salsano 2008, Smolianinov et al. 2004).

Je všeobecně přijímáno, že imunosenescence má výrazný vliv na zvýšenou morbiditu starých osob. Byly však přineseny důkazy, že imunitní systém dlouhověkých jedinců, kteří se dožívají zhruba 100 let, je plně kompetentní a srovnatelný s mladými osobami (Franceschi et Bonafe 2003).

Imunosenescence ovlivňuje mnoho částí imunitního systému. Nejdůležitější jsou změny ve funkci T-lymfocytů, jak cytotoxických CD8+, tak pomocných (helperů) CD4+. Dochází hlavně k poklesu celkového absolutního počtu buněk CD3+, doprovázeného zvýšením počtu NK buněk, které si zachovávají svou cytotoxickou funkci, a snižuje se i počet B-lymfocytů. Staří lidé v důsledku těchto jevů trpí častěji autoimunitními nemocemi, nádory, chronickými záněty a jsou více náchylní k infekcím (Sansoni et al. 2008). Problémem je i vakcinace a prevence před různými chorobami, poněvadž imunosenescence přispívá i ke snížené schopnosti reagovat na očkování a zapříčiňuje tak větší úmrtnost na infekce, kterým se imunokompetentní jedinec bez problémů ubrání (Kumar et Burns 2008, Pawelec 2005).

Výzkumy však ukazují, že lze imunitní systém ve stáří posilovat a obnovovat pomocí cvičení a tělesné aktivity. Lze docílit snížení rizika infekčních onemocnění,

zvýšení účinnosti vakcíny a zlepšení celkového fyzického a psychosociálního stavu geriatrických pacientů (Santi – Rocca et al. 2009).

Za obranu proti intracelulárním parazitům odpovídají právě již zmíněné T-lymfocyty. Imunitní systém oslabeného jedince lze označit za náchylný k oportunním parazitózám, klesne-li počet CD4+ T-lymfocytů pod 200 na 1 mm³ krve. Mezi nejčastější oportunní parazity patří střevní prvoci, jakými jsou například kryptosporidie, mikrosporidie, cyklospory a *Isospora belli*. U imunodeficitních jedinců mohou být příčinou závažných chronických průjmů a v horším případě mohou způsobit i smrt u pacientů s AIDS (Derouin 2007).

1.2 Člověk a parazit

Člověk je hostitelem mnoha druhů parazitů a to jak ektoparazitů, tak endoparazitů. Parazitární infekce představují problém po celém světě. V Latinské Americe je 50% populace nakaženo střevními helmintózami, které jsou příčinou průjmových onemocnění, malnutrice a anémie. Jejich následkem umírá ročně až 10 miliónů osob (Jíra 1998).

Někteří paraziti se vyskytují kosmopolitně například tasemnice, škrkavky či roupi a některé najdeme pouze v určitých klimatických podmínkách, například plasmodia, další jsou typičtí pro specifické sociální prostředí člověka, například svrab (Vávra et al. 1996).

1.2.1 Patogenní střevní paraziti

Původci střevních parazitóz mohou být prvoci (protozoonózy) nebo červi (helmintózy). Střevní parazitózy se vyskytují po celém světě s výrazně vyšší prevalencí v zemích teplého klimatu s nedostatečnou hygienickou úrovní.

Zdrojem infekce může být zvíře i člověk. Vstupní bránou infekce bývá nejčastěji gastrointestinální trakt. Největší množství parazitických prvků přežívá ve vodě ve formě odolných cyst, a proto je velmi důležité dbát na čistotu pitné vody a nezávadnost potravin (Dawson 2005), to bývá problém hlavně v rozvojových zemích. Avšak i ve

vyspělém světě nacházíme pravidelný výskyt průjmových onemocnění způsobený jednobuněčnými parazity, jako jsou například kryptosporidie, *Giardia intestinalis* a *Entamoeba histolytica*. Proto by se tomuto problému měla věnovat celosvětová pozornost (Bouzid et al. 2008, Didier et al. 2004).

Někteří prvoci se mohou do těla hostitele dostat také urogenitální cestou nebo respiračním traktem a kůží (Vávra et al. 1996). Bylo dokázáno, že patogenní střevní paraziti mohou být přenášeni orálně-análním sexuálním stykem, který je praktikován hlavně homosexuálními muži (Abdolrasouli et al. 2009). K přenosu střevních parazitů z matky na plod nedochází, ale děti vystavené mikroorganismům nebo antigenům během těhotenství mají často sníženou imunitní odpověď proti těmto infekcím (Petersen 2007). Většina těchto infekcí souvisí se socioekonomickým stavem společnosti (Vávra et al. 1996).

Ani v České republice nejsou střevní paraziti žádnou vzácností. Je však pozorován výrazný pokles výskytu střevních parazitóz. Zároveň s tím ale klesá i zájem a pozornost ošetřujících lékařů tato vyšetření indikovat. I když počet osob cestujících do rizikových oblastí stoupá, počet provedených vyšetření na střevní parazity po návratu tomu neodpovídá. Je proto potřeba zaměřit pozornost na osvětovou činnost, která by upozorňovala laickou i odbornou veřejnost na rizika parazitárních nákaz zejména v souvislosti s cestováním do oblastí s jejich zvýšeným výskytem (Tolarová 2006).

Nejčastěji diagnostikovaní patogenní střevní paraziti u nás jsou *Enterobius vermicularis*, *Giardia intestinalis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli* a *Ascaris lumbricoides* (Tolarová 2009).

1.2.1.1 *Enterobius vermicularis*

Enterobius vermicularis (Linné, 1758) neboli roup dětský patří mezi Nematoda a řádu Oxyurida (Jíra 1998).

Enterobius vermicularis je běžným kosmopolitním parazitem tlustého a slepého střeva člověka (Volf et Horák 2007). V některých případech se může červ dostat do urogenitálního traktu mužů i žen. U žen může infekce vyústit ve vulvitidu. Byl zjištěn i případ, kdy se roup dostal do vejcovodu s následkem neplodnosti ženy (Young et al.

2010). U mužů se parazit v pohlavním ústrojí objevuje jen výjimečně. Jeho přítomnost je provázena s problémy při močení (Zahariou et al. 2007). *Enterobius vermicularis* bývá však rozšířen zejména v dětských kolektivech (Volf et Horák 2007).

Roup dětský má nitkovité tělo, k oběma koncům zúžené. Samci dosahují délky okolo 3 mm. Samice jsou o poznání větší. Měří 8 – 13 mm. K nákaze dochází při pozření vajíček. Roupí se fixují pomocí ústního ústrojí ke střešní sliznici v ileu, céku, v apendixu a ve vzestupném tračníku, kde se živí patrně epitelovými buňkami a bakteriemi. Gravidní samice částečně aktivně migrují análním otvorem ven z konečníku, kde nakladou vajíčka. Každá samice může obsahovat až 11 000 vajíček. Po vykladení vajíček samice umírá. Vajíčka mají oválný tvar, na jedné straně jsou oploštělá, jsou opatřena dvojitou membránou (Jíra 1998).

Zdrojem nákazy je člověk, nákaza se šíří kontaminovanou potravou a předměty, nemocný si vajíčka může zanést do úst také vlastní rukou neumytou po dotyku perianální krajiny. Jinou možností je požití zeleniny kontaminované vajíčky, kde byly ke hnojení používány lidské výkaly (Jíra 1998). Důležitou roli při výskytu enterobiózy hraje socioekonomický stav jedince, osobní hygiena a hygienické podmínky dětí (Wang et al. 2010).

V České republice poklesl výskyt enterobiózy od roku 1994 o více než polovinu. V roce 1994 bylo diagnostikováno zhruba 7000 případů, zatímco v roce 2008 jich bylo okolo 1100 (Tolarová 2006).

Hlavním příznakem onemocnění je silné svědění konečníku a následným škrábáním může vzniknout exém, pyodermické projevy nebo virová infekce. V krevním obraze nacházíme eozinofilii (Jíra 1998).

Diagnostika se opírá o celkový klinický obraz a o mikroskopický průkaz vajíček ve stěru nebo ve stolici (Jíra 1998).

K léčbě se používá embonát pyrvinia, jehož léčebný efekt je 90 – 100%. Přičemž se doporučuje léčit všechny členy rodiny nebo dětský kolektiv současně. K alternativní léčbě se užívají benzimidazolové preparáty (Jíra 1998).

Preventivním opatřením je důsledné dodržování základních hygienických pravidel (Jíra 1998).

1.2.1.2 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis patří mezi Protista. Je řazena do kmene Fornicata, třídy Trepomonadea, řádu Diplomonadida a čeledi Giardiaida. Dříve se též používal název *G. lamblia*, *G. duodenalis* (Volf et Horák 2007).

Giardia intestinalis je jednou z nejčastějších příčin střevního onemocnění u lidí, ale i u zvířat. Způsobuje giardiózu.

Životní cyklus probíhá pouze v jednom hostiteli, nepotřebuje více meziphostitelů. Rozlišujeme dvě formy parazita. Trofozoit je reproduktivní forma, která parazituje na enterocytech v horní části tenkého střeva. Měří 10–20 μm . Infekční stádium představuje vysoce odolná cysta, která vzniká procesem zvaným encystace. Dochází k ní tehdy, když se trofozoit dostane do tlustého střeva, kde již nejsou vhodné podmínky pro jeho život. Cysta je asi 15 μm velká a 5 μm široká a obsahuje 4 jádra. Spolu se stolicí se pak cysta dostává mimo tělo hostitele.

K nákaze dochází pozřením cyst, které se hojně vyskytují ve znečištěných vodách nebo na potravinách. Možný je i přímý fekálně – orální přenos kontaktem např. mezi malými dětmi nebo při sexu. Infekční dávka je velmi malá. K vyvolání infekce stačí jen několik cyst. Po průchodu žaludkem dochází v duodenu k excystaci a z jedné cysty vznikají dva dvoujaderní trofozoiti s osmi bičíky. Bičíkovci se ve střevě silně množí, adherují přísavným diskem k enterocytům a mechanicky je poškozují. Inkubační doba giardiózy je od jednoho do tří týdnů (Volf et Horák 2007).

Onemocnění častěji postihuje děti než dospělí. U některých jedinců se nákaza giardiózou vůbec nemusí viditelně projevit. Většinou však ale pozorujeme bolesti břicha, nevolnost, zvracení, akutní nebo chronický průjem a malabsorpční syndrom (Busatti et al. 2009). Nákazu provází poruchy štěpení a vstřebávání sacharidů a tuků v duodenu, vzniká steatorrhea (přítomnost tuků ve stolici) a průjmová stolice bývá světlá a mastná (Volf et Horák 2007).

Giardióza patří v České republice mezi nejčastější střevní protozoární onemocnění, pravidelně bývá zachyceno několik set případů ročně. Nákazou *Giardia intestinalis* však trpí celosvětově miliony lidí. Nejvíce případů se vyskytuje v subtropických a tropických krajinách (Volf et Horák 2007).

Diagnostika se opírá o mikroskopické vyšetření stolice a záchyt cyst (Volf et Horák 2007). Možné je použití molekulárních metod (PCR) (Kim et al. 2009). V dnešní době je preferována detekce pomocí monoklonálních protilátek za použití vysoce citlivých a specifických ELISA testů (Puszkailer 2009, Uyar et Taylan Ozkan 2009):

K léčbě giardiózy se používají nitroimidazolové preparáty metronidazol nebo tinidazol, které jsou účinné i v jedné dávce. Lze podat i albendazol či nitazoxanid, ale je nutno podat více dávek (Rossignol 2010).

Prevence spočívá v dodržování všeobecných hygienických zásad, zabezpečení hygienického odvádění fekálií. Provádění dezinfekce pitné vody. Bylo dokázáno, že *Giardia intestinalis* je odolná proti chlóru. Proto byla vyvinuta tzv. fotokatalytická dezinfekce pomocí TiO₂. Účinné odstranění cyst lze provést pomocí UV záření (Navalon et al. 2009, Shin et al 2009).

1.2.1.3 Amoebózy

Do Amoebozoí (měňavek) řadíme mnoho rodů a druhů jednobuněčných organismů. Nejvýznamnějším rodem z hlediska parazitárních střevních onemocnění v České republice je rod *Entamoeba* (Tolarová 2006).

Buňky rodu *Entamoeba* mají velice chudou organelovou výbavu. Trofozoit je jednojaderný, chybí mitochondrie, Golgiho aparát, peroxisomy a bičíky včetně bazálních tělísek. Trofozoit obsahuje mnoho potravních vakuol. Zralé cysty jsou jedno- až osmijaderné (Volf et Horák 2007).

Amoebózou onemocní celosvětově miliony lidí. Největší výskyt a úmrtnost je v rozvojových zemích, kde ročně této infekci podlehnou až 100 tisíc lidí (González-Salazar et al. 2009). V České republice se amoebóza nachází převážně importovaná ve formě nosičství cyst a jako jediná parazitární nákaza má mírně stoupající tendenci výskytu. Ve vzorcích stolice jsou nejčastěji detekováni zástupci rodů *Endolimax nana*, *Entamoeba coli* a *Entamoeba histolytica/dispar* (Tolarová 2006). Přičemž je velmi důležité rozlišení těchto druhů z hlediska jejich patogenity pro člověka (Singh et al. 2009). První dva zmíněné rody představují nepatogenní komenzály lidského střeva, kteří mohou způsobit onemocnění pouze ve výjimečných případech, zatímco

Entamoeba histolytica je invazivní patogenní prvok, způsobující u lidí měňavkovou úplavici a mimostřevní nákazy (Volf et Horák 2007).

K nákaze dochází pozřením vysoce odolných cyst o velikosti 12 – 15 μm . Uvnitř hostitele dochází k excystaci, kdy se stěna čtyřjaderné cysty rozpustí a binárním dělením vznikne 8 nových jednojaderných trofozoitů, kteří se mohou pohybovat pomocí lobopodií. Mají velikost 10 – 60 μm . Rozlišujeme dvě formy *Entamoeba histolytica*. Neinvazivní formu *minuta* a patogenní invazivní formu *magna* (Förstl et al. 2003)

Trofozoiti formy *minuta* kolonizují lumen tlustého střeva. Jsou velcí 10 – 20 μm (Volf et Horák 2007). Množí se binárním dělením, živí se bakteriemi a v průběhu vývoje se mění v čtyřjadernou cystu vylučovanou se stolicí. U formy *minuta* jde vždy jen o bezpříznakové nosičství s vylučováním cyst (Förstl et al. 2003). Za určitých okolností, jako je např. kyslíkový stres nebo změna střevní mikroflóry, adhezuje améba ke střevní sliznici a mění se na invazivní formu *magna*, která napadá enterocyty (Volf et Horák 2007).

Trofozoiti formy *magna* mohou dosáhnout velikosti až 60 μm . Je označována též jako erytrofágové stadium. V jejich cytoplazmě jsou totiž často nalézány fagocytované erythrocyty. Tato forma netvoří cysty a nemůže se tudíž dostat do dalšího hostitele. Po invazi střevní sliznice pronikají améby hlouběji do submukózy. Zde se rychleji šíří do stran a vzniká typická léze (tzv. lahvový vřed). Výjimečně může dojít k perforaci střeva s následnou smrtí (Volf et Horák 2007). U intestinální formy onemocnění rozlišujeme vedle akutní dyzentérie ještě fulminantní amébovou kolitidu a vzácně amébovou apendicitidu. Při extraintestinální améboze může prvok invadovat prakticky kterýkoliv orgán v těle (játra, plíce, mozek, kůže), ale nejčastěji vzniká amébový jaterní absces (Santi-Rocca et al. 2009). Tato extraintestinální forma je velmi nebezpečná a často končí smrtí. Příznaky jsou různé, horečka, anorexie, zvracení, nevolnost a krvavý průjem (Förstl et al. 2003). U mnoha lidí nakažených *E. histolytica* k onemocnění nedojde a améby u nich zhruba po roce vymizí (Volf et Horák 2007).

Léčba spočívá v zachycení améb v průběhu asymptomatické infekce a následného podání diloxanid furoátu nebo paromomycinu (Volf et Horák 2007). Propuklá symptomatická choroba se léčí tinidazolem (Granizo et al. 2009),

metronidazolem nebo emetinem (Volf a Horák 2007). Výzkum poukazuje i na účinek ivermektinu, jeho aktivita však musí být ověřena na zvířecích modelech (González-Salazar et al. 2009).

Diagnostika je založena na mikroskopickém nálezů čtyřjaderných cyst, případně trofozoitů ve stolici. Využívá se rovněž sérologických testů (Volf et Horák 2007). Lze detekovat specifické antigeny ve stolici (Uyar et Taylan Ozkan 2009). K identifikaci a rozlišení patogenní *E. histolytica* od nepatogenních *E. coli* a *Endolimax nana* je třeba použít vysoce citlivou a účinnou metodu PCR (Singh et al. 2009).

Prevence závisí především na hygienickém odstraňování fekálií, pití nezávadné vody a konzumace nezávadné zeleniny a ovoce. Důležitá je i ochrana potravin před hmyzem, který může pasivně na svém těle přenášet cysty. V neposlední řadě se vyhýbáme přímého styku s akutně nemocným pacientem.

1.2.1.4 *Ascaris lumbricoides*

Ascaris lumbricoides (Linné, 1758) neboli škrkavka dětská patří mezi Nematoda a čeledi Ascarididae (Jíra 1998).

Škrkavka dětská je kosmopolitní parazit tenkého střeva člověka a lidoopů způsobující tzv. askariózu. Infekce byla nalezena např. i u psů jakožto možný zdroj infekce u lidí (Shalaby et al. 2010). Jedná se o endemickou střevní geohelmintózu vyskytující po celém světě s vysokou prevalencí v tropických a subtropických oblastech (Jíra 1998, Volf et Horák 2007).

Válcovité tělo škrkavky dosahuje délky od 10 do 30 cm a je na obou koncích zašpičatělé. Infekční stadiem představují vajíčka vylučovaná stolicí, ve kterých se za příznivých podmínek začíná vyvíjet larva. K infekci dochází jejich požitím s kontaminovanou potravou či vdechnutím. Infekční vajíčka mohou přežívat ve vnějším prostředí 5 – 12 let, v suchu však jen několik dní. V hostiteli se larva v duodenu uvolňuje z vaječných obalů a aktivně migruje. Po proniknutí do střevní stěny se dostává do portálního oběhu a následně do jater. Z jater opět krevním systémem přes pravé srdce do plic. V plicích 10 dní larva roste a poté vylézá dýchacími cestami do ústní

dutiny, kde je následně opět spolknuta. Ve střevech pak dosahuje pohlavní zralosti (Jíra 1998).

Při intestinální fázi se často nemusí projevit žádné příznaky onemocnění, někdy jsou pozorovány pouze nespecifické bolesti břicha (Das et al. 2007). Migrující larvy poškozují jaterní parenchym a způsobují krvácení a záněty (Volf a Horák 2007). Krevní a plicní fáze je doprovázena emboliemi (Ashraf et al. 2009), kašlem, záněty plic, horečkami a eozinofilii (Volf a Horák 2007). Dospělý červ se může dostat i do jater, žlučových cest, žlučníku, či pankreatu a způsobit mnoho nepříjemných komplikací (Mangiavillano et al. 2009, Das et al. 2007, Wu 2009).

Léky používané proti askarióze jsou preparáty benzimidazolové řady jako např. mebendazol, albendazol, tiabendazol či levamizol (Jíra 1998).

Diagnostika většinou spočívá v mikroskopickém nálezů vajíček ve stolici. V některých případech je vhodné ultrazvukové vyšetření (Jíra 1998) nebo endoskopie (Mangiavillano et al. 2009). Lze využít i molekulární metodu PCR (Leles et al. 2009).

Prevenčí se rozumí dodržování zásad osobní hygieny a zajištění zdravotně nezávadných potravin (Jíra 1998). Vajíčka *Ascaris lumbricoides* v půdě lze inaktivovat pomocí mikrovlnného, či UV záření nebo pomocí ozonu (Mun et al. 2009).

1.2.2 Střevní oportunní paraziti člověka

Oportunními nazýváme ty parazity, kteří vyvolávají onemocnění jen v případě imunodeficitu napadeného jedince. Imunitní systém zdravého člověka si dokáže s těmito mikroorganismy bez větších potíží poradit (Spausta et al. 2005).

Nejohroženějšími skupinami jsou bezpochyby pacienti s AIDS ($CD4 < 200/mm^3$), u kterých tyto parazity způsobují chronické průjmy a malabsorpci (Caruso et al. 2009), příjemci transplantovaných orgánů (Barsoum 2006), narkomani, cestovatelé a děti (Didier et Weiss 2006). Byla pozorována i významná korelace mezi výskytem parazita a vyšším věkem infikovaných jedinců (Spinelli et al. 2006).

Mezi střevní oportunní parazity řadíme *Cryptosporidium hominis* Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson, Lal, Xiao, 2002 *Cryptosporidium parvum* Tyzzer 1912, Mikrosporidie: *Enterocytozoon bieneusi*

Desportes, Le Charpentier, Galian, Bernard, Cochand-Priollet, Larvergne, Ravisse et Modigliani, 1985, *Encephalitozoon* spp. (*cuniculi/hellem/intestinalis*) Levaditi, Nicolau et Schoen, 1924 / Didier, Didier, Friedberg, Stenson, Orenstein, Yee, Tio, Davis, Vossbrinck, Millichamp et Shaddock, 1991 / Cali, Cotler et Orenstein, 1993, *Strongyloides stercoralis* Bavay, 1876, *Cyclospora cayetanensis* Ortega, Gilman et Sterling, 1994 a *Isospora belli* Wenyon, 1923.

1.2.2.1 *Mikrosporidie*

Po molekulárně-fylogenetických studiích byl kmen Mikrosporidia zařazen do říše hub (Fungi) (Volf et Horák 2007).

Mikrosporidie jsou jednobuněčná, obligátně intracelulární parazitická protista poprvé objevena před více než 100 lety (Joseph et al. 2005, Sancak et Akyön 2005). Dosud bylo popsáno přibližně 1200 druhů parazitujících téměř ve všech živočišných druzích, včetně člověka (Williams 2009).

Intracelulárnímu životu jsou přizpůsobeny svou extrémně zjednodušenou buněčnou stavbou (Volf a Horák 2007). Vstup parazita do hostitelské buňky je však unikátní a vysoce specializovaný (Keeling et Fast 2002). Infekční stadium představuje velmi odolná spora. Její velikost se u různých druhů liší (Sancak et Akyön 2005). Dosahuje většinou velikosti od 1 do 40 μm . Spora mikrosporidií je vybavena dlouhou injekční trubicí, pomocí níž je zárodek injikován přímo do cytoplasmy hostitelské buňky (Volf a Horák 2007). Uvnitř buňky se parazit změnil v meront s jednoduchou stavbou a pak prodělá většinou několik rozmnožovacích cyklů (nazývaných schizogonií nebo merogonií) (Hausmann et Hülsmann 2003). Během této fáze rozmnožovacího cyklu vznikají dceřiné buňky, které se dále dělí, ale nepoškozují hostitelskou buňku. K poškození hostitelských buněk (většinou epiteliálních) dochází až ve druhé fázi cyklu v tzv. sporogonii. Dceřiná buňka se po vytvoření denzní buněčné stěny mění na sporoblast s vysokým stupněm buněčné diferenciace a nakonec dozraje v infekční sporu. Hostitelská buňka je naplněna sporami a následně zničena jejich uvolněním (Volf et Horák 2007).

Spory mikrosporidií se nejčastěji šíří znečištěnou vodou, ale může docházet i ke kontaminaci potravy. Hovoříme tedy o alimentárním přenosu parazita (Didier et al. 2005).

Během posledních 15 let je celá řada mikrosporidií považována za oportunní parazity a to hlavně u imunodeficitních jedinců. Největší pozornost je věnována hlavně pacientům s AIDS, u kterých počet CD4 lymfocytů klesá pod 200/mm³ (Derouin 2007, Farthing 2006, Mathis et al. 2005, Didier et al. 2005). Další ohroženou skupinou jsou příjemci transplantovaných orgánů. Četnost výskytu mikrosporidiozy u transplantovaných pacientů sice není známa, ale je méně častá, než virové či bakteriální infekce (Barsoum 2006). Mikrosporidie mohou způsobovat infekční onemocnění i u dětí, cestovatelů a strašících osob (Didier et al. 2005).

Infekce se projevuje hlavně chronickými nekrvavými průjmy (Didier et al. 2005). Kromě střevního epitelu mohou ale mikrosporidie napadnout plíce, svaly a ledviny. Je známa i oční mikrosporidioza, která bývá součástí systémových infekcí a nebo izolovaná. Nedávné zprávy ukazují na rostoucí počet případů očních mikrosporidiaz u imunokompetentních jedinců (Joseph et al. 2005).

Mezi nejčastější mikrosporidie zjištěné u lidí patří rod *Enterocytozoon* a *Encephalitozoon* (Didier et al. 2005).

Enterocytozoon bienersi je parazitem epitelu duodena a jejunu, žlučových cest, případně dýchacího epitelu člověka. Spora měří jen okolo 1 μm. Je to nejčastěji diagnostikovaná mikrosporidie při AIDS (Volf et Horák 2007). *Enterocytozoon bienersi* však neinfikuje pouze člověka, ale je často identifikován u řady savců, například u domácích zvířat a nákaza může mít i zoonotický charakter (Thellier et Breton 2008).

Vývojová stadia a spory *Encephalitozoon intestinalis* mají jednotlivá jádra, vývoj probíhá ve velké vakuole v hostitelské buňce. Nákaza je často asociována s chronickými průjmy a enteritidami hlavně u pacientů s AIDS. Extraintestinální forma může způsobit infekce žlučových cest, dýchacího traktu či ledvin (Volf et Horák 2007).

K diagnostice mikrosporidií se používají různé metody. Patří sem například světelná, popřípadě imunofluorescenční mikroskopie, tou však nelze určit druh mikrosporidie. K přesnější diagnostice lze použít elektronovou mikroskopii nebo

v dnešní době asi nejvíce využívané molekulárně-genetické metody (PCR, real-time PCR) (Joseph et al. 2005).

Aktuální terapie mikrosporidiozy představuje podání albendazolu nebo benzimidazolu. Těmito léky se však léčí pouze nákaza druhem *Encephalitozoon spp.*. V případě nákazy *Enterocytozoon bienusi* je léčba složitější. Pro tento druh mikrosporidie není zatím účinná specifická léčba. Jako alternativa se ukazuje podání fumagillinu. Bylo však dokázáno, že jeho systémové podání je pro většinu savců toxické (Didier et al. 2004, Didier et al. 2005, Gross 2003).

1.2.2.2 Kryptosporidie

Jednobuněční paraziti rodu *Cryptosporidium* patří do kmene Apicomplexa a třídy Cryptosporidea způsobují střevní onemocnění zvané kryptosporidióza.

Nejvýznamnější jsou zástupci dvou druhů kryptosporidií a to *C. parvum* a *C. hominis*.

C. hominis bylo původně považováno za lidský genotyp *C. parvum* (Volf et Horák 2007). Je to druh specializovaný na člověka, ale může infikovat i prasata, jeřhata a opice. Pro člověka je velmi virulentní, s vysokým potenciálem interhumánního přenosu. V České republice je výskyt *C. hominis* vzácný. Častější je v západní Evropě (např. v Británii), sub-saharské Africe, Asii a USA (Chako et al. 2009), kde výskyt infekce dramaticky vzrostl od roku 2004 (Yoder et Beach 2010). Kryptosporidióza představuje velké riziko pro imunokompetentní i imunodeficitní jedince (Ditrich et al. 2005).

C. parvum je druhem s nejširším hostitelským spektrem. Infikuje kopytníky, hlodavce, zajíce, šelmy a primáty včetně člověka. Je nejlépe prozkoumaným druhem a týká se jej většina informací o imunitní odpovědi, biochemických cyklech apod. Na našem území se *C. parvum* hojně vyskytuje hlavně v chovech hospodářských zvířat především u skotu. Nákaza je častá hlavně u dětí. Oocysty tohoto druhu jsou přítomny ve většině povrchových vodních zdrojů, vyskytují se i v hlubinných zdrojích. Představuje relativně velké riziko pro imunokompetentní i imunodeficitní jedince (Ditrich et al. 2005).

Kryptosporidie se šíří fekálně-orálním transportem. Po spolknutí oocysty dochází k excystaci a uvolnění sporozoitů, kteří vyhledávají povrch střevní sliznice hostitele a usidlují se v zóně mikrokloků. Adherují k buňkám, vnikají do nich a mění se v trofozoity. Další vývoj probíhá v tzv. parazitoforní vakuole, která vzniká obklopením zoitu výběžky hostitelské buňky. Trofozoiti se nepohlavně dělí merogonií; výsledkem jsou meronti I. typu obsahující 8 merozoitů, kteří merogonii opakují. Během druhé merogonie vznikají 4 merozoity, které zrají v mikrogametocyty a makrogametocyty. Mikrogamety oplodní makrogamety, vzniká zygota, která následně zraje v oocystu o velikosti 5 – 7 μm . Přibližně pětina oocyst je tenkostěnných, zodpovědných za autoinfekce. Čtyři pětiny oocyst mají silnou tlustou stěnu. Jsou velmi odolné a jsou určené pro vnější prostředí a mezihostitelský přenos (Volf et Horák 2007, Ditrich et al. 2005).

U imunokompetentních jedinců se kryptosporidióza projeví vodnatým průjmem a po nějaké době sama odezní. Někdy může onemocnění proběhnout bezpříznakově. U imunodeficitních jedinců bývá průběh infekce odlišný. Onemocnění je chronické a nejvíce tendenci k samovolnému vyléčení, naopak, často diseminuje do dalších orgánů. Může se dostat do žaludku, jícnu, sliznice žlučových, vývodů pankreatu a dýchacího traktu. Průběh onemocnění však závisí na stupni imunodeficiencie (Ditrich et al. 2005).

Účinná léčba kryptosporidiózy dosud není známá (Volf et Horák 2007). U imunokompetentních pacientů se používá symptomatická léčba, především rehydratace organismu. U pacientů s HIV infekcí se jako nejúčinnější jeví léčba samotné HIV infekce pomocí antiretrovirové terapie (Ditrich et al. 2005).

K diagnostice kryptosporidií ve stolici se nejčastěji používá světelná mikroskopie. Lze využít i komerčně dostupné imunodiagnostické testy (IFAT nebo ELISA) či testy molekulární (Ditrich et al. 2005).

Jako u všech infekcí s fekálně-orálním transportem i u kryptosporidiózy spočívají hlavní způsoby jejího tlumení v hygienických opatřeních, v dalším šíření kanalizace a v režimu čištění odpadních vod (Ditrich et al. 2005).

1.2.2.3 *Iso*spora belli

*Iso*spora belli patří stejně jako kryptosporidie do kmene Apicomplexa ale do třídy kokcií. Je řazena do řádu Eimeriida, rodu *Iso*spora (Volf et Horák 2007).

Infekce začíná pozřením oocysty oválného tvaru o velikosti 22 - 33 μm na 10 – 19 μm . Oocysta obsahuje ve dvou sporocystách po čtyřech sporozoitech. Ty excystují v tenkém střevě hostitele a invadují do střevního epitelu, kde se dále vyvíjejí. Sporozoity se uvnitř hostitelské buňky mění ve velké mnohojaderné meronty. Meronti dále rostou, nepohlavně se dělí a dávají vzniknout merozoitům, kteří napadají další buňky. Makrogamonti se dále nedělí a dospívají v oocysty. Z mikrogamontů dělením vznikají tříbičíkaté mikrogamety. Po oplození vznikají zygoty, které se mění v oocysty a jsou vylučovány stolicí. Další vývoj se odehrává ve vnějším prostředí, kde dochází k vývoji sporocyst, z nichž každá obsahuje 4 sporozoity (Volf et Horák 2007).

Onemocnění isosporidiózou není pro imunokompetentní jedince nebezpečné. Většinou probíhá asymptomaticky nebo s mírnými průjmy. Život ohrožující riziko však představuje u imunosuprimovaných jedinců. Donedávna byla isosporidióza ignorována. Na vědomí se začala brát až s rostoucím počtem nakažených jedinců HIV jako jedna z příčin oportunních infekcí, kterými tito pacienti často trpí (Jíra 2009). Byl zjištěn i případ onemocnění pacientů po transplantaci jater či ledviny (Atambay et al. 2007, Koru et al. 2007).

Onemocnění se projevuje vodnatými nekrvavými průjmy, bolestí břicha a křečemi, jejichž důsledkem je často anorexie a ztráta hmotnosti. Může se objevit zvracení či horečka. Tyto projevy mohou trvat několik dnů, ale i několik let (Jíra 2009). Paraziti se však mohou dostat i do jiných orgánů. Byli nalezeni např. ve žlučníku (Walther et Topazian 2009) nebo v lymfatických uzlinách (Frenkel et al. 2003).

Isosporidióza se vyskytuje po celém světě, má však endemický charakter s výrazně vyšší prevalencí v tropických a subtropických oblastech se špatnými hygienickými podmínkami. Přenos je totiž uskutečňován fekálně-orální cestou infikovanou vodou či potravinami (Jíra 2009).

Z důvodu použití správné léčby je nutné rozlišit isosporidiózu od kryptosporidiózy. Isosporidiózu lze totiž léčit antibiotiky na bázi sulfonamidů. Příkladem je trimethoprim-sulfamathoxazol (Jíra 2009).

Diagnostika se provádí mikroskopickým vyšetřením stolice. Jednoduchou, velmi citlivou a levnou metodou je zjišťování oocyst ve vzorku na základě jejich autofluorescence (Bialek et al. 2002). Další možností je biopsie duodena, elektronová mikroskopie a PCR (Walther et Topazian 2009).

Základem prevence je řádná hygiena (Jíra 2009).

1.2.2.4 Cyclospora cayetanensis

Do kmene Apicomplexa a třídy kokcií patří i zástupce rodu *Cyclospora*. U člověka parazituje lidská kokcidie *C. cayetanensis* (Volf et Horák 2007).

Životní cyklus je prakticky stejný jako u výše uvedeného parazita *I. belli*. Člověk se nakazí pozřením oocysty, ze které pak vznikají čtyři sporozoiti, kteří napadají epitelové buňky tenkého střeva, především jejuna. Po pohlavním dělení vzniká zygota, která se mění v oocystu vylučovanou ven z hostitele společně se stolicí (Jíra 2009).

První případy infekce byly hlášeny po roce 1970 a to hlavně u lidí v endemických oblastech tropů a subtropů a u cestovatelů. Od té doby je cyklosporidióza považována za příčinu cestovatelských průjmů (Ortega et Sanchez 2010). Infekce se v tropech vyskytuje nejvíce v létě v období dešťů a nejnižší prevalence byla zjištěna na jaře v období sucha (Kimura et al. 2005). V zemích mírného pásma se průjmová onemocnění působená cyklosporou objevují jako jednotlivé importované případy nebo jako drobné místní epidemie, kdy dojde k nákaze potravinami (ovoce, zelenina) kontaminovanými fekáliemi (Volf et Horák 2007).

Infekce *C. cayetanensis* se projevuje vodnatými průjmy, nechutenství, hubnutí, zvýšená plynatost, nevolnost a únava. Inkubační doba bývá většinou týden a samotné onemocnění může trvat až šest týdnů. Při neléčené infekci často dochází k relapsům. Oocysty *C. cayetanensis* byly nalezeny např. i ve sputu (Hussein et al. 2005). Těžší formy onemocnění bývají u pacientů s AIDS (Jíra 2009). Bylo zjištěno, že infekce se častěji vyskytuje u dětí a starších lidí (Burstein Alva 2005).

Diagnostika se provádí mikroskopickým vyšetřením stolice, střevní biopsií nebo metodou PCR (Jíra 2009). Detekce byla prováděna i pomocí průtokové cytometrie (Dixon et al. 2005).

Průjmové onemocnění způsobené *C. cayetanensis* lze léčit podáním trimethoprim-sulfamethoxazolu (Bourée et al. 2007).

1.2.2.5 Strongyloides stercolaris

Strongyloides stercolaris neboli hádě střevní je helmintem řazeným mezi hlístice. Náleží do řádu Rhabditida a rodu *Strongyloides* (Volf et Horák 2007).

Strongyloides stercolaris je původcem infekčního onemocnění zvaného strongyloidiáza s kosmopolitní distribucí hlavně v tropických a subtropických oblastech. Odhadem je hádětem infikováno 30 – 100 milionů lidí na celém světě (Ardıç 2009).

Parazitickou formou jsou pouze samičky produkující vajíčka mitotickou partenogenezí. Samice měří 0,8 – 2,2 mm. Ve vajíčcích se vyvíjejí rhabditiformní larvy L1, které se často líhnou ještě ve střevě hostitele. Ve vnějším prostředí se vyvíjejí buď v infekční filariformní L3, nebo se svlékají čtyřikrát a dávají vzniknout volně žijící generaci samců a samic. Z oplozených vajíček volně žijících samic se vyvíjejí larvy do infekčního stadia L3, které napadají hostitele (Volf et Horák 2007). L3 aktivně pronikají kůží a jsou krevním oběhem zanášeny do plic, následně migrují do ústní dutiny a jsou spolknuty. Během migrace se mění v L4, která se v průběhu asi dvou týdnů vyvíjí ve střevním epitelu v dospělé samice (Jíra 1998).

Člověk se nakazí při styku s půdou, v níž se nacházejí invazivní larvy nebo alimentární cestou kontaminovanou vodou nebo potravinami (Jíra 1998). Strongyloidiáza je definována akutní manifestací, častými autoinfekcemi nebo hyperinfekcemi (Taylor et Aziz 2009). Infekce má v počátku často lehký průběh (Bava et Troncoso 2009). Objevují se dermatitidy, eozinofilie, kašel nebo průjmy a horečka. Fatální následky však může infekce mít u imunodeficitních pacientů (Volf et Horák 2007), u kterých hrozí nebezpečí hyperinfekčního syndromu způsobeného zaplavením organismu larvami (Jíra 1998). Nejohroženějšími skupinami jsou příjemci transplantátů

(Rodriguez – Hernandez et al. 2009), pacienti po imunosupresivní terapii (Basile et al. 2010), nakažení virem HIV (Bava et Troncoso 2009), chronicky nemocní (Jíra 1998). Infekce může vyústit až ke kožním lézím, respiračnímu selhání a sepsi (Basile et al. 2010).

Diagnóza se provádí na základě mikroskopického zjištění larev ve stolici, hlenu či duodenálním aspirátu (Ardıç 2009), při hyperinfekci lze larvy nalézt rovněž ve sputu, žaludečním obsahu, v moči a v mozkomíšním moku (Jíra 1998). Lze využít i imunodiagnostiku v podobě ELISA testů (El – Badry 2009).

K léčbě se používají širokospektrá antihelmintika např. tiabendazol, mebendazol, albendazol či ivermektin (Jíra 1998).

2 Cíle práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit, zda jsou staří lidé ohroženou skupinou, co se týče infekcí oportunními střevními parazity. Dále se pokusit porovnat frekvenci výskytu parazitů u lidí v geriatrickém zařízení a lidí žijících ve vlastní domácnosti.

2.2 Hypotézy

H_{01} : Život starého člověka v geriatrickém zařízení se odráží na výskytu lidských střevních mikrosporidií

H_{A1} : Život starého člověka v geriatrickém zařízení se neodráží na výskytu lidských střevních mikrosporidií

H_{02} : Věk hraje důležitou roli ve výskytu lidských střevních mikrosporidií

H_{A2} : Věk nehraje žádnou roli ve výskytu lidských střevních mikrosporidií

3 Metodika

3.1 Charakteristika sledovaného souboru

Sledovaný soubor se skládal ze 47 osob, které nám poskytly vzorky stolice. Z celkového počtu bylo 36 jedinců z geriatrického zařízení. Od lidí, kteří žijí ve své vlastní domácnosti, jak ve městě, tak na vesnici, se nám podařilo získat pouze 11 vzorků.

Dále nás zajímal hlavně věk jedinců (Tab. 1). Kromě hodně starých lidí, které lze považovat za seniory, poskytli vzorek stolice i lidé relativně mladší, jejichž věk se pohyboval kolem 50 let. Pohlaví nebylo zjišťováno.

Tab. 1: Věková struktura sledovaného souboru

Věk	Počet	%
47 - 60	6	12,7
61 - 70	8	17
71 - 80	10	21,3
81 - 90	21	44,7
91 - 100	2	4,2

3.2 Odběr vzorků

K výzkumu jsme použili vzorky nativní stolice, které byly odebírány do poskytnutých uzavíratelných nesterilních odběrových kelímků. Většina odběrů se uskutečnila v Písku. Pouze 3 osoby pocházely z vesnice v okolí Písku. Nejdelší interval mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním činil 2 dny.

Vzorky, které nebylo možno ihned zpracovat, byly skladovány při teplotě do 5°C.

Jsem si vědoma možného vlivu časového intervalu mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním, stejně tak si jsem vědoma vlivu skladování materiálu na výsledky šetření.

3.3 *Metody*

Vzorky stolice byly vyšetřeny pomocí několika diagnostických metod. Základní metoda představovala mikroskopické vyšetření stolice. Dále byla použita molekulárně-genetická metoda polymerázové řetězové reakce (PCR).

3.3.1 *Mikroskopické hodnocení stolice*

3.3.1.1 *M.I.F.C.*

Sedimentační metoda používaná k diagnostice klidových stádií protist, vajíček a larev ve stolici.

Použité roztoky:

- roztok MIF (500 ml H₂O; 50 ml 40% formaldehydu; 400 ml 0,1% roztoku mertiolátu sodného; 10 ml glycerinu)
- Lugolův roztok (1 g krystalického jodu; 2 g KJ; 100 ml H₂O)

Postup:

1. Vzorek odebrané stolice spolu s 5 ml MIF a 1 ml Lugolova roztoku byl zhomogenizován ve zkumavce.
2. Homogenní směs byla přefiltrována přes gázový filtr.
3. K čistému extraktu bylo přidáno 6 ml éteru, roztřepáno a centrifugováno 2 minuty při 1500ot./min.
4. Vzniklý prstenec byl uvolněn špejlí a vzorek byl slit.
5. Následné prohlížení sedimentu usazeného na dně zkumavky.

Preparát se prohlíží pod světelným mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení 40x.

3.3.1.2 *Barvení podle Miláčka a Vítovce (1985)*

Této metody se využívá k detekci oocyst kryptosporidií.

Použité roztoky:

- roztok methylvioleti (methylvioleť 0,6 g, anilin 1 ml, fenol 1 g, etanol 30 ml, deionizovaná voda 70 ml)
- kyselina sírová (2% vodný roztok)

- roztok tatrazinu (1% tatrazin v 1% kyselině octové)

Postup:

1. Vzorek stolice byl rozetřen na podložní sklíčko a nechán zaschnout.
2. Byla provedena fixace methanolem v plameni.
3. Poté se sklíčko se vzorkem obarvilo roztokem methylvioleti (30 minut).
4. Po opláchnutí vodou se provedla diferenciací 2% kyselinou sírovou (2 minuty).
5. Opět se opláchno ve vodě a vzorek se dobarvil tatrazinem.
6. Oplach vodou a sušení.

K prohlížení preparátu byl použit světelný mikroskop (OLYMPUS IX70), zvětšení bylo 1000x za použití olejového imerzního roztoku (Obr.1)



Obr. 1: Mikroskop OLYMPUS IX 70

3.3.1.3 Barvení calcofluorem (Vávra et al. 1933)

Tato metoda se používá k detekci mikrosporidií. K falešně pozitivnímu nálezu může dojít záměnou za kvasinky.

Použité roztoky:

- 0,5 % Evansova modř: 0,5 g ve 100 ml PBS
- 0,1 % calcofluor: 0,1 g ve 100 ml PBS

Pracovní postup:

1. Vzorek stolice byl natřen na podložní sklíčko a ponechán uschnout.
2. K zafixování byl použit methanol, fixace po dobu 3 minut.
3. Vzorek byl obarven 0,1 % roztokem calcofluoru po dobu 10 minut.
4. Opláchnutí v PBS.
5. Poté se vzorek dobarvil 0,5 % roztokem Evansovy modře po dobu 5 sekund.
6. Opláchnutí v PBS a nechat schnout.



Obr. 2: Nátěr stolice barvený calcofluorem

Preparát byl prohlížen fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení 1000x s olejovou imerzí při vlnové délce 490 nm. Obarvené spory mikrosporidií mají oválný tvar a pod mikroskopem svítí jasně modro-bíle.

3.3.2 Molekulární diagnostika

3.3.2.1 Extrakce DNA ze vzorků stolice

K 180-200 mg stolice bylo přidáno 200 μ l ASL pufru a 150 mg skleněných partikulích o průměru 0,5 mm. Poté bylo provedeno rozbíjení potenciálně přítomných spór pomocí homogenizátoru (FastPrep®-24, M.P. Biomedicals, CA, USA) po dobu 1 minuty při maximální rychlosti (6,5 m/s) (Obr.3). Dále bylo postupováno podle návodu výrobce

komerčně dodávaného izolačního kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).
Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C (Obr.4).



Obr. 3: Homogenizátor (FastPrep®-24, M.P. Biomedicals, CA, USA)



Obr. 4: Vyizolovaná DNA ze vzorku stolice

3.3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Celkový objem reakční směsi pro každou PCR byl 25 µl (Tab. 2). Byly prováděny vždy dvě sady PCR s různými sety primerů, jedna na prokázání přítomnosti *E. bienersi* a druhá pro *Encephalitozoon* spp. (Tab. 3, Tab. 4). Součástí každé sady PCR byla pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA vyizolovaná z kultury *E. intestinalis* a *E. bienersi* v koncentraci 3×10^7 spór na ml.

Tab. 2: Reakční směs pro PCR (1 reakce)

Použitý roztok	Objem
deionizovaná H ₂ O	13,87 µl
dNTP's	0,50 µl
primer 5'	0,50 µl
primer 3'	0,50 µl
MgCl ₂	1,50 µl
Taq polymeráza	0,63 µl
pufř	2,50 µl
templátová DNA	5,00 µl
celkem	25,00 µl

Tab. 3: Primery pro *Enterocytozoon bienersi*

primery	sekvence
primární PCR	
MSP-1 (15-mer)	TGA ATG (G,T)GT CCC TGT
MSP-2B (16-mer)	GTT CAT TCG CAC TAC T
sekundární PCR	
MSP-3 (24-mer)	GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G)(C,T) TAT
MSP-4B (26-mer)	CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG

Tab. 4: **Primery pro *Encephalitozoon* spp.**

primery	sekvence
primární PCR	
MSP-1 (15-mer)	TGA ATG (G,T)GT CCC TGT
MSP-2A (15-mer)	TCA CTC GCC GCT ACT
sekundární PCR	
MSP-3 (24-mer)	GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G)(C,T)TAT
MSP-4A (27-mer)	CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT

Pro nested primery MSP byl daný amplifikační program na termocykleru (Little Genius, BIOER) (Obr. 5): počáteční denaturace při 94 °C – 3 minuty, denaturace při 94 °C – 45 sekund, nasedání primerů při 55 °C – 45 sekund, syntéza nového řetězce při 72 °C – 1 minuta. Celkem proběhlo 35 cyklů. Následné dosyntetizování nového řetězce při 72 °C trvalo 7 minut.



Obr. 5: **Termocykler (Little Genius,BIOER)**

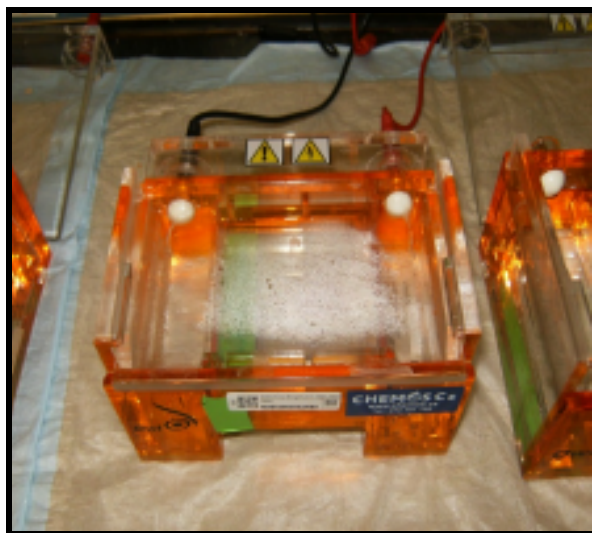
3.3.2.3 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda, při níž dochází k rozdělení DNA fragmentů v agaróze podle molekulových hmotností působením elektrického pole. Pomocí této metody byla ověřována délka DNA fragmentů.

Použité roztoky:

- 50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
- Agaróza
- Ethidium bromid
- 100 bp DNA ladder

Gelová elektroforéza byla prováděna za použití 1% agarózového gelu v 1× TAE pufru s přídavkem ethidium bromidu (výsledná koncentrace v gelu byla 0,5 µg/ml) při napětí 70 V po dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA (Obr.6). Rozdělené DNA fragmenty byly vizualizovány UV transiluminátorem při vlnové délce 302 nm a záznam byl proveden kamerou propojenou s počítačem.



Obr. 6: Vana na elektroforézu

Požadované fragmenty DNA byly zaslány na sekvenaci a fylogenetickou analýzu do Laboratoře genomiky BC AVČR

3.4 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky byly statisticky zpracovány za použití Fisherova exaktního testu v kontingenční tabulce.

4 Výsledky

4.1 Mikroskopické vyšetření stolice

4.1.1 Koncentračně sedimentační metoda M.I.F.C.

V žádném ze 47 vzorků nebyla pomocí koncentračně sedimentační metody M.I.F.C. nalezena vajíčka ani larvy parazitů.

4.1.2 Barvení podle Miláčka a Vítovce

Výsledky vyšetření stolice pomocí barvení, kterým lze zjistit přítomnost kryptosporidií byly stejné jako u předchozí metody M.I.F.C. Ani v jednom vzorku nebyl nalezen parazit.

4.1.3 Barvení calcofluorem

Calcofluorem obarvíme cysty mikrosporidií. Výsledky mikroskopické detekce mikrosporidií znázorňuje tabulka č. 5.

Tab. 5: Výsledky vyšetření stolice pomocí barvení calcofluorem

Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení
1	-	17	-	33	-
2	-	18	-	34	-
3	-	19	-	35	-
4	-	20	-	36	-
5	+	21	-	37	-
6	-	22	-	38	-
7	-	23	-	39	-
8	-	24	-	40	+
9	-	25	-	41	-
10	-	26	-	42	-
11	-	27	-	43	-
12	-	28	-	44	-
13	-	29	-	45	+
14	-	30	-	46	-

15	-	31	-	47	+
16	-	32	-		

Díky této metodě se jevily jako pozitivní 4 vzorky stolice. K chybě však mohlo dojít záměnou spór mikrosporidií za kvasinky či bakterie, jak jsme se následně přesvědčili po použití záchytnější a spolehlivější metody PCR.

4.2 Molekulární diagnostika (PCR)

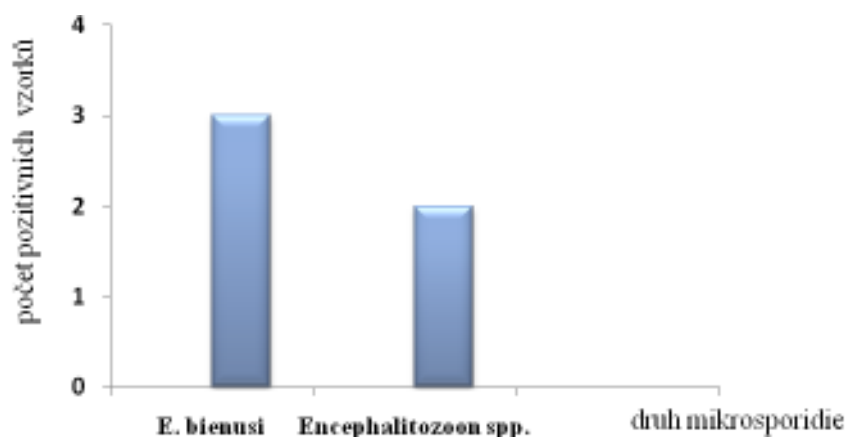
Tabulka č. 6 znázorňuje výsledky získané vysoce citlivou metodou PCR.

Tab. 6: Výsledky vyšetření stolice pomocí PCR

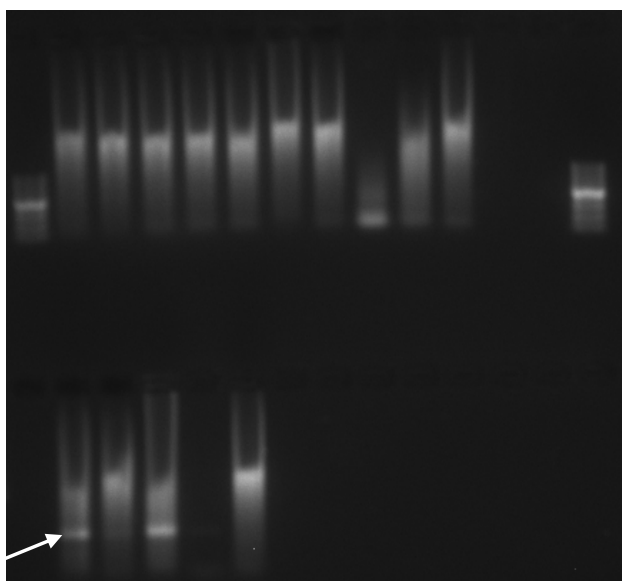
Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení
1	-	17	-	33	-
2	-	18	-	34	-
3	-	19	-	35	-
4	-	20	-	36	+
5	-	21	-	37	-
6	-	22	-	38	-
7	-	23	+	39	-
8	-	24	+	40	-
9	-	25	-	41	-
10	-	26	-	42	-
11	-	27	-	43	-
12	+	28	-	44	-
13	-	29	+	45	-
14	-	30	-	46	-
15	-	31	-	47	-
16	-	32	-		

Po využití metody PCR, která nám umožňuje detekovat DNA parazita ve stolici, jsme získali 5 pozitivních vzorků stolice, v nichž se vyskytovaly mikrosporidie. Z předchozích tabulek můžeme vidět, že se získané výsledky výrazně lišily. Shoda nebyla ani v jednom případě.

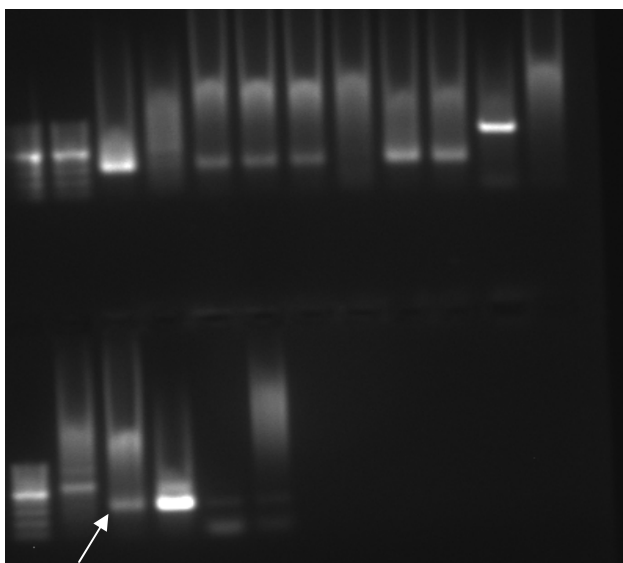
Díky molekulární diagnostice s využitím specifických primerů jsme mohli určit i druh mikrosporidie a zjistit zda se jedná o nákazu *Enterocytozoon bienusi* či *Encephalitozoon* spp. (Obr. 7). Výsledky ukázaly, že se v 3 případech jednalo o *E. bienusi* (Obr.8) a ve 2 vzorcích stolice byl detekován druh *Encephalitozoon* spp (Obr.9).



Obr. 7: Druhy mikrosporidií ve vyšetřovaných vzorcích



Obr. 8: Výsledek gelové elektroforézy (*Enterocytozoon bienusi*)



Obr. 9: Výsledek gelové elektroforézy (*Encephalitozoon* spp.)

4.2.1 Druhová identifikace a genotypizace mikrosporidií

Po následné genotypizaci (neprováděno autorkou), jsme v rámci druhu *Enterocytozoon bienusi* získali 2 genotypy. Ve 2 případech se jednalo o genotyp EbpA a u jednoho vzorku byl identifikován genotyp CZ5. U druhu *Encephalitozoon* jsme zjistili, že se jedná o druh *E. cuniculi* typ I a to v obou případech.

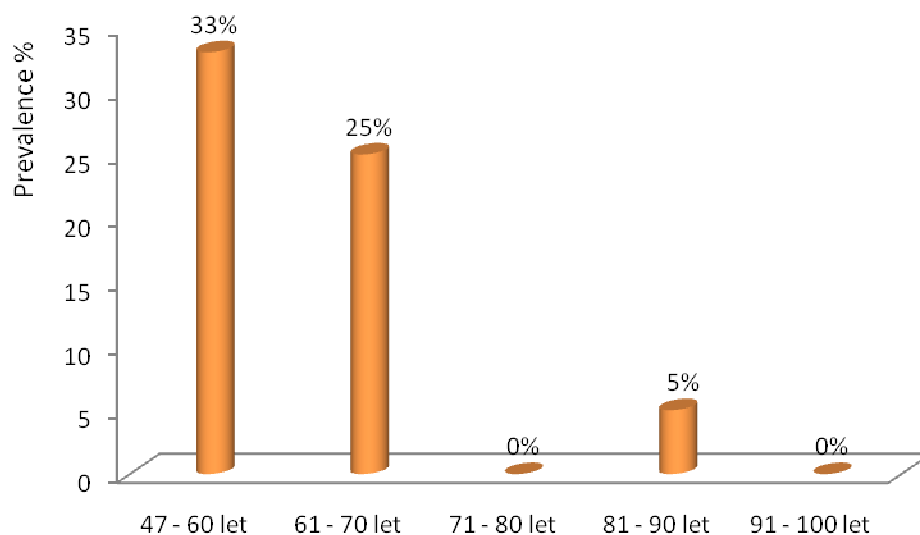
Hlavním úkolem výzkumu bylo zjistit četnost výskytu oportunních parazitů v závislosti na věku infikovaných jedinců viz Tab. č. 7.

Tab. 7: Nálezy mikrosporidií v jednotlivých věkových skupinách

Věk	Počet vzorků	Pozitivní vzorky
47 – 60	6	2
61 – 70	8	2

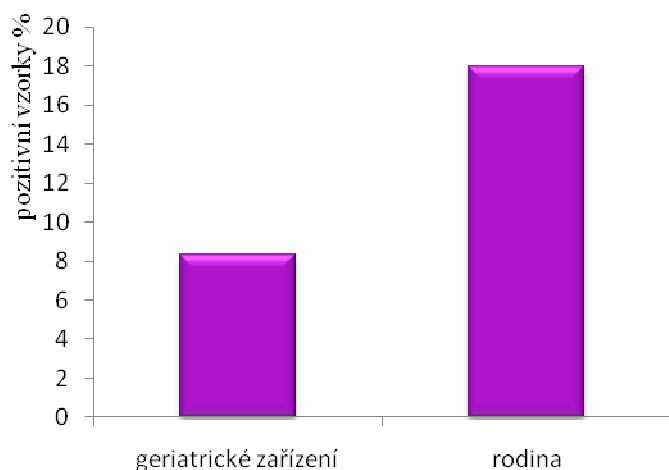
71 – 80	10	0
81 – 90	21	1
91 – 100	2	0

Na obrázku č. 10 můžeme vidět celkovou prevalenci infekce mikrosporidii v určitých věkových kategoriích. Rozdíly mezi jednotlivými věkovými skupinami nebyly statisticky významné ($p < 0,05$).



Obr. 10: Prevalence výskytu mikrosporidií ve věkových kategoriích

Výskyt parazita u klientů geriatrického zařízení byl dle našeho výzkumu zjištěn s prevalencí 8,3 %. U lidí, kteří služby geriatrického zařízení nevyužívají byla prevalence o něco vyšší a to 18 % (Obr.11). Rozdíly však nebyly statisticky významné ($p < 0,05$).



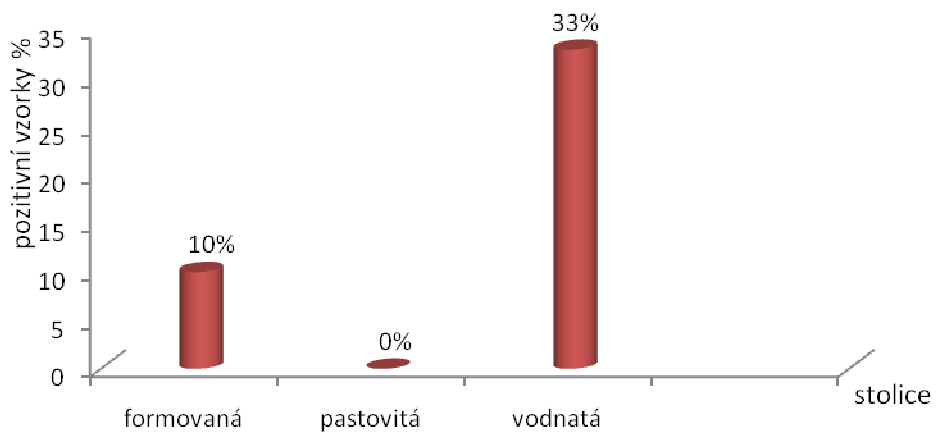
Obr. 11: Výskyt mikrosporidií dle kolektivu

Jednotlivé vzorky stolice měly samozřejmě různou konzistenci. Bylo možné posoudit, zda se jedná o stolicí formovanou, pastovitou či vodnatou (průjmovitou) viz Tab. č. 8.

Tab. 8: Konzistence jednotlivých vzorků stolice

Stolice	Počet vorků	%
formovaná	20	42,5
pastovitá	18	38,3
vodnatá	9	19

Na obrázku č. 12 můžeme vidět, že výskyt mikrosporidií byl častější ve vodnaté stolici. V pastovité stolici se mikrosporidie nevyskytovaly. Rozdíly opět nebyly statisticky významné ($p < 0,05$).



Obr. 12: Výskyt mikrosporidií dle konzistence stolice

V následující tabulce č. 9 jsou shrnuty všechny zjištěné informace o pozitivních vzorcích stolice.

Tab. 9: Přehled zjištěných výsledků vyšetření stolice

Č. vzorku	Věk	Stolice	Kolektiv	Parazit	Genotyp
12	89	formovaná	ger. zařízení	<i>E. cuniculi</i>	genotyp I
23	52	tekutá	rodina	<i>E. bienusi</i>	EbpA
24	67	tekutá	ger. zařízení	<i>E. cuniculi</i>	genotyp I
29	47	formovaná	rodina	<i>E. bienusi</i>	CZ5
36	61	tekutá	ger. zařízení	<i>E. bienusi</i>	EbpA

5 Diskuze

Cílem mé práce bylo zjistit, zda jsou staří lidé náchylní k infekcím oportunními střevními parazity. Tito parazité totiž způsobují závažnější onemocnění pouze v případě imunodeficitu napadeného jedince (Spausta et al. 2005). Je známo, že lidský imunitní systém prodělává v průběhu života zásadní změny. Staří lidé jsou více náchylní k různým infekcím, trpí autoimunitními chorobami, nebo nádorovými onemocněními (Rosato et Salsano 2008). Můžeme je tedy určitě považovat za ohroženou skupinu, co se týče oportunních parazitů, avšak výzkum je nejčastěji zaměřován na osoby nakažené virem lidské imunodeficiency (HIV). U těchto pacientů se uvádí prevalence výskytu onemocnění mikrosporidiiemi v rozmezí 2 – 78 % (Matos et al. 2009). Výzkumy zaměřené pouze na staré lidi běžně prováděny nejsou. Byla však pozorována výrazná korelace mezi výskytem oportunních parazitů a vyšším věkem (Spinelli et al. 2006).

Ve vzorcích vyšetřované stolice jsme pomocí koncentračně-sedimentační metody M.I.F.C. nenašli žádného parazita. Ani obarvení stolice metodou dle Miláčka a Vítovice neprokázalo přítomnost parazitujících kryptosporidií. To je v souladu s trendem, že v České republice dochází k výraznému poklesu výskytu střevních parazitóz. Avšak s tímto klesajícím trendem klesá i ochota a zájem ošetřujících lékařů tato vyšetření indikovat a skutečný výskyt parazitů ve stolici pacientů nemusí být znám (Tolarová 2006). Ve Spojených státech výskyt kryptosporidiozy vzrostl od roku 2004, kdy se tento parazit dostal do lepšího povědomí a zlepšil se i celkový dohled nad prevencí představující kontrolu kvality pitné vody, potravin a omezení kontaktu s infikovanými osobami či zvířaty (Yoder et Beach 2009). Náš vyšetřovaný soubor nebyl příliš rozsáhlý, takže se můžeme pouze domnívat, zda za tímto výsledkem stojí dobrá kvalita pitné vody a zajištění nezávadných potravin. Lze však říci, že se zlepšuje kvalita péče o staré lidi a zajištění jejich potřeb.

K detekci mikrosporidií ve vzorcích stolice jsme použili dvě rozdílné metody. Ta první představovala obarvení vzorků calcofluorem a následné mikroskopické vyšetření na přítomnost spór. Celková prevalence byla 8,5 %. Podobných výsledků bylo dosaženo touto metodou v Etiopii, kde celková prevalence byla 7,6 % (Endeshaw et al. 2006). Z toho lze usoudit, že geografická poloha, sociální a ekonomická úroveň

významně neovlivňuje celkový výskyt spór mikrosporidií v lidské populaci. Výsledky získané mikroskopickou metodou se však poměrně výrazně lišily od výsledků, které jsme získali pomocí vysoce citlivé metody PCR. Ze 4 pozitivních vzorků obarvených calcofluorem se ani u jednoho vzorku nepotvrdila přítomnost mikrosporidií molekulární metodou. Tato neshoda mohla být pravděpodobně způsobena záměnou spór za kvasinky či některých druhů střevních bakterií, které pod UV světlem svítí podobně jako spóry mikrosporidií a mají ve většině případů i stejný tvar. Díky PCR se nám podařilo detekovat 5 vzorků, ve kterých byly přítomné mikrosporidie. Vyšetření stolice metodou PCR má totiž větší záchytnost než mikroskopické vyšetření (Fayer et al. 2003). To se potvrdilo i v našem případě, kdy prevalence při vyšetření calcofluorem byla 8,5 %, zatímco pomocí PCR byla celková prevalence o něco vyšší, 11 %.

Enterocytozoon bienusi je nejčastěji se vyskytující lidskou mikrosporidií (Mathis et al. 2005). V našem výzkumu, kdy z 5-ti vzorků, ve kterých byla potvrzena přítomnost mikrosporidií, šlo ve 3 případech o druh *Enterocytozoon bienusi*. Po určení genotypu jsme získali výsledky takové, že ve dvou případech šlo o genotyp EbpA, který je mimo jiné často detekován i u skotu a prasat. V jednom případě šlo o genotyp CZ5 což je nový, dosud nepopsaný genotyp nalezený už v 1 případě u zdravého člověka. Ve výzkumu zaměřeném na staré lidi ve Španělsku, jejichž průměrný věk byl okolo 75 let, byl *E. bienusi* z 60 případů diagnostikován osmkrát. S prevalencí 17%. (Lores et al. 2002). Dalším druhem, který se vyskytuje u lidí je *Encephalitozoon intestinalis*. Jeho výskyt u lidí není tak častý jako u druhu *Enterocytozoon*, což potvrdil i výzkum v Etiopii kdy v 77 % případů byl detekován *E. bienusi* a v 15,4 % *E. intestinalis*. O smíšenou infekci šlo v 7,7 % případů (Endeshaw et al. 2006). V našich vzorcích stolice jsme sice detekovali zástupce rodu *Encephalitozoon* ve 2 případech, ale nešlo o druh *E. intestinalis* jak bychom očekávali, ale o druh *E. cuniculi*. V obou případech šlo o genotyp I, který je velmi často detekován u králíků. *Encephalitozoon cuniculi* byl opakovaně popisován jako původce závažných lidských infekcí, včetně mozkových lézí (Ganon 1980). Většina těchto údajů však pochází z doby, kdy ještě nebyly popsány další 2 druhy tohoto rodu (*E. hellem* a *E. intestinalis*) a část literárních údajů se jich může týkat. Skutečný *Encephalitozoon cuniculi* (genotyp I) byl v minulém roce

izolován z mozkového abscesu pacienta v Českých Budějovicích (Ditrich, osobní sdělení – dosud nepublikováno).

Nejvíce pozitivních vzorků bylo ve věkové kategorii 47 – 60 let; rozbor výsledků podle věkových kategorií neodhalil závislost výskytu mikrosporidií na věku ($p < 0,05$). Celková prevalence byla 33 %. Tento výsledek je hodně podobný výsledkům vyšetření stolice na přítomnost mikrosporidií u lidí různých věkových a sociálních skupin, které prováděla Markéta Pelikánová v rámci své bakalářské práce. Ze všech věkových skupin bylo nejvíce pozitivních vzorků zaznamenáno právě ve věkové kategorii 50+ (Pelikánová 2009). Avšak výzkum zaměřený na imunokompetentní osoby v Kamerunu poukázal na skutečnost, že nejvíce infikovanou skupinou jsou teenageři a to s prevalencí 81,5 % (Nkinin et al. 2007). K oportunním parazitózám jsou náchylní například i drogově závislí jedinci, což ostatně potvrdil i výzkum, který prováděla v roce 2009 Eva Bucharová v rámci své bakalářské práce. Záchyt mikrosporidií ve vzorcích stolice u této skupiny byl 100% (Bucharová 2009). Výzkum zaměřený na transplantované pacienty v Plzni, který prováděla v roce 2010 Petra Zajíčková, došel k výsledkům, že tato skupina pacientů by neměla být opomíjena, co se týče výskytu mikrosporidie. Mikrosporidie byly diagnostikovány s prevalencí 7% (Zajíčková, osobní sdělení).

Takto vysoká prevalence výskytu parazita u relativně nejmladší kategorie z našeho souboru byla překvapující. Tento výsledek bychom očekávali spíše u starších lidí v důsledku pokročilé fáze stárnutí imunitního systému a tudíž větší náchylnosti k infekci. Nízký výskyt parazita u hodně starých lidí však můžeme odůvodnit i tím, že hodně starý člověk má omezené možnosti pohybu, a tudíž se snižuje i možnost přenosu infekce. Mohli bychom tedy říci, že v případě infekce mikrosporidii nezáleží na pokročilém věku napadeného jedince.

Dalším překvapivým zjištěním bylo, že se mikrosporidie vyskytovaly s vyšší prevalencí u starých lidí, kteří nevyužívají služeb geriatrických zařízení a žijí ve své domácnosti. Prevalence byla 18 %, zatímco ve vzorcích stolice klientů domovů důchodců byla poloviční. Rozdíly však nebyly statisticky významné ($p < 0,05$). Dle jiných studií bychom očekávali opačný výsledek. Často se uvádí, že výskyt parazitů je

častější v kolektivech, či komunitách (Volf et Horák 2007). Toto tvrzení však nemůžeme použít v případě mikrosporidie. Bylo dokázáno, že infekce má zoonotický charakter a člověk se tudíž může nakazit i od zvířete (např. od prasete, skotu či ptáků) (Thellier et Breton 2008). To by mohlo být důvodem většího výskytu mikrosporidií u lidí, kteří žijí doma a eventuálně chovají nějaké zvíře. Na základě našich výsledků bychom mohli říci, že úroveň geriatrických zařízení je velmi dobrá. Při nejmenším se zde dbá na přísnou hygienu. Lidé zde mají zajištěnou kvalitní pitnou vodu a nezávadné potraviny.

V literatuře se uvádí, že onemocnění mikrosporidie se projevuje nekrvavými vodnatými průjmy (Didier et al. 2005). Výzkum zaměřený na transplantované pacienty prokázal, že mikrosporidie pro ně představují poměrně velké riziko a ve většině případů pacienti trpěli přetrvávajícími průjmy (Lantiernier et al. 2009). Zdravotní stav osob v našem výzkumu nám nebyl znám. Můžeme se tedy pouze domnívat, proč vyšší prevalence výskytu mikrosporidií byla v průjmovité stolici a to 33 %. Je možné, že průjem u vyšetřovaných lidí byl způsoben právě probíhající infekcí mikrosporidie nebo že se na něm mikrosporidie podílely. Tuto hypotézu je třeba ověřit na větším souboru vyšetření. Ve většině případů však probíhá infekce bezpříznakově a tudíž nepředstavuje vážné zdravotní riziko pro imunokompetentní osoby.

Na základě našich výsledků můžeme potvrdit, že se mikrosporidie vyskytují i u imunokompetentních jedinců, kterým nezpůsobují žádné zdravotní potíže. Nezáleží na věku infikovaného jedince a ani na jeho sociálním stavu. Výskyt mikrosporidií u starých lidí určitě není zanedbatelný, ale bude nutné provést rozsáhlejší výzkum, zaměřit se i na možné zdroje infekce a na tomto základě provést určitá opatření a prevenci.

6 Závěry

- I. Vyšetření stolice starých lidí pomocí barvení calcofluorem ukázalo celkovou prevalenci výskytu mikrosporidií 8,5 %. Po vyšetření stolice vysoce citlivou metodou PCR byla prevalence vyšší a to 11 %. Molekulární metoda je mnohem spolehlivější a citlivější: s jejím zlevňováním bude možno v budoucnosti orientační vyšetření calcofluorem již neprovádět.
- II. Nalezené mikrosporidie byly identifikovány jako druhy: *Enterocytozoon bienusi* a *Encephalitozoon cuniculi*. *E. bienusi* byl nalezen ve 3 případech, z toho dva genotypy EbpA a jeden CZ5. *E. cuniculi* se vyskytnul ve 2 vzorcích stolice. V obou případech se jednalo o genotyp I.
- III. U klientů geriatrického zařízení byla zjištěna prevalence 8,3 %. U lidí nevyužívajících tyto služby a žijících ve vlastní domácnosti byla prevalence 18 %.
- IV. Nejčastěji se mikrosporidie nacházely ve vzorcích průjmovité stolice 33 % a není vyloučeno, že se na průjmu podílejí nebo jej přímo způsobují.
- V. Dle věkových kategorií se nejvíce pozitivních vzorků nacházelo v nejnižší věkové skupině 47 – 60 let. Celková prevalence byla 33 %. O něco nižší prevalence byla ve skupině 61 – 70 let a to 25 %. Mikrosporidie se vyskytovaly i u lidí starších 80-ti let a to v 5 %.
- VI. Získané výsledky potvrzují hypotézy o kosmopolitním výskytu mikrosporidií nezávislém na věku a životní úrovni infikovaných jedinců a poukazují na asymptomatický průběh infekce u imunokompetentních hostitelů. Výskyt mikrosporidií u různých skupin pacientů a jejich roli jako původců závažných oportunních infekcí je třeba ještě intenzivně studovat.

7 Literatura

1. ABDOLRASOULI, A. - McMILLAN, A. - ACKERS, JP. (2009): Sexual transmission of intestinal parasites in men who have sex with men. *Sex Health* 6: 185-194
2. ARDIÇ, N. (2009): An overview of *Strongyloides stercoralis* and its infections. *Mikrobiyol Bul* 43: 169-177
3. ASHRAF, HZ. - AHANGAR, AG. - DAR, FA. - LONE, RA. - WANI, ML. - ASHAI, MZ. - RATHER, SA. (2009): Popliteal artery embolism by *Ascaris lumbricoides*: a case report. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 15: 619-620
4. ATAMBAY, M. - BAYRAKTAR, MR. - KAYABAS, U. - YILMAZ, S. - BAYINDIR, Y. (2007): A rare diarrheic parasite in a liver transplant patient: *Isospora belli*. *Transplant Proc* 39: 1693-1695
5. BARSOUM, RS. (2006): Parasitic infections in transplant recipients. *Nat Clin Pract Nephrol* 2: 490-503
6. BASILE, A. - SIMZAR, S. - BENTOW, J. - ANTELO, F. - SHITABATA, P. - PENG, SK. - CRAFT, N. (2010): Disseminated *Strongyloides stercoralis*: Hyperinfection during medical immunosuppression. *J Am Acad Dermatol* Feb 19. (in press)
7. BAVA, AJ. - TRONCOSO, AR. (2009): *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a patient with AIDS. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic Ill)* 8: 235-238
8. BIALEK, R. - BINDER, N. - DIETZ, K. - KNOBLOCH, J. - ZELCK, UE. (2002): Comparison of autofluorescence and iodine staining for detection of *Isospora belli* in feces. *Am J Trop Med Hyg* 67: 304-305
9. BOURÉE, P. - LANCON, A. - BISARO, F. - BONNOT, G. (2007): Six human cyclosporiasis: with general review. *J Egypt Soc Parasitol* 37: 349-360
10. BOUZID, M. – STEVERDING, D. – TYLER, KM. (2008): Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Curr Opin Biotechnol* 19: 302-306

11. BUCHAROVÁ, E. (2009): Střevní paraziti u uživatelů drog. *Bakalářská práce*. Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
12. BURSTEIN ALVA, S. (2005): Cyclosporiasis: an emergent parasitosis. Clinical and epidemiological aspects. *Rev Gastroenterol Peru* 25: 328-335
13. BUSATTI, HG. – SANTOS, JF. - GOMES, MA. (2009): The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: where are we?. *Biologics* 3: 273-287
14. CARUSO, C. – BUFFA, S. – CANDORE, G. – COLONNA- ROMANO, G. – DUNN-WALTERS, D. – KIPLING, D. – PAWELEC, G. (2009): Mechanisms of immunosenescence. *Immun Ageing* 6: 10
15. Český statistický úřad: Vývoj obyvatelstva ČR v roce 2008 <[http://www.czso.cz/csu/2009edicniplan.nsf/t/B60039E9C8/\\$File/402009u.pdf](http://www.czso.cz/csu/2009edicniplan.nsf/t/B60039E9C8/$File/402009u.pdf)>
16. DAS, CJ. - KUMAR, J. - DEBNATH, J. - CHAUDHRY, A. (2007): Imaging of ascariasis. *Australas radiol* 51: 500-506
17. DAWSON, D. (2005): Foodborne protozoan parasites. *Int J Food Microbiol* 103: 207-227
18. DEROUIN, F. (2007): Parasitic infection in immunocompromised patients. *Rev Prat* 57: 167-173
19. DIDIER, ES. – STOVALL, ME. – GREEN, LC. – BRINDLEY, PJ. – SESTAK, K. – DIDIER, PJ. (2004): Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 126: 145-166
20. DIDIER, ES. – WEISS, LM. (2006): Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis* 19: 485-492
21. DIDIER, ES. – MADDRY, JA. – BRINDLEY, PJ. – STOVALL, ME. – DIDIER, PJ. (2005): Therapeutic strategies for human microsporidia infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3: 419-434
22. DITRICH, O. – KVAČ, M. – KVĚTOŇOVÁ, D. (2005): Kryptosporidióza: rizika pro imunokompetentní a imunodeficitní jedince. In Oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy. Praha: ČLS JEP, s. 21-26

23. DIXON, BR. - BUSSEY, JM. - PARRINGTON, LJ. - PARENTEAU, M. (2005): Detection of *Cyclospora cayentanensis* oocysts in human fecal specimens by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 43: 2375-2379
24. EL-BADRY, AA. (2009): ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. *J Egypt Soc Parasitol* 39: 757-768
25. ENDESHAW, T. – KEBEDE, A. – VERWEIJ, JJ. – ZEWEDE, A. – TSIGE, K. – ABRAHAM, Y. – WOLDAY, D. – WOLDEMICHAEL, T. – MESSELE, T. – POLDERMAN, AM. – PETROS, B. (2006): Intestinal microsporidiosis in diarrheal patients infected with human immunodeficiency virus-1 in Addis Ababa, Ethiopia *Jpn J Infect Dis* 59: 306-310
26. FARTHING, MJ. (2006): Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3: 436-445
27. FAYER, R. – SANTIN, M. – PALMER, M. (2003): Comparison of microscopy and PCR for detection of three species of *Encephalitozoon* in feces. *J Eukaryot Microbiol* 50: 572-573
28. FÖRSTL, M. et al. *Praktický atlas lékařské parazitologie*, Hradec Králové: Nucleus HK, 2003
29. FRANCESCHI, C. – BONAFE, M. (2003): Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans* 31: 457-461
30. FRENKEL, JK. - SILVA, MB. - SALDANHA, JC. - DE SILVA-VERGARA, ML. - CORREIA, D. - BARATA, CH. - SILVA, EL. - RAMIREZ, LE. - PRATA, A. (2003): Extraintestinal finding of *Isospora belli* unizoic cysts in a patient with AIDS: case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 409-412
31. GANNON, J. (1980): The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab. Anim.* 14: 189-192
32. GONZÁLEZ-SALAZAR, F. - MATA-CÁRDENAS, BD. - VARGAS-VILLAREAL, J. (2009): Sensibility of *Entamoeba histolytica* trophozoites to ivermectin. *Medicina (B Aires)* 69: 318-320

33. GRANIZO, JJ. - PÍA RODICIO, M. - MANSO, FJ. - GIMÉNEZ, MJ. (2009):
Tinidazole: a classical anaerobical drug with multiple potential uses nowadays.
Rev Esp Quimioter 22: 106-114
34. GROSS, U. (2003): Treatment of microsporidiosis including albendazole.
Parasitol Res 90: 14-18
35. HAUSMANN, K. – HÜLSMANN, N. *Protozoologie*, Praha: Academia, 2003
36. HUSSEIN, EM. - ABDUL-MANAEM, AH. - EL-ATTARY, SL. (2005):
Cyclospora cayetanensis oocysts in sputum of a patient with active pulmonary
tuberculosis, case report in Ismailia, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 35: 787-793
37. CHAKO, CZ. - TYLER, JW. - SCHULTZ, LG. - CHIGUMA, L. -
BEERNTSEN, BT. (2009): Cryptosporidiosis in People: It's Not Just About the
Cows. *J Vet Intern Med.* 24: 37-43
38. JÍRA, J. *Lékařská helmintologie*, Praha: Galén, 1998. 526s. ISBN 80-85824-82-
5
39. JÍRA, J. *Lékařská protozoologie Protozoální nemoci*, 1. vydání. Praha: Galén,
2009. 567s. ISBN 978-80-7262-381-5
40. JOSEPH, J. – VEMUGANTI, GK. – SHARMA, S. (2005): Microsporidia:
emerging ocular pathogens. *Indian J Med Microbiol* 23: 80-91
41. KEELING, PJ. – FAST, NM. (2002): Microsporidia: biology and evolution of
highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56: 93-116
42. KIM, J. - SHIN, MH. - SONG, KJ. - PARK, SJ. (2009): Evaluation of alpha-
tubulin as an antigenic and molecular probe to detect *Giardia lamblia*. *Korean J*
Parasitol 47: 287-291
43. KIMURA, K. - RAI, SK. - RAI, G. - INSISIENGMAY, S. - KAWABATA,
M. - KARANIS, P. - UGA, S. (2005): Study on *Cyclospora cayetanensis*
associated with diarrheal disease in Nepal and Loa PDR. *Southeast Asian J Trop*
Med Public Health 36: 1371-1376
44. KORU, O. - ARAZ, RE. - YILMAZ, YA. – ERGÜVEN, S. - YENICESU, M.
– PEKTAŞ, B. - TANYÜKSEL, M. (2007): Case report: *Isospora belli*
infection in a renal transplant recipient. *Turkiye Parazitol Derg* 31: 98-100

45. KREJSEK, J. – KUDLOVÁ, M. – KOLÁČKOVÁ, M. (2005): Imunitní systém a stárnutí. *Čes Ger Rev* 3: 36-41
46. KUMAR, R. – BURNS, EA. (2008): Age-related decline in immunity: implications for vaccine responsiveness. *Expert Rev Vaccines* 7: 467-479
47. LANTIERNIER, F. – BOUTBOUL, D. – MENOTTI, J. – CHANDESRI, MO. – SARFATI, C. – MAMZER BRUNEEL, MF. – CALNUS, Y. – MECHAI, F. – VIARD, JP. – LECUIT, M. – BOUGNOUX, ME. – LORTHOLARY, O. (2009): Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two *Enterocytozoon bienusi* cases and review. *Transpl Infect Dis* 11: 83-88
48. LELES, D. - ARAÚJO, A. - VICENTE, AC. - IÑIGUEZ, AM. (2009): Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in Brazil. *Vet Parasitol* 163: 167-170
49. LORES, B. – LÓPEZ-MIRAGAYA, I. – ARIAS, C. – FENOY, S. – TORRES, J. – del AGUILA, C. (2002): Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. *Clin Infect Dis* 34: 918-921
50. MANGIAVILLANO, B. - CARRARA, S. - PETRONE, MC. - ARCIDIACONO, PG. - TESTONI, PA. (2009): *Ascaris lumbricoides*-induced acute pancreatitis: diagnosis during EUS for a suspected small pancreatic tumor. *JOP* 10: 570-572
51. MATHIS, A. – WEBER, R. – DEPLAZES, P. (2005): Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 18: 423-445
52. MATOS, O. – SAK, B. – LOBO, ML. – KUČEROVÁ, Z. – XIAO, L. – KVÁČ, M. – ANTUNES, F. – KVĚTOŇOVÁ, D. – SECOR, WE. (2009): Epidemiology of *Enterocytozoon bienusi* infection in humans. *J Euk Microbiol*, (in press)
53. MUN, S. - CHO, SH. - KIM, TS. - OH, BT. - YOON, J. (2009): Inactivation of *Ascaris* eggs in soil by microwave treatment compared to UV and ozone treatment. *Chemosphere* 77: 285-290

54. NAVALON, S. - ALVARO, M. - GARCIA, H. - ESCRIG, D. - COSTA, V. (2009): Photocatalytic water disinfection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* using a fibrous ceramic TiO₂ photocatalyst. *Water Sci Technol* 59: 639-645
55. NKININ, SW. – ASONGANYI, T. – DIDIER, ES. – KANESHIRO, ES. (2007): Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J Clin Microbiol* 45: 2841-2846
56. ORTEGA, YR. - SANCHEZ, R. (2010): Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev* 23: 218-234
57. PAWELEC, G. (2005): When T cells get old. *Sci Aging Knowledge Environ* 50: 39
58. PELIKÁNOVÁ, M. (2009): Mikrosporidiové infekce lidí. *Bakalářská práce*. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
59. PETERSEN, E. (2007): Protozoan and helminth infections in pregnancy. Short-term and long-term implications of transmission of infection from mother to foetus. *Parasitology* 134: 1855-1862
60. PUSZKAILER, L. (2009): Giardiasis as a rare disorder in differential diagnosis of abdominal pain. *Rozhl Chir* 88: 200-202
61. RAMOS-CASALS, M. – GARCÍA-CARRASCO, M. – BRITO, MP. – LÓPEZ-SOTO, A. – FONT, J. (2003): Autoimmunity and geriatrics: clinical significance of autoimmune manifestations in the elderly. *Lupus* 12: 341-355
62. RODRIGUEZ-HERNANDEZ, MJ. - RUIZ-PEREZ-PIPAON, M. - CAÑAS, E. - BERNAL, C. - GAVILAN, F. (2009): *Strongyloides stercoralis* hyperinfection transmitted by liver allograft in a transplant recipient. *Am J Transplant* 9: 2637-2640
63. ROSATO, E. – SALSANO, F. (2008): Immunity, autoimmunity and autoimmune diseases in older people. *J Biol Regul Homeost Agents* 22: 217-224
64. ROSSIGNOL, JF. (2010): *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. *Exp Parasitol* 124: 45-53

65. RYŠAVÝ, B. A KOL. *Základy parazitologie*, Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989
66. SANCAK, B. – AKYÖN, Y. (2005): Microsporidia: general characteristics, infections and laboratory diagnosis. *Mikrobiyol Bul* 39: 513-522
67. SANSONI, P. – VESCOVINI, R. – FAGNONI, F. – BIASINI, C. – ZUNNI, F. – TELERA, A. – LUCCHINI, G. – PASSERI, G. – MONTI, D. – FRANCESCHI, C. – PASSERI, M. (2008): The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol* 43: 61-65
68. SANTI-ROCCA, J. - RIGOTHIER, MC. - GUILLÉN, N. (2009): Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. *Clin Microbiol Rev* 22: 65-75
69. SENCHINA, DS. – KOHUT, ML. (2007): Immunological outcomes of exercise in older adults. *Clin Interv Aging* 2: 3-16
70. SHALABY, HA. - ABDEL-SHAFY, S. - DERBALA, AA. (2010): The role of dogs in transmission of *Ascaris lumbricoides* for humans. *Parasitol Res* 106: 1021-1026
71. SHIN, GA. - LINDEN, KG. - FAUBERT, G. (2009): Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by polychromatic UV. *Lett Appl Microbiol* 48: 790-792
72. SINGH, A. - HOUP, E. - PETRI, WA. (2009): Rapid Diagnosis of Intestinal Parasitic Protozoa, with a Focus on *Entamoeba histolytica*. *Interdiscip Perspect Infect Dis* (Epub 2009 Jun 25)
73. SMOLIANINOV, AB. – TSYGAN, VN. – KOZLOV, KL. (2004): Immunomodulators and cytokines in the treatment of internal diseases, associated with immunologic status disturbance in elderly patients. *Adv Gerontol* 14: 79-91
74. SPAUSTA, G. – CIARKOWSKA, J. – WICZKOWSKI, A. – ADAMEK, B. (2005): Opportunistic protozoa - the problem in immunodeficient patients. *Pol Merkur Lekarski* 18: 339-341
75. SPINELLI, R. – BRANDONISIO, O. – SERIO, G. – TREROTOLI, P. – GHEZZANI, F. – CARITO, V. – PJCI, N. – DOCI, A. – PICAQU, F. –

- DENTICO, P. (2006): Intestinal parasites in healthy subjects in Albania. *Eur J Epidemiol* 21: 161-166
76. TAYLOR, R. - AZIZ, H. (2009): *Strongyloides stercoralis*: a case study. *MLO Med Lab Obs* 41: 24-26
77. THELLIER, M. - BRETON, J. (2008): *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15: 349-358
78. UYAR, Y. - TAYLAN OZKAN, A. (2009): Antigen detection methods in diagnosis of amebiasis, giardiasis and cryptosporidiosis. *Turkiye Parazitol Derg* 33: 140-150
79. VÁVRA, J. – BEDNÁŘ, M. – FRAŇKOVÁ, V. – SCHINDLER, J., et al. *Lékařská mikrobiologie*, Praha: Marvin, 1996. 558s.
80. VOLF, P. – HORÁK, P. *Paraziti a jejich biologie*. 1. vydání. Praha: Triton, 2007. 318s. ISBN 978-80-7387-008-9
81. WALTHER, Z. - TOPAZIAN, MD. (2009): *Isospora* cholangiopathy: case study with histologic characterization and molecular confirmation. *Hum Pathol* 40: 1342-1346
82. WANG, LC. - HWANG, KP. - CHEN, ER. (2010): *Enterobius vermicularis* infection in schoolchildren: a large-scale survey 6 years after a population-based control. *Epidemiol Infect* 138: 28-36
83. WILLIAMS, BA. (2009): Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cell Microbiol* 11: 1551-1560
84. WU, S. (2009): Sonographic findings of *Ascaris lumbricoides* in the gastrointestinal and biliary tracts. *Ultrasound Q* 25: 207-209
85. YODER, JS. – BEACH, MJ. (2010): *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Exp Parasitol* 124: 31-39
86. YOUNG, C. - TATARYN, I. - KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, KT. - BALACHANDRA, B. (2010): *Enterobius vermicularis* infection of the fallopian tube in an infertile female. *Pathol Res Pract* (in press)

87. ZAHARIOU, A. - KARAMOUTI, M. - PAPAIOANNOU, P. (2007):
Enterobius vermicularis in the male urinary tract: a case report. *J Med Case Reports* 1:137
88. Zdravotní ústav se sídlem v Praze: *Střevní parazitózy v České republice*,
<http://www.zuprava.cz/pracoviste/parazitologie/doc/Strevni%20parazitozy%20v%20CR.pdf>
89. Zdravotní ústav se sídlem v Praze: *Nálezy střevních parazitů na území ČR v roce 2008*,
<http://www.zuprava.cz/aktuality/2009/doc/HELM08.pdf> ,
<http://www.zuprava.cz/aktuality/2009/doc/PROTO08.pdf>

8 Klíčová slova

Oportunní paraziti

Imunitní systém

Stárnutí

9 Přílohy