

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA**

Výskyt mikrosporidií u různých skupin pacientů (u dětí)

Bakalářská práce

Autor: Renáta Smetanová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc

5. května 2011

Annotation:**Occurrence of microsporidia found in various groups of patients (children)**

The objective of this study was to identify the occurrence of microsporidia in children. The children may be endangered by microsporidia due to immune system deficiency. The stool specimens were collected from children hospitalized with various diagnoses in the hospital České Budějovice. These samples were collected from children of both sexes aged 0 – 15 years.

Diagnostic methods included fluorescence and light microscopy and a molecular technique (PCR). Concentration sedimentation method was used to diagnose eggs, larvae and oocysts of any other parasites in the stool. Calcofluor, a special fluorescent stain, was used to diagnose microsporidia spores. Molecular techniques (PCR) were used for diagnostics of of microsporidia species found in the stool samples.

None of the stool samples of the children was positive.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci na téma „Výskyt mikrosporidií u různých skupin pacientů (u dětí)“ 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.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat mému školiteli panu Doc. RNDr. Olegu Ditrichovi CSc. za odborné vedení, za trpělivost a čas, který mi věnoval. Také bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře oportunních parazitů BC AVČR, PaÚ za pomoc při výzkumu, jejich trpělivost a ochotu. Dále děkuji primářce MUDr. Nadě Malátové a celému kolektivu Laboratoře parazitologie a mykologie. Děkuji primáři MUDr. Václavu Chmelíkovi a celému kolektivu.

Obsah

| | |
|---|----|
| Úvod | 7 |
| 1 Současný stav | 8 |
| 1.1 Mikrosporidie..... | 8 |
| 1.2 Životní cyklus | 9 |
| 1.3 Stavba a struktura mikrosporidií..... | 10 |
| 1.4 Klinické projevy | 11 |
| 1.5 Zdroj a přenos mikrosporidiových infekcí..... | 12 |
| 1.6 Imunitní odpověď | 13 |
| 1.7 Diagnostika mikrosporidií | 13 |
| 1.7.1 Transmisní elektronová mikroskopie..... | 14 |
| 1.7.2 Fluorescenční a světelná mikroskopie | 14 |
| 1.7.3 Histologická technika | 14 |
| 1.7.4 Molekulární technika | 15 |
| 1.8 Léčba..... | 15 |
| 1.9 Druhy mikrosporidií infikující člověka | 16 |
| 1.9.1 <i>Enterocytozoon bienewisi</i> | 16 |
| 1.9.2 <i>Encephalitozoon intestinalis</i> | 17 |
| 1.9.3 <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 18 |
| 1.9.4 <i>Encephalitozoon hellem</i> | 19 |
| 1.9.5 Další druhy lidských mikrosporidií | 20 |
| 2 Cíl práce a hypotézy | 21 |
| 2.1 Cíl práce..... | 21 |
| 2.2 Hypotézy | 21 |
| 3 Metodika | 22 |
| 3.1 Charakteristika sledované skupiny | 22 |
| 3.2 Odběr vzorků | 23 |
| 3.3 Metody | 24 |
| 3.3.1 Mikroskopické vyšetření..... | 24 |
| 3.3.1.1 Koncentrační (sedimentační) metoda | 24 |

| | | | |
|---|---------|--|----|
| | 3.3.1.2 | Barvení calcofluorem..... | 25 |
| | 3.3.2 | Molekulární metodika..... | 26 |
| | 3.3.3 | Analýza genu SSU rRNA | 26 |
| | 3.3.3.1 | Extrakce DNA ze vzorků stolice | 27 |
| | 3.3.3.2 | Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 28 |
| | 3.3.3.3 | Gelová elektroforéza..... | 32 |
| 4 | | Výsledky | 33 |
| | 4.1 | Koncentrační (sedimentační) metoda | 33 |
| | 4.2 | Barvení calcofluorem..... | 33 |
| | 4.3 | Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 33 |
| 5 | | Diskuze | 34 |
| 6 | | Závěry | 36 |
| 7 | | Literatura..... | 37 |
| 8 | | Klíčová slova | 45 |
| 9 | | Přílohy..... | 46 |

Úvod

Oportunními parazity nazýváme ty parazity, kteří vyvolávají onemocnění u imunodeficitních pacientů. S těmito mikroorganismy si dokáže imunitní systém zdravého jedince (člověka) poradit (Spausta et al. 2005). Oportunní paraziti ohrožují nejvíce imunokompromitované pacienty, k nimž také patří pacienti s imunosupresí po transplantaci (Canning et Holister 1987). Do nejohroženější skupiny patří pacienti s onemocněním AIDS. Mezi nejčastější oportunní infekce patří pneumocystóza, toxoplasmóza, kryptosporidióza a také mikrosporidiózy. Oportunními infekcemi se může člověk také nakazit při špatném tepelném zpracování potravin. Vztah člověka a parazita hraje významnou úlohu při některých parazitárních onemocněních (Ambrosie-Thomas 2000).

Mezi nejčastější predispozice oportunních nákaz patří imunodeficience v důsledku AIDS, genetická predispozice a jiná onemocnění, která se týkají parazita (konkrétních genotypů s modifikovanou parazitární specifičností). U pacientů s těmito onemocněními častěji mohou vznikat parazitózy, jako je kryptosporidióza, mikrosporidióza (Ambrosie-Thomas 2000).

Tato práce je zaměřena na dětské pacienty. Zda se u nich vyskytují mikrosporidiové infekce, když nemají dostatečně vyvinutý imunitní systém.

1 Současný stav

1.1 Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární paraziti, taxonomicky patří do kmene Mikrosporidia, mezi houby (Keeling et al. 2000). První mikrosporidie byla zjištěna u housenky bource morušového v roce 1857 (Didier et al. 1998). Infikují široké spektrum jak obratlovců, tak i bezobratlých živočichů (Thellier et Breton 2008). U těchto eukaryotních obligátních parazitů byly popsány nákazy u mnoha živočišných skupin, jako jsou například savci, ryby, či hmyz (Weiss et Vossbrinck 1998). Mikrosporidie byly také nalezeny u hospodářských a domácích zvířat po celém světě (např. u koček, psů, koní, skotu a prasat) a tento nález měl velký význam ve veterinární medicíně (Santín et Fayer 2010).

U různých živočichů bylo popsáno více než 1200 druhů mikrosporidií, ale odhaduje se, že jich je mnohem více (Williams 2009). Více než 1000 druhů bylo zařazeno do více než 100 rodů a nejméně 13 druhů bylo zjištěno, že mají možnost infikovat savce (Didier et al. 1998).

Lidské mikrosporidie se objevily po nástupu pandemie AIDS (Thellier et Breton 2008). Druhů, které infikují savce je poměrně málo. Infekce se často objevují v trávicím traktu nebo v močových cestách (Didier et al. 1998). V současné době je již známo 14 druhů mikrosporidií infikujících člověka. *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon intestinalis* jsou nejčastější příčinou lidských infekcí mikrosporidiiemi a způsobují průjemy a systémová onemocnění (Anane et al. 2010). V dnešní době jsou tedy mikrosporidie považovány za oportunní lidské patogeny (Polonais et al. 2010). Mikrosporidie, které infikují člověka, se vyskytují ve vodních zdrojích, v jídle a u hospodářských zvířat (Anane et al. 2010).

Zájem o mikrosporidie roste, protože tyto organismy jsou uznány jako původci oportunních infekcí u osob s AIDS a příjemců transplantovaných orgánů (Didier et al. 2000). Mikrosporidie jsou všudypřítomní paraziti. Jejich přítomnost v prostředí znamená, že lidé jsou často vystaveni infekci (Lono et al. 2010). Některé rody (např.

Enterocytozoon a Pleistophora) se zdají být omezeny na různé tkáně, ale jiní mohou infikovat rozmanité orgány (Ambrosie- Thomas 2000).

1.2 Životní cyklus

Životní cyklus mikrosporidií je velmi prostý. Přenos infekce probíhá buď přímou cestou, což znamená přenos z jednoho hostitele na druhého. Existují druhy mikdosporidií, které během svého životního cyklu vystřídají dva druhy hostitelů. Rozeznáváme dva způsoby přenosu: horizontální a vertikální (Weber et al. 1994). Mikrosporidiové infekce vnikají většinou do těla savců přijmutím potravy obsahující spory, příkladem je špatně tepelně zpracované maso, anebo inhalací spor. Mikrosporidiové infekce způsobené druhy *Enterocytozoon bienersi* a *Encephalitozoon intestinalis* se vyskytují ve střevě. Inhalace spor se předpokládá v případě nálezu mikrosporidiálních spor ve sputu nebo v bronchoalveolární tekutině, či bronchoalveolárním epitelu infikovaných jedinců (Orenstein 1991). Mikrosporidie se vyvíjejí ve třech fázích. První fáze se nazývá proliferativní (merogonie), druhou fází je vytvoření spor (sporogonie) a třetí fází je přenos spor (Vávra et Larson 1999).

První fází je tedy merogonie. V této fázi je mikrosporidie velmi malá. Rozmnožuje se buď binárním dělením nebo merogenní: rozpadem na dceřiné buňky, které ovšem mohou dále pokračovat v rozmnožovacím cyklu. Buňky mikrosporidií jsou nepohyblivé a tak rozmnožování probíhá ve stále stejné buňce. V proliferativní fázi jsou buňky mikrosporidie obklopeny jednoduchou plazmatickou membránou, přes kterou komunikují s cytoplazmou hostitelské buňky. Mikrosporidie nemají mitochondrie. Golgiho aparát je velice jednoduchý a mají ribosomy, které jsou podobné ribosomům prokaryotních organismů. V merogoniální fázi se mikrosporidie chová spíše jako symbiont než jako parazit. Hostitelská buňka není během této fáze nijak poškozená (Volf et Horák 2007).

Když buňky mikrosporidie vyplní hostitelskou buňku, nastává fáze sporogonní. Buňky mikrosporidií začínají vytvářet na svém povrchu stěnu, avšak rozmnožování stále probíhá. Nakonec se však jednotlivé buňky parazita obklopené stěnou začnou osamostatňovat. Z každé buňky parazita poté vzniká spora, připravená k infekci další

buňky v hostiteli. Teprve když nastane stádium spory je hostitelská buňka poškozena (Volf et Horák 2007).

Spory, když se aktivuje, tak ze sebe vymrští pólovou trubici a bobtnací orgány vytlačí obsah spory ven. Vytlačeným obsahem je sporoplasma. Vystřelení a následný přenos je velmi rychlý v celkovém trvání dvou sekund. Po vymrštění začne pólová trubice pronikat tkáněmi. Zárodek mikrosporidie je vpraven do hostitelské buňky. K vystřelení dochází s největší pravděpodobností po zvýšení osmotického tlaku uvnitř spory (Volf et Horák 2007).

U některých druhů mikrosporidií jsou spory vytvářeny ve dvou generacích. Spory první generace šíří infekci uvnitř hostitele. Tato generace mikrosporidií má tenčí buněčnou stěnu, z neporušené hostitelské buňky napadají buňky v bezprostředním okolí. Naopak spory druhé generace mají buněčnou stěnu silnější. Obsah spory se po prasknutí hostitelské buňky dostane do vnějšího prostředí (Vávra et Larson 1999).

Mikrosporidie z rodu *Encephalitozoon* se vyvíjejí v parazitoformních vakuolách, které jsou odděleny od cytoplazmy hostitelské buňky membránou. Mikrosporidie druhu *Enterocytozoon bieneusi* se vyvíjejí přímo v cytoplazmě hostitelské buňky (Scanlon et al. 2000).

U druhu *Encephalitozoon* infikované buňky obsahují jednu nebo i více vakuol. Tyto vakuoly mají velice organizovanou strukturu. Jednotlivá stádia vývoje jsou uspořádána blízko membrány vakuoly, naopak zralé spory jsou umístěny centrálně. Při dozrávání a množení tohoto druhu mikrosporidií se paraziformní vakuola zvětšuje až takovým způsobem, že zaujímá většinu hostitelské plazmy. Jádro, orgány a cytoskelet hostitelské buňky jsou tlačeny až na okraj buňky. Infekce může trvat do té doby, dokud membrána hostitelské buňky i paraziformní vakuola neprasknou (Scanlon et al. 2000).

1.3 Stavba a struktura mikrosporidií

Spory je infekční stádium mikrosporidií. Spora je poslední stádium vývoje mikrosporidie. Spora infikuje hostitele. Běžná velikost spory je 1-5 μm (Cali. A 1991). Tvar spory je oválný, kulovitý či hruškovitý. Na povrchu každé mikrosporidiové spory je stěna. Stěna se skládá ze tří vrstev: proteinová exospora, chitinová endospora,

plazmatická membrána. Pomocí této stěny je spora schopná přežít delší dobu ve volném prostředí. Spora může mít jedno jádro, mluvíme tedy o monokaryonu nebo může mít jádra dvě, mluvíme tedy o diplokaryonu. Jádro je obtáčeno pólovou trubicí. Další nedílnou součástí je tedy pólová trubice, která vede celým tělem spory (Weidner 1972).

Zárodek mikrosporidie je miniaturní buňka aplikovaná přímo do cytoplazmy buňky hostitele. Poté začne mikrosporidie procházet jednotlivými fázemi vývoje, což je merogonní fáze a sporogonní fáze. Vystřelovací aparát je také nedílnou součástí spory. Tento vystřelovací aparát se skládá z již zmíněné pólové trubice dále pak z polaroplastu a zadní vakuoly. Pólová trubice může mít až 500 μm , ale bývá většinou kratší. Pólová trubice je ukotvena kotvícím diskem ve stěně spory, který je hříbovitého tvaru. Odtud pak trubice sestupuje do poloviny délky spory a poté se spirálovitě stáčí do závitů až ke konci těla spory. Třetina spory je vyplněna nahlučenými membránami cisteren nazývanými se polaroplast, utváří jakýsi sloupec, který se nachází kolem rovné části pólové trubice. Tato část je zdrojem plazmatické membrány, která obsahuje sporoplazmu. Zadní vakuola nacházející se v zadní části těla spory, funguje jako bobtnací organela (Volf et Horák 2007).

Spory se aktivují pomocí decompartmentalizace sporoplasmy, vzrůstu osmotického tlaku, extruze polární trubice, vlivu různých stimulů, výměny protonů-kationtů, úlohy Ca^{++} a karbohydrátů (Volf et Horák 2007).

1.4 Klinické projevy

U lidí a dalších skupin živočichů jsou mikrosporidie původcem mikrosporidiózy, jak u imunokompetentních jedinců, tak u pacientů s oslabenou imunitou.

Mikrosporidie jsou infekční patogeny způsobující střevní, oční, dutinné, plicní, svalové onemocnění včetně onemocnění ledvin, jak u imunokompetentních tak i u imunosuprimovaných pacientů. Nedávno se zjistilo, že výskyt očních mikrosporidióz stoupá hlavně u imunokompetentních jedinců (Joseph et al. 2005). U pacientů s AIDS se pohybuje výskyt mikrosporidióz v rozmezí 2- 50%. Nejčastěji způsobují onemocnění u

lidí rod *Enterocytozoon* a *Encephalitozoon* (Kotler et Orenstein 1998, Didier et al 2005).

Klinické projevy vycházející hlavně ze vztahu hostitel, parazit. Rozhodujícími faktory jsou rozmanitá škála onemocnění, která jsou závislá na imunitním systému hostitele, na způsobu infekce a na druhu mikrosporidie. Na základě těchto faktorů byly pozorovány tyto vztahy hostitele s parazitem:

- asymptomatická nebo chronická infekce s mírnými příznaky
- akutní onemocnění novorozenců, infekce přenesena transplacentárně a rozvinuta následkem nezralosti imunitního systému
- infekce u imunodeficitních nebo imunosuprimovaných pacientů - pacienti mají poškozenou buněčnou imunitu
- symptomatické onemocnění vyskytuje se výjimečně i u imunokompetentních pacientů s plně funkčním imunitním systémem (Kocurková 2005).

1.5 Zdroj a přenos mikrosporidiových infekcí

Přenos mikrosporidií má dva způsoby vertikální a horizontální. Vertikální přenos znamená přenos infekce z matky na plod. Tento způsob byl zjištěn u králíků a hlodavců. Horizontální přenos znamená šíření infekce trávicím traktem nebo dýchací soustavou (Snowden et al 1998).

Šíření a přenos mikrosporidií je prostřednictvím spor. Někdy je možný přenos i ve vegetativním stádiu přes zárodečné buňky. Přenos mikrosporidie v infikovaném hostiteli doposud nebyl znám. Mikrosporidie se nemohou pohybovat. Nedávno se však zjistilo, že některé mikrosporidie během dvou až tří dnů po infekci hostitele vytvářejí zvláštní generace spor (Volf et Horák 2007).

První generace spor je zodpovědná za šíření infekce uvnitř hostitele. V první generaci jsou spory s tenkou stěnou, které samovolně vymršťují vystřelovací aparát, aby mohly infikovat okolní tkáň (Volf et Horák 2007).

Druhá generace spor už je produkována z těla hostitele ven. Tato generace je obsažena v tělních exkretech nebo se může uvolnit do okolního prostředí po smrti hostitele (Volf et Horák 2007).

Mezi infekční zdroje patří voda, jídlo a hmyz. Ve vodě spory dlouhodobě přežívají jak ve vodě odpadní, tak povrchové i podzemní. Infekční dávka pro člověka je velmi malá (Franzen et Müller 1999). Bylo prokázáno, že k infekcím nejčastěji dochází kontaktem s infikovaným zvířetem nebo požitím kontaminované vody (Cotte et al 1999; Fournier et al 2000).

Přenos infekce potravou se začal rozmáhat díky změnám konzumace a přípravy jídla. Výskyt je nejčastější u turistů, kteří konzumují zahraniční speciality. Infekce je velmi často z infikovaného masa. Stal se případ, že pacient s HIV dlouhodobě požíval nedostatečně tepelně upravené hovězí maso a onemocněl střevní mikrosporidíózou (Hutin et al 1998).

Ve Španělsku byla provedena analýza 124 vzorků trusu holubů. Byl nalezen druh *E. bienersi* (prevalence 9,7%), *E. intestinalis* (4%) a *E. hellem* (0,8%). Ohrožení jsou tedy návštěvníci parků (Haro et al. 2005).

1.6 Imunitní odpověď

Obrana hostitele proti mikrosporidiové infekci spočívá ve spolupráci nescifické a specifické imunity. Příkladem je parazit *Encephalitozoon cuniculi*. Buněčná imunita je vnímavější obrana proti parazitům než humorální imunita (Didier et al. 1998).

Důležitou roli hrají NK buňky, které působí na časnou fázi infekce, produkují interferony γ a tím se aktivují makrofágy. Před vznikem latentního onemocnění mikrosporidíóz, chrání organismus T-buněčná imunitní odpověď (Tesařová 2003).

Makrofágy hrají důležitou roli v organismu hostitele, slouží k šíření infekce a jsou také součástí imunitní odpovědi proti parazitovi *E. cuniculi*. Mikrosporidie využívají makrofágy k diseminaci (Didier 1995).

1.7 Diagnostika mikrosporidií

Diagnostikovat můžeme přímo původce. Můžeme použít přímý průkaz, do kterého patří elektronová mikroskopie, histologická technika, molekulární technika. Nebo můžeme použít nepřímý průkaz, kam patří serologické vyšetření.

Mikrosporidiovou sporu lze identifikovat z biologického materiálu jako je stolice, sliny, hleny, moč, střevní tekutina, žluč, tkáňová biopsie nebo mozkomíšní mok. Jelikož jsou spory parazitů velice malé, je jejich diagnostika velice obtížná.

Mezi nejdůležitější molekulární techniky patří PCR metoda. Dále se používá transmisní elektronová mikroskopie a za pomoci barvicích metod je také vhodná světelná mikroskopie (Papáčková 2008).

Na tkáňových kulturách lze některé mikrosporidie parazitující u lidí kultivovat. Patří sem například *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* (Weiss et Vossbrink 1998).

1.7.1 Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie je vysoce specifická k detekci mikrosporidií. Avšak tento způsob diagnostiky má nízkou citlivost zejména u vzorků stolice a tělních tekutin (Carter et al. 1996).

Diagnostickým znakem u mikrosporidií je stočená pólová trubice, na které je vidět její ojedinělá ultrastruktura. Ve stolici se nevyskytují vývojová stádia mikrosporidií, jsou vidět pouze spory, na rozdíl od tkání, kde jsou vidět jednotlivá stádia životního cyklu mikrosporidie. (Mc William et Curry 1990).

1.7.2 Fluorescenční a světelná mikroskopie

Patří mezi rutinně používanou techniku vyšetřování vzorků, ale za pomoci této techniky neurčíme rod ani druh vyšetřovaného parazita. Za pomoci této techniky vidíme mikrosporidiovou sporu jako oválný útvar (Friedberg et Rittrband 1999).

Diagnostika pomocí fluorescenční mikroskopie je velice snadná a rychlá. Při této diagnostické technice se používá chemofluorescenční barvení jako je calcofluor. Váže se na chitin, který je obsažen ve sporovém obalu mikrosporidií (Weber et al. 1994).

1.7.3 Histologická technika

Spory mikrosporidií jsou velice malé, je důležitý kontrast spor od okolní tkáně (Mc William et Curry 1990).

Tkáně jsou barveny Gramovým typem barvení. Tento typ barvení je vhodný pro barvení vzorků tkání zalitých v parafínu (Kotler et al. 1994).

Používá se též fluorescenční barvicí technika, která je velice rychlá a snadná. Tento způsob barvení je velmi citlivý (Conteas et al. 1996). K diagnostice intestinálních mikrosporidií se používá barvení Giemsa, ale u tohoto barvení je zapotřebí, aby byla čerstvá tkáň. (Schwarz et al. 1994).

1.7.4. Molekulární technika

Tato technika se používá k detekci a druhovému určení mikrosporidií ve vzorcích, dále pak také k fylogenetickým studiím (Franzen et Müller 1999). K detekci a k určení druhů, které infikují člověka, se používá polymerázová řetězová reakce (PCR). Tato reakce je založena na odlišnosti genů ribozomální RNA (Katinka et al. 2002).

K diagnostice mikrosporidióz s určením jednotlivých druhů se používá PCR metoda. Při metodě PCR dochází k amplifikaci DNA (Müller et al 1999). Po PCR přichází další diagnostická část a to je potvrzení nebo specifická identifikace produktů PCR. Tato metoda používá sekvenování DNA. K určení *E. bienersi* se používá analýza, který se skládá z přenesení molekul z gelu na membránu a výsledek poté máme z elektroforézy (Vossbrink et al. 1993).

1.8 Léčba

Léčba mikrosporidióz je prozatím v počátcích. Potvrdila se účinnost albendazolu na druhy rodu *Encephalitozoon* a to i u systémových infekcí (Gross 2003, Anane et al. 2010). Naopak u druhu *Enterocytozoon beineusi* není dosud žádná léčba účinná (Molina et al. 2002).

Dále se pak používá fumagilin, který je k vnitřnímu užití pro tělo toxický může se používat pouze k lokální léčbě infekce očí (Molina et al. 2002). Odborníci se pokoušejí syntetizovat netoxickou látku, která bude stejně účinná (Didier 2005). Fumagilin působí na více druhů mikrosporidií (Beauvais et al. 1994).

1.9 Druh mikrosporidií infikující člověka

1.9.1 *Enterocytozoon bieneusi*

Čeď *Enterocytozoonidae* má dva rody *Nucleospora* a *Enterocytozoon*. Do rodu *Nucleospora* patří druhy *N. salmonis* a *N. secunda*. Do rodu *Enterocytozoon* řadíme druh *E. bieneusi* (Shadduck et Orenstein 1993). *Enterocytozoon bieneusi* je jednobuněčný střevní patogen. Patří mezi nejčastější původce lidské mikrosporidie (Widmer et Akiyoshi 2010). Tato mikrosporidie je nejčastěji diagnostikována u lidí s onemocněním AIDS. *Enterocytozoon bieneusi* parazituje nejčastěji v epitelu duodena, jejunu, ale i ve žlučových cestách. Velikost spory tohoto parazita je přibližně 1 μm (Volf et Horák 2007). Výskyt spor byl identifikován i v lamina propria (Schwarz et al. 1995).

Tento druh se nevyskytuje pouze u lidí, ale také i u hospodářských zvířat, u opic, či šelem a u domácích mazlíčků jako jsou psi a kočky. *Enterocytozoon bieneusi* se vyvíjí v přímém kontaktu s cytoplazmou epitelálních buněk (Thellier et Breton 2008). *Enterocytozoon bieneusi* má závitý polární trubice na řezu ve dvou řadách (Kocurková 2005). Poprvé byl tento druh objeven u pacienta s HIV v roce 1985. Po propuknutí epidemie AIDS, výzkum tohoto druhu velice vzrostl (Ambrosie-Thomas 2000). Pomocí rozdílných sekvencí ITS (internal transcribed spacers) jednotlivých sekvencí rRNA bylo prokázáno 81 genotypů z toho 26 genotypů bylo zjištěno pouze u lidí, 8 z nich bylo identifikováno jak u člověka, tak u dalších hostitelů (Santín et Fayer 2009).

Na průběh onemocnění má vliv imunitní systém hostitele. Infekce se projevuje svými prvními příznaky po 2 až 3 týdnu po naze. Nejčastějším příznakem je chronický průjem, hlavně u pacientů imunodeficitních a také u pacientů po transplantacích orgánů. Průjem byl doprovázen zvracením, hubnutím, zimnicí, ztrátou chuti k jídlu. Pacientům po transplantaci, kteří měli imunosupresivní léčbu, mikrosporidie způsobovala kromě chronického průjmu zimnici, únavu a zvracení (Gumbo et al. 1999). U potravin obsahující laktózu a tuk byla zaznamenána intolerance u pacientů s mírnějším průběhem onemocnění. Naopak u pacientů s těžším průběhem

onemocnění byla zaznamenána intolerance téměř na všechny složky potravy. U těžších případů dochází k dehydrataci a hypokalémii (Kotler et Orenstein 1999).

Charakteristickým znakem střevní mikrosporidiózy je poškození epitelu tenkého střeva, který má za následek malabsorpci. Funkční nezralostí epitelových střevních klků a snížení povrchové mukózní plochy s největší pravděpodobností ovlivňuje absorpci. Mikrosporidiová infekce tedy způsobuje zmenšení povrchové mukózní plochy. Mechanismus správné absorpce je porušen v důsledku poškození velkého množství buněk. Konečným důsledkem je parciální atrofie klků (Kotler et Orenstein 1999).

Mikrosporidiózy způsobené tímto druhem se také objevují u dětí a u lidí, kteří cestují po světě a také u starých lidí (Didier et al. 2000).

Byl prováděn výzkum o výskytu *E. bienewisi* na jatkách, ze vzorků od prasat. 26% bylo pozitivních, provádělo se to pomocí PCR. Přítomnost infekce byla prokázána in situ hybridizací (Buckholt et al. 2002).

V České republice byla zjišťována sérová pozitivita pro *Enterocytozoon bienewisi*. Zjistilo se, že 20 % HIV pozitivních osob, 33 % osob v kontaktu se zvířaty a 10 % zdravých lidí byly pozitivní nepřímým imunofluorescenčním testem (Sak et al. 2010).

1.9.2 *Encephalitozoon intestinalis*

Poprvé byl tento druh identifikován u pacienta s AIDS a chronickým průjmem (Blanhard et al. 1992). Původně se *Encephalitozoon intestinalis* nazýval *Septata intestinalis*. Střevní mikrosporidiózy u pacientů s diagnózou syndrom získaného selhání imunity (AIDS) a chronickým průjmem byla poprvé popsána v roce 1985. Do popředí se dostává rozvíjející se výskyt mikrosporidiózy nejen u pacientů s AIDS ale také u příjemců transplantovaných orgánů (Anane et Attouchi 2010). Tato mikrosporidie také infikuje enterocyty, ale její patologie a morfologie se liší od *E. bienewisi*. K vývoji *E. intestinalis* dochází v tenkém střevě. Dále tyto spory infikují makrofágy, buňky lamina propria, fibroblasty a endotelové buňky (Kotler et Orenstein 1999). *E. intestinalis* způsobuje též infekce očí (Didier et al. 1998). Spory *E. intestinalis* jsou jednojaderné a jejich vývoj také probíhá ve vakuole hostitelské buňky. Extraintestinální formy tohoto

druhu parazita mohou způsobit infekce dýchacího traktu, ledvin nebo žlučových cest (Volf et Horák 2007). Pólová trubici je složena ze čtyř až sedmi závitů (Weber et al. 1994). *E. intestinalis* má závitů polární trubice v jedné řadě (Kocurková 2005).

Je v pořadí druhým nejčastějším původcem mikrosporidiových infekcí. Kromě pacientů s AIDS se také objevuje u pacientů s jinak oslabenou imunitou a také u příjemců transplantovaných orgánů, a u imunokompetentních osob s infekcí rohovky nebo průjmem (Mathis et al. 2005). Tato mikrosporidie byla zjištěna prakticky ve všech orgánech, a může vyvolat příznaky u konkrétních orgánů. Diagnóza je histologická, a to buď z tkáňové biopsie nebo sekretu (Kotler et Orenstein 1999). U tohoto druhu se prováděla studie u selat, výskyt byl zjištěn u mladší skupiny selat s průjmem, a to zejména u těch ve věku méně než 1 týden a mezi 1 a 2 týdnem. (Jeong et al. 2007). Dále byl objeven u goril v Ugandě a u dvou lidí, kteří přišli s gorilami do styku. (Graczyk et al. 2002).

V roce 2005 byl proveden výzkum o výskytu *E. intestinalis* ve státě Pahang v Malajsii. Vzorky stolice od 151 domorodých vesničanů byly vyšetřeny na přítomnost spor. Výsledkem bylo, že u 23 vzorku tedy 21,2% bylo pozitivní na mikrosporidie. Metodou PCR se potvrdilo, že se jedná o *E. intestinalis* (Lono et al. 2010).

Dosud nebyly pozorovány žádné rozdíly v ITS sekvencích různých izolátů (Didier et al. 1996). Izoláty *E. intestinalis* u tří HIV-pozitivních pacientů byly geneticky homogenní (Liguory et al. 2000). Cesta přenosu může být také inhalací spor (Didier et al. 1998).

Do hlavní skupiny pacientů, u kterých se vyskytuje střevní mikrosporidióza patří pacienti s oslabenou imunitou, zejména těch nakažený virem HIV. Na tento problém byla prováděna studie se 14 pacienty (10muži a 4 ženami) Výsledkem byla diagnostika střevní mikrosporidiózy o celkové prevalenci 2,4%. U pacientů HIV infikovaných byl výskyt 3,6% a u pacientů bez infekce HIV byl výskyt 1,4% (Anane et al. 2010)

1.9.3 *Encephalitozoon cuniculi*

Byl poprvé rozpoznán v roce 1959. *Encephalitozoon cuniculi* se vyskytuje u pacientů s onemocněním ledvin, s neurologickými onemocněními a také u pacientů,

kteří prodělali tropickou nemoc. *E. cuniculi* infikuje široké spektrum savců, včetně hlodavců, králíků, koní, šelem a člověka. Hlavním hostitelem pro *E. cuniculi* je králík (Künzel et Joachim 2010). Rozeznáváme tři genotypy *E. cuniculi*. I. genotyp byl nalezen u králíků a lidí, II. genotyp byl nalezen u myší a polárních lišek a III. genotyp byl nalezen u lidí a psů. Byl prokázán přenos ze zvířete na člověka ale nikoliv mezi pacienty (Didier et al. 1995). Způsobuje záněty jater, slinivky břišní, peritonea a dutin hlavně nejčastěji rhinosinutidy. Tyto typy zánětů se objevily u pacientů infikovaných virem HIV (Franzen et al. 1996). Tento druh má výrazný zoonotický potenciál (Mathis et al 2005).

Byl vyšetřen trus náhodně sebraný od různých druhů volně žijících ptáků pomocí M2R barvení a polymerázové řetězové reakce. Žádný z těchto vzorků nebyl pozitivní. Dále bylo identifikováno několik genotypů této mikrosporidie z ptáků chovaných v zajetí. Z toho pět popsanych genotypů bylo prokázáno v lidských vzorcích (Kasičková et al 2007).

U ptáků byl dosud popsán výskyt u genotypů jedna a tři (Kasičková et al. 2007). *E. cuniculi* byl popsán také u psů a králíků (Didier et al. 1996).

Britští autoři vyšetřili 26 vzorků stolic od lidí, 350 od zvířat a došlo k nalezení 18 vzorků s obsahem parazita. Genová charakteristika vyústila ve 14 různých genotypů a z toho 6 ještě vůbec nepopsaných (Dengjel et al. 2001).

Mikrosporidie získané od pacienta s AIDS žijícího v Itálii byly izolovány a kultivovány. Byla provedena identifikace imunologickou a molekulární metodou. Totéž se provedlo také ve Švýcarsku. A tyto získané výsledky poskytují další informace o geografickém rozložení dalších typů *E. cuniculi* (Rossi et al. 1998). O něco později byla tato studie opět provedena v Itálii, ale na ženě. U této ženy byl výskyt mikrosporidiálních výtrusů v ledvinách, v játrech, srdci, slezině, plicích (Tosoni et al. 2002).

1.9.4 *Encephalitozoon hellem*

Třetí nejčastější mikrosporidie způsobující infekce u lidí. *Encephalitozoon hellem* postihuje převážně imunokompromitované osoby a pacienty s onemocněním

AIDS. Spory u pacienta s AIDS se vyskytují v moči, ve výtěrech, slinách (Weber et al. 1993). Bylo zjištěno, že *E. hellem* způsobuje hlavně oční infekce jako je infekce rohovky a spojivek. Projevuje se také infekcí horních a dolních cest dýchacích (Schwartz et al. 1993). Neinfikují pouze člověka, ale i jiné primární hostitele jako jsou ptáci, nejčastěji papoušci a kolibříci. Tato mikrosporidie způsobuje hlavně u zvířecích hostitelů ledvinové a střevní infekce (Snowden et al. 2000).

Sporová trubice je stočena do šesti až osmi závitů. Struktura je stejná jako u druhu *E. cuniculi*, rozdíl je však v biochemické a imunologické struktuře (Didier et al 1991).

1.9.5 Další druhy mikrosporidií

Dalšími druhy, které byly popsány u člověka, jsou *Vittaforma corneae*, *Microsporidium africanum*, a *Brachiola algerae*.

2 Cíle práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem této práce je zpracovat literární rešerši o tématu. Vyšetřit reprezentativní vzorky stolic u dětí na mikrosporidie. Nalezené izoláty mikrosporidií genotypizovat a podle zjištěného druhu či genotypu usuzovat na zdroj infekce. Výskyt mikrosporidií dát do souvislostí s věkem, diagnózou a dalšími vlivy.

2.2 Hypotézy

H₁: Výskyt mikrosporidií u malých dětí je podobný výskytu mikrosporidií u dospělých.

H₂: U malých dětí je v důsledku nezralého imunitního systému výskyt mikrosporidií vyšší a ty se podílejí i na průjmových onemocněních.

3 Metodika

3.1 Charakteristika sledované skupiny

Sledovanou skupinou byly děti do 15- ti let. Vzorky stolice nám poskytlo celkem 67 dětí. Z toho 63 vzorků bylo poskytnuto z parazitologické laboratoře Nemocnice České Budějovice. Čtyři vzorky nám poskytlo infekční oddělení Nemocnice České Budějovice.

Informace o jednotlivých dětech byly věk dítěte (Tab. 1), pohlaví (Tab. 2) a diagnóza (Tab. 3).

Tab. 1: **Věkové složení sledované skupiny**

| Věk | Počet | % |
|--------|-------|----|
| 0- 3 | 11 | 16 |
| 4- 6 | 15 | 23 |
| 7- 11 | 24 | 36 |
| 12- 15 | 17 | 25 |

Zdroj: Vlastní výzkum

Tab. 2: **Sledovaná skupina podle pohlaví**

| | Muži | Ženy |
|-------|------|------|
| počet | 38 | 29 |
| % | 57 | 43 |

Zdroj: Vlastní výzkum

Tab. 3: **Sledovaná skupina podle diagnózy**

| Diagnóza | Počet | Diagnóza | Počet |
|----------|-------|----------|-------|
| A 08 | 1 | K 519 | 1 |
| A 09 | 5 | L 130 | 1 |
| A 099 | 1 | L 208 | 1 |
| B 80 | 3 | R 10 | 5 |

| | | | |
|-------|---|-------|----|
| D 899 | 3 | R 103 | 1 |
| F 480 | 3 | R 104 | 35 |
| J 028 | 1 | R 509 | 5 |
| K 219 | 1 | | |

Zdroj: Vlastní výzkum

Diagnózy

| | |
|-------|---|
| A 08 | Střevní infekce viry a jinými určenými mikroorganismy |
| A 09 | Jiná gastroenteritida a kolitida infekčního a nespecifického původu |
| A 099 | Gastroenteritida a kolitida nespecifického původu |
| B 80 | Enterobióza- enterobiosis |
| D 899 | Porucha týkající se mechanismů imunity, NS |
| F 480 | Neurastenie |
| J 028 | Akutní zánět hltanu způsobený jinými určenými organismy |
| K 219 | Gastroezofageální refluxní onemocnění bez ezofagitidy |
| K 519 | Ulcerózní kolitida, NS |
| L 130 | Dermatitis herpetiformis |
| L 208 | Jiná atopická dermatitida |
| R 10 | Břišní a pánevní bolest |
| R 103 | Bolest umístěná do jiných míst dolní části břicha |
| R 104 | Jiná a neurčená břišní bolest |
| R 509 | Horečka, NS |

(MKN-10 Mezinárodní statistika klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů)

3.2 Odběr vzorků

Vzorky stolice použité pro tuto práci byly odebrány do uzavíratelných nesterilních odběrových nádobek. Vzorky stolice byly od dětí, které byly hospitalizované v nemocnici v Českých Budějovicích na dětském oddělení a infekčním oddělení. Rozmezí mezi odběrem a samotným vyšetřením vzorků stolic byl maximálně 7 dní.

Vzorky, které nebyly vyšetřeny v den odběru, byly skladovány v lednici při teplotě 5°C.

3.3 *Metody*

K diagnostice vzorků stolic dětí bylo použito několika vyšetřovacích metod. Jako základní vyšetřovací metodu jsem použila mikroskopické vyšetření. Dále pak byla použita molekulární metodika (polymerázová řetězová reakce PCR).

3.3.1 *Mikroskopické vyšetření*

3.3.1.1 *Koncentrační (sedimentační) metoda*

Tato metodika se používá k diagnostice parazitů ve stolici. Paraziti, kteří se vyskytují ve zkoumaném vzorku, jsou v klidovém stádiu. Parazit je v klidovém stádiu, což je vajíčko, larva či oocyst.

Roztoky:

1) MIF roztok

složení: 500 ml H₂O, 50 ml 40% formaldehydu, 400 ml 0,1% roztoku mertiolátu sodného

2) Lugolův roztok

složení: 1 g krystalického jódu, 2 g KJ, 100 ml H₂O

Pracovní postup:

1. Vzorek stolice velikosti hrášku byl homogenizován ve zkumavce spolu s 5 ml MIF a 1 ml Lugolova roztoku.
2. Homogenizovaná směs byla přefiltrována přes gázový filtr.
3. Do filtrátu bylo přidáno 6 ml éteru.
4. Zašpuntovaná zkumavka byla protřepána a vložena do centrifugy na dobu 2 minut při 1500ot/ min.
5. Po centrifugaci se vytvořil ve zkumavce prstenec, tento prstenec byl odstraněn špejlí a zkumavka byla slita.
6. Vzniklý sediment se prohlížel ve světelném mikroskopu.

Preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem OLYMPUS BX 51 při zvětšení 40x.

3.3.1.2 Barvení calcofluorem (Vávra et al. 1933)

Tato metodika se používá k diagnostice mikrosporidií.

Roztoky:

1) 0,5% Evansova modř

složení: 0,5 g Evans. modří ve 100 ml PBS

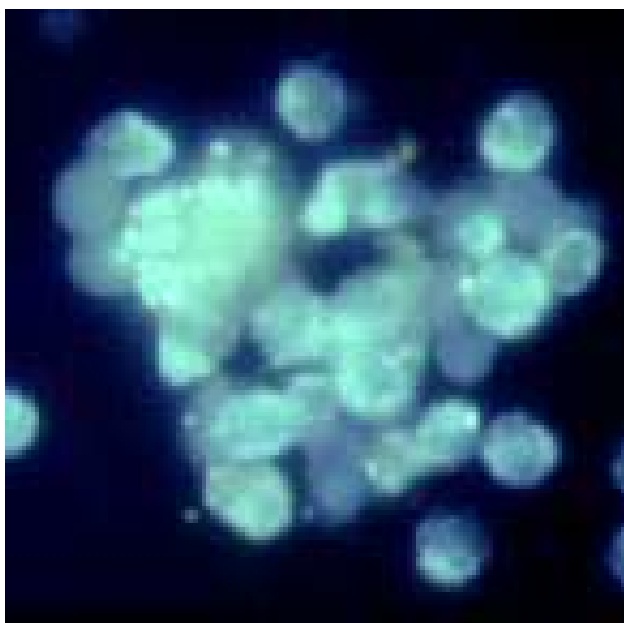
2) 0,1% Calcofluor

složení: 0,1 g calcofluoro ve 100 ml PBS

Pracovní postup:

1. Vzorky stolice byly rozetřeny na podložní sklíčka.
 2. Sklíčka byla zafixována methanolem a necháno 2 minuty zaschnout.
 3. Bylo provedeno barvení 1% Calcofluorem White M2R v PBS (fosfátový pufr, pH 7,2- 7,4). po dobu 10 minut.
 4. Opláchnutí sklíček v PBS.
 5. Dobarvení sklíček 0,5% Evansovou modří ve vodě po dobu 30 sekund.
- Opětovné opláchnutí v PBS a nechat uschnout.

Tímto způsobem obarvené vzorky stolice byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem OLYMPUS IX 70 při zvětšení 1000x a při vlnové délce 490 nm za použití olejové imerze. Obarvené spory mikrosporidií mají oválný tvar. Při prohlížení mikroskopem svítí jasně modrobíle.



Obr. 1: Buněčná kultura *Encephalitozoon cuniculi* obarvená calcofluorem. Zářící drobné útvary jsou spory této mikrosporidie.

Zdroj: Doc. RNDr. Oleg Ditrich CSc.

3.3.2 Molekulární metodika

3.3.3 Analýza genu *SSU rRNA*

Molekulární metoda byla používána u 12 vzorků stolic, u kterých bylo mikroskopické vyšetření za použití barvení nejasné Tab. 4.

Tab. 4 : Vybrané vzorky pro molekulární metodiku

| Číslo | Věk | Pohlaví | Diagnóza |
|-------|-----|---------|----------|
| 1 | 5 | M | R 104 |
| 2 | 4 | M | D 899 |
| 3 | 4 | M | R 104 |
| 4 | 4 | M | L 130 |
| 5 | 4 | M | R 104 |
| 6 | 2 | M | R 509 |

| | | | |
|----|---|---|-------|
| 7 | 2 | M | R 509 |
| 8 | 2 | M | R 104 |
| 9 | 2 | M | R 104 |
| 10 | 2 | M | R 104 |
| 11 | 3 | M | R 104 |
| 12 | 1 | M | R 509 |

Zdroj: Vlastní výzkum

3.3.3.1 *Extrakce DNA ze vzorků stolice*

Extrakce byla prováděna PSP Spin Stool DNA Kit (Invitex).

Postup:

1. 200 mg stolice bylo dáno do Safe- Lock- Tube poté byly přidány skleněné kuličky a 1 ml Lysis Buffer P. Poté se začaly rozbíjet potencionální spory ve FastPrep- 24 po dobu 60 s při rychlosti 5,5 m/s.
2. Pak byla provedena inkubace v termobloku 10 min. při 95°C a následně centrifugace po dobu 1 min. při 14.000 otáčkách.
3. Vzniklý supernatant byl přenesen do InviAdsorb- Tube pak byl vortexován 15s a následně inkubován při laboratorní teplotě 1 min. Následovala centrifugace po dobu 3 min. při 14.000 otáčkách.
4. Supernatant byl přepipetován do čistých ependorfech a pak centrifugován po dobu 3 min. při 14.000 otáčkách.
5. Do nových ependorfech bylo nepipetováno 25 µl proteinasy K a k němu bylo přidáno 400 µl supernatantu vše bylo zvortexováno.
6. V termobloku byla provedena opět inkubace po dobu 10 min. při teplotě 70°C. Dále bylo připipetováno 400 µl Binding Buffer P a následovalo vortexování.
7. Veškerý objem byl přepipetován do Spin Filter+ Tube (kolona s ependorfkou). Inkubace 1 min při laboratorní teplotě a centrifugace po dobu 1 min při 14.000 otáčkách.
8. Z ependorfy byl vylit odpad, pak se připipetovalo 500 µl Wash I a centrifugovalo 1 min při 14.000 otáčkách.

9. Supernatant byl vylit z ependorfky a následně se připipetovalo 800 µl Wash II a byla provedena centrifugace 1 min. při 14.000 otáčkách
10. Supernatant byl vylit a následně byla provedena centrifugace po dobu 3 min při 14.000 otáčkách.
11. Na kolonu byla nasazena čistá ependorfka pak se připipetovalo 200 µl Elution Buffer D (tento roztok byl předeřán) na kolonu. Pak byla provedena inkubace 3 min. při laboratorní teplotě a pak se centrifugovalo po dobu 1 min. při 8.500 otáčkách.
12. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20°C.

3.3.3.2 *Polymerázová řetězová reakce PCR*

PCR je molekulární diagnostika sloužící k určení jednotlivých druhů mikrosporidií. Byly prováděny vždy dvě sady PCR s různými sety primerů. Jednou se prokazovalo *Enterocytozoon bieneusi* a druhou *Encephalitozoon*. Nezbytnou součástí každé PCR sady je pozitivní a negativní kontrola. PCR probíhá ve dvou fázích primární a sekundární. Dále se pracovalo s termocykléry , kde se nastavily amplifikační programy.

Tab.5 Primery pro *Enterocytozoon bieneusi*

| Primery | Sekvence |
|----------------|----------------------------|
| Primární PCR | |
| EBITS3 | GGT CAT AGG GAT GAA GAG |
| EBITS4 | TTC GAG TTC TTT CGC GCT C |
| Sekundární PCR | |
| EBITS1 | GCT CTG AAT ATC TAT GGC T |
| EBITS2,4 | ATC GCC GAC GGA TCC AAG TG |

Zdroj: Vlastní výzkum

Tab.6: **Primery pro *Encephalitozoon***

| Primery | Sekvence |
|----------------|-------------------------------------|
| Primární PCR | |
| int580F | TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT |
| Int580R | TTT CAC TCG VVG CTA CTC AG |
| Sekundární PCR | |
| MSP-3 | GGA ATT CAC ACC GCC CGT CVY TAT |
| MSP-4A | CCA AGC TTA TGC TTA AGT YMA ARG GGT |

Zdroj: Vlastní výzkum

Tab.7: **Reakční směsi pro PCR**

Enterocytozoon bieneusi

| Primární | | 57°C/ 15 | |
|-------------------|-------------|------------------|------------|
| Roztoky | Koncentrace | Objem v 1 vzorku | Master mix |
| H ₂ O | | 12,30 | 184,50 |
| MgCl ₂ | (25mM) | 1,20 | 18,00 |
| 10Xbuffer | | 2,00 | 30,00 |
| dNTP | 10mM | 0,40 | 6,00 |
| EBITS3 | 10μM | 0,40 | 6,00 |
| EBITS4 | 10μM | 0,40 | 6,00 |
| BSA | (10mg/ml) | 0,80 | 12,00 |
| taq | (1U / 1μl) | 0,50 | 7,50 |
| DNA | | 3,00 | 30,00 |
| sum | | 20,00 | 300,00 |

Zdroj: Vlastní výzkum

| Sekundární | | 55°C/ 16 | |
|-------------------|-------------|------------------|------------|
| Roztoky | Koncentrace | Objem v 1 vzorku | Master mix |
| H ₂ O | | 13,10 | 209,60 |
| MgCl ₂ | (25mM) | 1,20 | 19,20 |
| 10Xbuffer | | 2,00 | 32,00 |
| dNTP | 10mM | 0,40 | 6,40 |
| EBITS1 | 10μM | 0,40 | 6,40 |
| EBITS2,4 | 10μM | 0,40 | 6,40 |
| BSA | (10mg/ml) | | |
| taq | (1U / 1μl) | 0,50 | 8,00 |
| DNA | | 2,00 | 32,00 |
| sum | | 20,00 | 320,00 |

Zdroj: Vlastní výzkum

Primární fáze PCR u druhu *Enterocytozoon bieneusi* se prováděla v termocykléru Little Genius (BIOER), trvala 2 hodiny. Sekundární fáze probíhala v termocykléru MJ Mini personal thermal cycler (BIO-RAD) a trvala 2 hodiny. Amplifikační program termocykléru Little Genius (BIOER) se skládal z několika kroků:

- 1) Počáteční denaturace DNA při 94°C v trvání 3 minuty.
- 2) Denaturace při 94°C v délce trvání 45 sekund.
- 3) Nasedání primerů při 57°C c době 45 sekund.
- 4) Syntéza nového řetězce při 72°C po dobu 1 minuty.

Proběhlo celkem 35 cyklů od 2 - 4.

- 5) Dosyntetizování řetězce při 72°C po dobu 7 minut.

Nasedání primerů v primární fázi probíhalo při 57°C a nasedání primerů v sekundární fázi probíhá při 55°C.

Tab.8: Reakční směsi pro PCR

Encephalitozoon

| Primární | | | 55°C/ 15 |
|-------------------|-------------|------------------|------------|
| Roztoky | Koncentrace | Objem v 1 vzorku | Master mix |
| H ₂ O | | 12,30 | 184,50 |
| MgCl ₂ | (25mM) | 1,20 | 18,00 |
| 10Xbuffer | | 2,00 | 30,00 |
| dNTP | 10mM | 0,40 | 6,00 |
| int580F | 10μM | 0,40 | 6,00 |
| int580R | 10μM | 0,40 | 6,00 |
| BSA | (10mg/ml) | 0,80 | 12,00 |
| taq | (1U / 1μl) | 0,50 | 7,50 |
| DNA | | 3,00 | 30,00 |
| sum | | 20,00 | 300,00 |

Zdroj: Vlastní výzkum

| Sekundární | | | 55°C/ 26 |
|-------------------|-------------|------------------|------------|
| Roztoky | Koncentrace | Objem v 1 vzorku | Master mix |
| H ₂ O | | 13,10 | 209,60 |
| MgCl ₂ | (25mM) | 1,20 | 19,20 |
| 10Xbuffer | | 2,00 | 32,00 |
| dNTP | 10mM | 0,40 | 6,40 |
| MSP3 | 10μM | 0,40 | 6,40 |
| MSP4A | 10μM | 0,40 | 6,40 |
| BSA | (10mg/ml) | | |
| taq | (1U / 1μl) | 0,50 | 8,00 |
| DNA | | 2,00 | 32,00 |
| sum | | 20,00 | 320,00 |

Zdroj: Vlastní výzkum

Primární a sekundární fáze PCR rodu *Encephalitozoon* se prováděla v termocykléru MJ Mini personal thermal cycler (BIO-RAD). Primární fáze v termocykléru trvala 2 hodina a taktéž i sekundární. Amplifikační program termocykléru MJ Mini personal thermal cycler (BIO-RAD) se skládal z několika kroků:

- 1) Počáteční denaturace DNA při 94°C v trvání 3 minut.
 - 2) Denaturace při 94°C v délce trvání 45 sekund.
 - 3) Nasedání primerů při 55°C po dobu 45 sekund.
 - 4) Syntéza nového řetězce při 72°C po dobu 1 minuty.
- Proběhlo celkem 35 cyklů od 2 - 4.
- 5) Dosyntetizování řetězce při 72°C po dobu 7 minut.

Nasedání primerů v primární i sekundární fázi probíhalo při 55°C.

3.3.3.3 *Gelová elektroforéza*

Za pomoci gelové elektroforézy byla ověřována délka DNA fragmentů. Při gelové elektroforéze dochází k rozdělení DNA fragmentů v agaróze podle různých molekulových hmotností, na které působí elektrické pole.

Roztoky:

- 1) 50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
- 2) Agaróza
- 3) Ethidium bromid
- 4) 100 bp DNA ladder

Gelová elektroforéza byla prováděna za použití 1% agarózového gelu v 1× TAE pufru s přídatkem ethidium bromidu (výsledná koncentrace v gelu byla 0,5 µg/ml) při napětí 70 V po dobu nezbytně nutnou pro separaci fragmentů DNA. Vizualizace rozdělené DNA na fragmenty byla v transiluminátoru při vlnové délce 302nm. Záznam, který vznikl, byl přenesen do počítače.

4 Výsledky

4.1. Koncentrační (sedimentační) metoda

V žádném ze zkoumaných 67 vzorků za použití koncentrační (sedimentační) metody (MIFC) nebyli nalezeni žádní paraziti.

4.2. Barvení calcofluorem

V žádném z 67 vzorků stolice barvené calcofluorem se nevyskytovaly mikrosporidie.

Za použití této metody se jevily všechny vzorky negativně. Citlivost této metody není vysoká, proto byla použita i spolehlivější metoda PCR.

4.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Po provedení PCR metody byly sledované vzorky také negativní jako u předchozích metod.

Mikroskopické vyšetření bylo ve shodě s molekulární metodou, která potvrdila negativní nález.

5 Diskuze

Cílem mé práce bylo, zda a v jaké míře se mikrosporidie vyskytují v našich podmínkách u dětí, a zda jejich výskyt může souviset s některými gastrointestinálními potížemi. Imunitní systém se během života vyvíjí a mění. Imunitní systém zdravého dospělého člověka si dokáže s parazitárním onemocněním poradit. Imunitní systém dětí není ještě dostatečně vyvinutý (Spausta et al. 2005). Děti by mohly tedy patřit do ohrožené skupiny. Většina informací o výskytu mikrosporidií u lidí pochází z vyšetření imunodeficitních pacientů nakažených virem HIV. Prevalence imunodeficitních pacientů, kteří onemocní mikrosporidiózou se pohybuje v širokém rozmezí 2 - 78 % (Matos et al. 2009).

V žádném z vyšetřovaných vzorků stolice, za použití koncentrační (sedimentační) metody, nebyla zjištěna přítomnost střevních parazitů. Při cíleném vyšetřování pomocí barvení calcofluorem nebyly nalezeny žádné spory mikrosporidií. Mikrosporidiová DNA nebyla nalezena ani při použití citlivé PCR diagnostické metody. Často se stává, že mikroskopicky negativní vzorky vyjdou molekulární metodou pozitivní, což potvrzuje vysokou citlivost a záchytnost molekulárních metod.

Výsledek mého výzkumu o výskytu mikrosporidií u dětí je v určitém souladu s výsledky, ke kterým dospěla Pelikánová ve své bakalářské práci o výskytu mikrosporidií 75 mužů a 83 žen různého věku, kteří byli parazitologicky vyšetřováni kvůli průjmům a dalším střevním potížím. Pomocí PCR zjistila nejvyšší výskyt mikrosporidií u lidí starších 50 let. A naopak nejnižší výskyt byl u dětí od 0 - 5 let. S klinickými projevy souvislost nenalezla (Pelikánová 2009). V kombinaci s mými výsledky to vede k domněnce, že prevalence subklinických mikrosporidiových infekcí se kumuluje s věkem.

Nasvědčují tomu i výsledky další podobné práce, která se zabývala výskytem oportunních parazitů u pacientů v geriatrických zařízeních, kdy bylo zjištěno 5 pozitivních vzorků. 3 x *Enterocytozoon bieneusi* a 2 x *Encephalitozoon cuniculi* (Černá 2010).

Výskytem oportunních parazitů u alkoholiků se zabývá ve své práci Křivánková. Pomocí PCR byla prokázána přítomnost mikrosporidií u jednoho vzorku, u kterého

nalezla *Encephalitozoon cuniculi*. (Křivánková 2011).

Na základě mého výzkumu jsem dospěla k závěru, že v mnou sledované skupině se nevyskytovalo žádné dítě, které by trpělo mikrosporidiózu a ani nebylo infikováno bez klinických příznaků. Jsem si vědoma relativně malého počtu vyšetřených (šlo však o maximum, které se podařilo za pomoci obou nemocničních oddělení v daném období shromáždit. Pro potvrzení mých výsledků by bylo dobré provést rozsáhlejší výzkum mikrosporidií u dětí.

6 Závěry

- I. Ve vyšetřovaném souboru vzorků nebyly mikrosporidie prokázány ani mikroskopickou a ani molekulární technikou
- II. Pravděpodobně platí hypotéza, že mikrosporidiové infekce bez příznaků onemocnění lidé postupně získávají během života.
- III. Hypotéza, o možném vyšším výskytu mikrosporidií u dětí s ohledem na nezralost jejich imunitního systému byla zamítnuta.

7 Literatura

1. AMBROISE-THOMAS, P.: Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. *Int J Parasitol* 30 (2000): 1361-7
2. ANANE, S. – ATTOUCHI, H.: Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol* 34 (2010): 450-64
3. ANANE, S. – ATTOUCHI, H. – KAOUECH, E. - BELHADJ, S.- BEN CHAABANE, T. - BEN ABDALLAH, N. - BEN OTHMAN, T. – SAMOUD, A. - BEN HRIZ, M. – KALLEL, K. – CHAKER, E.: Epidemiological and clinical characteristics of intestinal microsporidiosis. *Sante* 20 (2010): 21-9
4. BEAUVAIS, B. – SARFATIC, C. – CHALLIER, S.- DEROIN, F.: Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 10 (1994): 2440-8
5. BLANSHARD, C. – HOLLISTER, WS. – PEACOCK, CS. – TOVEY, DG. – ELLIS, DS. – CANNING, EU. – GAZZARD, BG.: Simultaneous infection with two types of intestinal microsporidia in a patient with AIDS. *Gut* 33 (1992): 418-20
6. BUCKHOLT, MA. – LEE, JH. – TZIPORI, S.: Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18- month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl Environ Microbiol* 68 (2002): 2595-9
7. CALI, A.: Microsporidian features and recent findings on Aids isolates. *J Protozool* 38 (1991): 625-630
8. CANNING, EU. – HOLLISTER, WS.: Microsporidia of mammals--widespread pathogens or opportunistic curiosities? *Parasitol Today* 3 (1987): 267-73.
9. CARTER, PL. - MACPHERSON, DW. - MCKENZIE, RA.: Modified technique to recover microsporidian spores in sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed fecal samples by light microscopy and correlation with transmission elektron microscopy. *J Clin Microbiol* 34 (1996): 2670-2673
10. CONTEAS, CN. – SOWERBY, T. – BERLIN, OGW. – DAHLAN, F. – NQUYEN, A. – PORSCHE, R. – DONOVAN, J. – LARIVIERE, M. –

- ORENSTEIN, JM.: Fluorescence techniques for diagnosing intestinal microsporidiosis in stool, enteric fluid and biopsy specimens from acquired immunodeficiency syndrome patients with chronic diarrhoea. *Display Settings* 9 (1996): 847- 53
11. COTTE, L. – RABODONIRINA, M. – CHAPUIS, F. – BAILLY, F. – BISSUEL, F. - RAYNAL, C. – GELAS, P. – PERSAT, F. – PIENS, MA. – TREPO, C.: Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 180 (1999): 2003-8.
 12. ČERNÁ, L.: Oportunní paraziti u pacientů geriatrických zařízení. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity. České Budějovice (2010)
 13. DENGJEL, B. – ZAHLER, M. – HERMANN, W. – HEINRITZI, K. – SPILLMANN, T – THOMSCHKE, A. – LÖSCHER, T. – GOTHE, R. – RINDER, H.: Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J Clin Microbiol* 39 (2001): 4495-9
 14. DIDIER, ES. – DIDIER, PJ. – FRIEDBERG, DN. – STENSON, SM. – ORENSTEIN, JM. - YEE, RW. – TIO, FO. – DAVIS, RM. – VOSSBRINCK, C. – MILLICHAMP, N. – SHADDUCK, JA.: Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J Infect Dis* 163 (1991): 617- 621
 15. DIDIER, ES. : Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (Phylum mikrospora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasit Immun* 17 (1995): 405-412
 16. DIDIER, ES. – VISVESTARA, GS. – BAKER, MD. – ROGERS, LB. – BERTUCCI, DC. - DE GROOTE, MA. – VOSSBRINCK, CR.: A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J Clin Microbiol* 34 (1996): 2835- 2837
 17. DIDIER, ES. - SNOWDEN, KF. - SHADDUCK, JA.: Department of Microbiology, Tulane Regional Primate Research Center, Covington, LA 70433,

- USA. *Adv Parasitol.* (1998): 40:283-320
18. DIDIER, ES. – SNOWDEN, KF. – SHADDUCK, JA.: Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv Parasitol* 40 (1998): 283-320
 19. DIDIER, ES. – DIDIER, PJ. – SNOWDEN, KF. – SHADDUCK, JA.: Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect* 2 (2000): 709-20
 20. DIDIER, ES.: Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94 (2005): 61-76
 21. FOURNIER, S. – LIGUORY, O. - SANTILLANA-HAYAT, M. – GUILLOT, E. – SARFATI, C. – DUMOUTIER, N. – MOLINA, J. – DEROUIN, F.: Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29 (2000): 95-100
 22. FRANZEN, C. – MÜLLER, A. – SALZBERGER, B. – FÄTKENHEUER, G. – DIEHL, V. – SCHRAPPE, M.: Chronic rhinosinusitis in patients with Aids: potential role of microsporidia. *AIDS* 10 (1996): 687-689
 23. FRANZEN, C. - MÜLLER, A.: Cryptosporidia and microsporidia--waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34 (1999): 245-62.
 24. FRIEDBERG, DN. - RITTERBAND, DC.: Ocular Microsporidiosis, in: Wittner M., Weiss, L.M., editors. : The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington DC. Am Soc Microbiol (1999):193-314
 25. GRACZYK, TK. - BOSCO-NIZEYI, J. - DA SILVA, AJ. – MOURA, IN. - PIENIAZEK, NJ. – CRANFIELD, MR. – LINDQUIST, HD.: A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitol Res* 88 (2002): 926-31.
 26. GROSS, U.: Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitol Res* 90 (2003): 14-8
 27. GUMBO, T. – HOBBS, RE. – CARLYN, C. – HALL, G. – ISADA, CM.: Microsporidia infection in transplant patients. *Transplantation* 67 (1999): 482-4
 28. HARO, M. – IZQUIERDO, F. - HENRIQUES-GIL, N. – ANDRÉS, I. - ALONSO, F. – FENOY, S. - DEL AGUILA, C.: First detection and genotyping

- of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl Environ Microbiol* 71 (2005): 3153-7
29. HUTIN, YJ. – SOMBARDIER, MN. – LIGUORY, O. – SARFATI, C. – DEROUIN, F. – MODAÏ, J. – MOLINA, JM.: Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J Infect Dis* 178 (1998): 904-7.
30. JEONG, DK. – WON, GY. – PARK, BK. – HUR, J. – YOU, JY. – KANG, SJ. – OH, IG. – LEE, YS. – STEIN, BD. – LEE, JH.: Occurrence and genotypic characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs with diarrhea. *Parasitol Res* 102 (2007): 123-8.
31. JOSEPH, J. – VEMUGANTI, GK. – SHARMA, S.: Microsporidia: emerging ocular pathogens. *Indian J Med Microbiol* 23 (2005): 80-91
32. KASIČKOVÁ, D. – SAK, B. – KVÁC, M. – DITRICH, O.: Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host--cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. *Parasitol Res* 101 (2007): 1685-8
33. KATINKA, MD. - DUPRAT, S. - CORNILLLOT, E. - METENIER, G. - THOMARAT, F. - PRENSIER, G, ET AL.: Genome sequence and gene compaction of the eukaryotic parasite *Enterocytozoon cuniculi*. *Nature* 414 (2002): 450-453
34. KEELING, PJ. – LUKER, MA. – PALMER, JD.: Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol* 17 (2000): 23-31
35. KOCURKOVÁ, A.: Stanovení protilátek ve střevní sliznici myší infikovaných *Encephalitozoon intestinalis*, jejich dynamika a případný podíl na slizniční imunitě. Magisterská práce. Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice (2005)
36. KOTLER, DP. – ORENSTEIN, JM.: Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv Parasitol* 40 (1998):3 21-49

37. KOTLER, DP. – ORENSTEIN, JM.: Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In T. Bittner (ed), *The Microsporidian and Microsporidiosis*. Washington, D. C. (1999) 258-292
38. KOTLER, DP. - GIANG, TT. - GARRO, ML. - ORENSTEIN, JM.: Light microscopic in patients with AIDS. *Am J Gastroenterol* 89 (1994):540-544
39. KÜNZEL, F. – JOACHIM, A.: Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol Res* 106 (2010): 299-309
40. Křivánková, G.: Oportunní paraziti u alkoholiků. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity. České Budějovice (2011)
41. LIGUORY, O. – FOURNIER, S. – SARFATI, C. – DEROUIN, F. – MOLINA, JM.: Genetic homology among thirteen *Encephalitozoon intestinalis* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. *J Clin Microbiol* 38 (2000): 2389-91
42. LONO, A. – KUMAR, GS. – CHYE, TT.: Prevalence of microsporidia in an indigenous Orang Asli community in Pahang, Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104 (2010): 214-8
43. MATHIS, A. – WEBER, R. – DEPLAZES, P.: Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 18 (2005): 423-45
44. MATOS, O. – SAK, B. – LOBO, ML. – KUČEROVÁ, Z. – XIAO, L. – KVÁČ, M. – ANTUNES, F. – KVĚTOŇOVÁ, D. – SECOR, WE.: Epidemiology of *Enterocytozoon bienusi* infection in humans. *J Euk Microbiol*, (in press) (2009)
45. Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přirozených zdravotnických problémů [online]. [ocitováno 2011-04-13]. <<http://www.uzis.cz/cz/mkn/index.html>>
46. MOLINA, JM. – TOURNEUR, M. – SARFATI, C. – CHEVRET, S. - DE GOUVELLO, A. – GOBERT, JG. – BALKAN, S – DEROUIN, F. - AGENCE NATIONALE DE RECHERCHES SUR LE SIDA 090 STUDY GROUP.: Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *N Engl J Med* 24 (2002): 1963-9

47. MCWILLIAM, LJ. - CURRY, A.: Intestinal microsporidiosis in AIDS. *J Clin Pathol* 43 (1990): 173-174
48. MÜLLER, A. - STELLERMANN, K. - HRTMANN, P. - SCHRAPPE, M. – FÄTKENHEUER, G. - SALZBERGER, B. DIEHL, V. – FRANZEN, C.: A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporida in clinic stool specimens. *Clin Diagn Lab Immunol* 6 (1999): 243-246
49. PAPÁČKOVÁ, Z.: Mikrosporidiové infekce prasat. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice (2008)
50. PELIKÁNOVÁ, M.: Mikrosporidiové infekce lidí. Bakalářská práce. Biologická fakulta Jihočeské univerzity. České Budějovice (2009)
51. POLONAI, V. – MAZET, M. – WAWRZYNIAK, I. – TEXIER, C. - BLOT N, EL. – ALAOUI, H. – DELBAC, F.: The human microsporidian *Encephalitozoon hellem* synthesizes two spore wall polymorphic proteins useful for epidemiological studies. *Infect Immun* 78 (2010): 2221-30
52. ROSSI P, LA. – ROSA, G. – LUDOVISI, A. – TAMBURRINI, A. - GOMEZ MORALES, MA. – POZIO, E.: Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *Int J Parasitol* 28 (1998): 1361-6
53. SAK, B. – KUCEROVA, Z. – KVAC, M. – KVETONOVA, D. – ROST, M. – SECOR, EW.: Seropositivity for *Enterocytozoon bieneusi*, Czech Republic. *Emerg Infect Dis* 16 (2010): 335-7
54. SANTÍN, M. – FAYER, R.: *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *J Eukaryot Microbiol* 56 (2009): 34-8
55. SANTÍN, M. – FAYER, R.: Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res Vet Sci* 9. (2010)
56. SCANLON, M. – SHAW, AP. – ZHOU, CHJ. – VISVESVARA, GS. – LEITCH, GJ.: Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle. *J Eukaryot Microbiol* 47 (2000): 525-531
57. SHADDUCK, JA. – ORENSTEIN, JM.: Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch Pathol Lab Med* 117 (1993): 1215-9

58. SCHWARTZ, DA. – VISVESVARA, GS. – DIESENHOUSE, MC. – WEBER, R. – FONT, RL. – WILSON, LA. – CORRENT, G. – SERDAREVIC, ON. – ROSBERGER, DF. – KEENEN, PC. - ET AL.: Pathologic features and immunofluorescent antibody demonstration of ocular microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) in seven patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 115 (1993): 285-92
59. SCHWARZ, DA. - BRYAN, RT. - WEBER, R. - VISVESVARA, GS.: Microsporidiosis in HIVpositive patients:current metods for diagnosis using biopsy, cytologic, ultrastructural, immunological, and tissue culture techniques. *Folia Parasitol* 41 (1994): 101-109
60. SNOWDEN, KF. – DIDIER, ES. – ORENSTEIN, JM. – SHADDUCK, JA.: Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci* 48 (1998): 589-92
61. SNOWDEN, KF. - LOGAN, K. - PHALEN, DN.: Isolation and characterization of an avian isolate of *Encephalitozoon hellem*. *Parasitology*. Jul;121 (Pt 1) (2000):9-14.
62. SPAUSTA, G. – CIARKOWSKA, J. – WICZKOWSKI, A. – ADAMEK, B.: Opportunistic protozoa - the problem in immunodeficient patiens. *Pol Merkur Lekarski* 18 (2005): 339-341
63. ORENSTEIN, JM.: Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Parasitol* 77 (1991): 843-864
64. TOSONI, A. – NEBULONI, M. – FERRI, A. – BONETTO, S. – ANTINORI, S. – SCAGLIA, M. – XIAO, L. – MOURA, H. – VISVESVARA, GS. – VAGO, L. – COSTANZI, G.: Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. *Mod Pathol* 15 (2002): 577-83
65. TESAŘOVÁ, J.: Microsporidiové infekce oka savců. Magisterská práce. Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice (2003)

66. THELLIER, M. - BRETON, J.: *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15 (2008): 349-358
67. VÁVRA, J. – LARSSON, JIR.: Structure of the microsporidia, p. 7-84, Wittner M., Weiss L. (eds.): The microsporidia and microsporidiosis. *Am Soc Microbiol* (1999) Washington DC, 553 pp.
68. VOLF, P. – HORÁK, P. *Paraziti a jejich biologie*. 1. vydání. Praha: Triton, 2007. 318s. ISBN 978-80-7387-008-9
69. VOSSBRICK, CR. - BAKER, MD. - DIDIER, ES. - DEBRUNNER-VOSSBRICK, BA. - WOESE, CR.: rDNA sequences of *Enterocytozoon hellem* and *Enterocytozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. *J Eukaryot Microbiol* 40 (1993):354-362.
70. WEBER, R. – KUSTER, H. – VISVESVARA, GS. – BRYAN, RT. – SCHWARTZ, DA. – LÜTHY, R.: Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: pulmonary colonization, microhematuria, and mild conjunctivitis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 17 (1993): 415-9
71. WEBER, R. – BRYAN, RT. – SCHWARZ, DA. – OWEN, RL.: Human microsporidial infection. *Clin Mikrob Rev* 7 (1994): 426-461
72. WEIDNER, E. : Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Z Parasitenk D* 40 (1972): 227-242.
73. WEISSL, VOSSBRINCK, CR: Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspekt. *Adv Parasit* 31 (1998): 195-198
74. WIDMER, G. – AKIYOSHI, DE.: Host-specific segregation of ribosomal nucleotide sequence diversity in the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi*. *Infect Genet Evol* 10 (2010):122-8
75. WILLIAMS, BA.: Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cell Microbiol* 11 (2009): 1551-1560

8 Klíčová slova

Diagnostické metody

Mikrosporidie

Infekce dětí

9 Přílohy