

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Katedra parazitologie



Magisterská diplomová práce

**Průběh mikrosporidiózy způsobené *Encephalitozoon cuniculi*
u imunokompetentních a imunodeficientních myší**

Michaela Kotková

Vedoucí práce: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

České Budějovice 2011

Kotková M, (2011): Průběh mikrosporidie způsobené *Encephalitozoon cuniculi* u imunokompetentních a imunodeficientních myší [The course of microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent and immunodeficient mice. Mgr. Thesis, in Czech] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The course of microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent BALB/c mice and immunodeficient SCID mice was screened using molecular methods. The site of infection in organs was located using molecular and histology methods. The effectiveness of albendazole treatment and possibility of infection relapse after immunosuppression (cyclosporine A, tacrolimus, mycophenolate mofetil) was also studied. Moreover, the course of excretion of microsporidial spores in feces was monitored during the whole time of experiment.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním svého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. 4. 2011

.....
Michaela Kotková

Poděkování

Na tomto místě bych především chtěla poděkovat školiteli RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, vskutku ohromnou trpělivost a cenné rady. Poděkování také patří doc. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., RNDr. Daně Květoňové a ostatním kolegům a kamarádům z laboratoře veterinární a humánní protistologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Alexandru Jegorovovi za poskytnutí imunosupresiv použitých při pokusu a za cenné rady.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům za podporu během celého studia.

Práce byla financována z interního grantu SGA PřF JU v Českých Budějovicích (SGA2010/005).

OBSAH

1. Úvod	1
1.1. Mikrosporidie	1
1.2. Taxonomie	1
1.3. Morfologie a životní cyklus	2
1.3.1. Parazitoformní vakuola	3
1.4. <i>Encephalitozoon</i> spp.	4
1.4.1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	5
1.5. Mikrosporidióza	7
1.5.1. Zdroje lidské nákazy	7
1.5.1.1. Člověk (vertikální a horizontální přenos)	7
1.5.1.2. Zvířata (zoonotický přenos)	8
1.5.1.3. Voda	8
1.5.1.4. Potraviny	8
1.5.1.5. Hmyz (přenos pomocí vektoru)	9
1.5.2. Interakce parazit-hostitel	10
1.5.3. Klinické příznaky	11
1.5.4. Léčba mikrosporidiózy	11
1.6. Imunosupresiva	12
1.6.1. Cyklosporin A	13
1.6.2. Takrolimus	13
1.6.3. Mykofenolát mofetil	14
2. Cíle práce	15
3. Materiál a Metody	16
3.1. Spory mikrosporidií	16
3.2. Myši	16
3.3. Imunosupresiva	16
3.4. Léčivo	16
3.5. Infekce SCID a BALB/c myší	17
3.6. Léčba pomocí albendazolu vybrané skupiny SCID a BALB/c myší	17
3.7. Reinfekce BALB/c myší v chronické fázi a po léčbě albendazolem	17
3.8. Imunosuprese vybraných skupin BALB/c myší	17
3.9. Sledování průběhu mikrosporidiózy u jednotlivých skupin myší na základě koprologického vyšetření	17
3.9.1. Odběr trusu	17

3.9.2. Barvení pomocí Calcofluoru White M2R	18
3.9.3. Izolace DNA z trusu.....	18
3.10. Sledování průběhu mikrosporidíózy u jednotlivých skupin myší na základě vyšetření vzorků orgánů.....	18
3.10.1. Odběr vzorků orgánů a tkání.....	18
3.10.2. Příprava histologických preparátů	19
3.10.3. Barvení podle Brown-Brenna (modifikace Gramova barvení).....	19
3.10.4. Barvení hematoxylin-eosinem	20
3.10.5. Izolace DNA z tkání.....	20
3.10.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	21
3.10.7. Analýza průtokovým cytometrem.....	22
3.10.8.1. Izolace splenocytů	22
3.10.8.2. Izolace lymfocytů z krve.....	23
3.10.8.3. Průtoková cytometrie.....	23
4. Výsledky	25
4.1. Stanovení průběhu mikrosporidíózy u SCID myší.....	25
4.2. Stanovení průběhu mikrosporidíózy u SCID myší léčených albendazolem 14.– 28.DPI.....	27
4.3. Stanovení průběhu mikrosporidíózy u BALB/c myší	28
4.4. Stanovení průběhu mikrosporidíózy u BALB/c myší léčených albendazolem 28.– 42. DPI.....	30
4.5. Stanovení průběhu mikrosporidíózy u BALB/c myší po léčbě albendazolem 28.–42. DPI a následné reinfekci 56. DPI.....	31
4.6. Stanovení průběhu mikrosporidíózy u BALB/c myší reinfikovaných 56. DPI v chronické fázi infekce.....	32
4.7. Stanovení průběhu mikrosporidíózy u BALB/c myší po imunosupresi 35.–60. DPI v akutní fázi infekce.....	33
4.8. Stanovení průběhu mikrosporidíózy u BALB/c myší po léčbě albendazolem 28.–42. DPI a následné imunosupresi 56.–60.....	35
4.9. Stanovení průběhu mikrosporidíózy u BALB/c myší po aplikaci imunosupresiv 56.–60. DPI v chronické fázi infekce	37
5. Diskuse	39
6. Závěry	44
7. Použitá literatura	45

1. ÚVOD

1.1. Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou heterotrofní, jednobuněčné mikroorganismy řazené do samostatného kmene *Microspora* (Weber et al. 1994). Jsou to obligátní vnitrobuněční paraziti postrádající mitochondrie a peroxisomy stejně jako jiní metazoární paraziti, například metamonády a parabasala (Hashimoto et al. 1998). Dále u spor a intracelulárních stádií nenalezneme pravý Golgiho aparát, bičků a další (9+2) mikrotubulární struktury. Navíc mají vysoce redukovaný metabolismus, 70S ribozomy a nejmenší genom ze všech eukaryot.

Od roku 1857, kdy Nägeli popsal nově objeveného parazita v housenkách bource morušového, kterého pojmenoval *Nosema bombycis* (Nägeli 1857), byly mikrosporidie identifikovány jako příčina mnoha onemocnění u různých druhů zvířat. Jejich hostitelské spektrum je velice pestré – zahrnuje většinu bezobratlých a všechny třídy obratlovců (Canning et al. 1986; Sprague and Vávra 1976). Dodnes bylo identifikováno téměř 1000 druhů řazených do více než 100 rodů mikrosporidií (Sprague et al. 1992).

První případ lidské mikrosporidiózy byl zaznamenán v roce 1959 (Matsubayashi et al. 1959), avšak od devadesátých let, kdy se začala šířit epidemie syndromu získané imunitní nedostatečnosti (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) se zvýšil i počet lidí s mikrosporidiózovou infekcí. Později byly mikrosporidie zařazeny mezi oportunní patogeny infikující jedince se sníženou imunitou, zvláště jedince HIV-pozitivní nebo pacienty po transplantaci či protinádorové terapii (Canning and Hollister 1992).

1.2. Taxonomie

Pojem mikrosporidie je netaxonomické označení běžně užívané pro popis skupiny organismů patřících do kmene *Microspora*, který byl zpočátku řazen uvnitř podříše Protozoa (Sprague 1982). Přestože mají mikrosporidie některé rysy prokaryot - 70S ribozomy, nepřítomnost mitochondrií, peroxysomů a Golgiho aparátu (Vossbrinck et al. 1987), jsou považovány za pravá eukaryota, protože mají jádro s jaderným obalem, intracytoplasmatický systém membrán a separaci chromosomů pomocí dělicího vřeténka (Canning et al. 1986).

Strukturní jednoduchost mikrosporidií vedla k názoru, že jsou to primitivní eukaryota (Cavalier-Smith 1983). Ale díky molekulární fylogenetice bylo prokázáno, že mikrosporidie patří mezi houby nebo organismy houbám blízce příbuzné (Hirt et al. 1999; Katinka et al. 2001). Bylo zjištěno, že jaderný genom obsahuje geny pro proteiny, jež jsou mitochondriálního původu. Příkladem takových proteinů jsou HSP70 (70-kDa heat shock protein) (Hirt et al. 1997) nebo několik jednotek pyruvát-dehydrogenázového komplexu, který taktéž mohl být odvozený od mitochondriálního původu (Fast and Keeling 2001). Tyto geny jsou velmi blízce příbuzné genům mitochondrií jiných eukaryot, proto se předpokládá, že mikrosporidie degenerovaly z vyšší formy organismu (Keeling and McFadden 1998). Voigt a Kirk (2011) uvádí ve své práci přehlednou tabulku, ve které poukazují na strukturní znaky, které řadí mikrosporidie k houbám (přítomnost chitinu ve stěně spor a nepřítomnost bičíku a jakékoli jiné 9+2 mikrotubulární struktury) a na stranu druhou jsou zde znaky, které jsou unikátní pro mikrosporidie a zároveň je od hub odlišují; extrémní redukce genomu, způsob infekce hostitelského organismu, nepřítomnost mitochondrií, peroxisomů a velikost ribozomů. Přesné umístění mikrosporidií na fylogenetickém stromu je proto stále diskutováno.

1.3. Morfologie a životní cyklus

Spora je charakteristickou formou mikrosporidií, jejíž velikost se pohybuje mezi 1 až 20 μm . Druhy, které infikují savce, mají spory obvykle 1–3 μm velké. Obal spory je tvořen tenkou stěnou, která se skládá ze tří částí:

- 1) elektron-densní vnější proteinové vrstvy zvané exospora,
- 2) chitinové vnitřní vrstvy zvané endospora a
- 3) plasmatické membrány uzavírající cytoplasmu a organely.

Pro mikrosporidie je typický vystřelovací aparát, který obsahuje stočenou trubici určenou k infekci hostitelské buňky a polaroplast, tvořený navrstvením k sobě těsně přiložených membránových lamel a vezikul (Larsson 1999). Mechanismus infekčního procesu je založen na vzrůstajícím osmotickým tlaku během germinace, kdy v zadní vakuole dochází ke štěpení molekul disacharidu trehalózy na glukózu a postupné oxidaci dlouhých řetězců mastných kyselin. Dochází tak k zvětšování vakuoly až stěna spory praskne v jejím nejtenčím místě na apikálním vrcholu (Undeen and Van der Meer

1999). Zároveň dojde k vystřelení pólové trubice prasklinou. Poté je touto trubicí protlačen obsah spory a vytvoří se vnější membrána infekčního agens z polaroplastu mateřské spory. Tímto mechanismem se parazit injikuje do cytoplasmu hostitelské buňky (Keohane and Weiss 1999).

V hostitelské buňce se sporoplasma změní v meront. Meronty jsou kulaté nebo podlouhlé útvary s jednoduchou stavbou, které se uvnitř hostitelské buňky množí binárním nebo několikanásobným dělením zvaným merogonie. Někdy dělení jádra může probíhat bez rozdělení mateřské buňky parazita – potom vznikají mnohjaderné plasmodiální formy (Canning 1993).

Meronty se dále vyvinou ve sporonty, které jsou charakteristické elektrondensní povrchovou vrstvou. Tato vrstva se později stane exosporou. Ze sporontů, které se množí jednou nebo několika binárními sporogoniemi, vzniknou sporoblasty, ze kterých se nakonec vyvinou zralé diferencované spory (Canning 1993).

Po vyplnění hostitelské buňky sporami dochází k prasknutí cytoplasmatické membrány a uvolněné spory tak mohou zahájit nový cyklus.

Protože životní cyklus mikrosporidií je striktně závislý na hostitelských buňkách, jejich genom je vysoce redukovaný. Velikost genomu sahá od 2,3 Mb u *Encephalitozoon intestinalis* (Corradi et al. 2010), který způsobuje gastrointestinální onemocnění u člověka, až po 24 Mb u *Octosporea bayeri*, jež je patogen *Daphnia magna* (Corradi et al. 2009). Pro představu, genom *Encephalitozoon intestinalis* je více než 1000× menší než lidský genom (3000 Mbp) a představuje pouze jednu polovinu velikosti genomu *Escherichia coli* (4,6 Mbp). Protože jsou některé metabolické funkce poskytovány hostitelskou buňkou, geny zahrnuté v takovýchto funkcích se stanou nadbytečnými a mohou být ztraceny po inaktivaci mutací (Keeling and Fast 2002).

1.3.1. Parazitoformní vakuola

Pojem parazitoformní vakuola byl odvozen od řeckého slova pherein (= nosit), tedy vakuola “nesoucí parazita“. Tento termín byl poprvé použit k popisu intracelulárních vakuol, které obsahovaly tachyzoity *Toxoplasma gondii* a kokcidie rodu *Eimeria* (Scholtyseck and Piekarski 1965). Název parazitoformní vakuola se používá pro označení modifikovaného intracelulárního kompartmentu v buňkách, který obsahuje parazitické prvoky.

Mikrosporidie můžeme dělit podle toho, zda prodělávají svůj vývoj v parazitoformní vakuole nebo přímo v cytoplasmě hostitelské buňky. Volně v cytoplasmě hostitelské buňky prodělává svůj vývoj například rod *Enterocytozoon* (Cali and Owen 1990). Naproti tomu rod *Encephalitozoon* prodělává vývoj uvnitř parazitoformní vakuoly, která je od cytoplasmy hostitelské buňky oddělena membránou (Vávra and Larrson, 1999). Parazitoformní vakuola má vysoce organizovanou strukturu; vyvíjející se mikrosporidiová stádia jsou charakteristicky uspořádána blízko membrány vakuoly, zatímco zralé, plně diferenciované spory jsou umístěny centrálně. Infikované buňky mohou obsahovat jednu nebo i více parazitoformních vakuol. S postupným množením a dozráváním vývojových stádií se vakuola zvětšuje a často zabírá většinu hostitelské cytoplasmy, přičemž zatlačuje jádro, orgány a cytoskelet hostitelské buňky na její periferii. Infekce může trvat i několik dní, dokud parazitoformní vakuola i membrána hostitelské buňky nepraskne (Scanlon et al. 2000).

Taxonomie a druhová klasifikace mikrosporidií je primárně založena na ultrastrukturálních rysech jako je velikost a morfologie vývojových stádií, počet závitů tubulárního vystřelovacího aparátu spory a vztahu parazit-hostitel. Pro druhovou charakteristiku je důležitá také hostitelská specifita a typ orgánu, tkáně a buňky, které parazit invaduje.

1.4. *Encephalitozoon* spp.

Sporoplasma injikovaná do hostitelské buňky iniciuje proliferativní merogoniální fázi. Meronti jsou strukturálně jednoduché buňky s malou diferenciací cytoplasmy a jsou ohraničeny jednoduchou membránou. Množí se opakovaným binárním a mnohonásobným dělením. Ke karyokinezi může docházet opakovaně bez rozdělení mateřské buňky, čímž vznikne kulatá mnohojaderná plasmodiální forma (např. *Enterocytozoon bieneusi*) nebo podlouhlá mnohojaderná buňka (např. *Encephalitozoon intestinalis*) (Cali et al. 1993; Cali and Owen 1990).

Sporogonie započne, když se meronti vyvinou ve sporonty, které jsou charakteristické svým hustým amorfním povrchovým obalem. Sporonti rostou a množí se binárním nebo mnohonásobným dělením, čímž vzniknou sporoblasty. Ze sporoblastů se stanou zralé spory rozvojem zřetelných cytoplasmatických organel a ztlušťováním stěny spory (Weber et al. 1994). Ke sporogonii u *Encephalitozoon* spp. dochází

v parazitoformní vakuole, která je ohraničená membránou, již vytvořila hostitelská buňka (Cali et al 1993; Canning 1993).

Jako lidské patogeny byly identifikovány tři druhy rodu *Encephalitozoon*: *E. cuniculi*, který má široké hostitelské spektrum, především mezi savci (Canning et al. 1986); *E. hellem*, který byl odlišen od *E. cuniculi* v roce 1991 (Didier et al. 1991), a který byl zaznamenán v několika případech jako patogen ptáků ve Spojených státech a Indonésii; *E. intestinalis* (původně pojmenovaný jako *Septata intestinalis*), který byl poprvé popsán v roce 1993 (Cali et al. 1993) a diagnostikován ve výkalech hospodářských zvířat v Mexiku a u goril v Africe.

Lidské izoláty všech tří druhů rodu *Encephalitozoon* (*E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*) a izoláty *E. cuniculi* ze zvířat jsou morfologicky identické za použití světelné mikroskopie. Navíc *E. cuniculi* je morfologicky neodlišitelný od *E. hellem* jak světelnou tak elektronovou mikroskopií.

Další známé druhy tohoto rodu jsou *E. lacertae* (Koudela et al. 1998), který byl identifikovaný pouze u plazů a je nejvíce příbuzný *E. cuniculi*, a *E. romaleae*, který byl nalezen u sarančat (Lange et al. 2009).

1.4.1. *Encephalitozoon cuniculi*

Mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* byla poprvé izolována z mozku, míchy a ledvin králíka s motorickou paralýzou v roce 1922 (Wright and Craighead 1922) a v roce 1923 byla pojmenována (Levaditi et al. 1923).

Ze všech savčích druhů má pravděpodobně nejširší hostitelské spektrum. Přirozené infekce byly zaznamenány u celé řady druhů savců, zahrnující hlodavce, zajíce, šelmy, přežvýkavce a také primáty včetně člověka (Canning and Hollister 1987; Didier et al. 1998; Sak et al. 2011).

Encephalitozoon cuniculi byl také první úspěšně izolovanou mikrosporidií ze savce převedenou do buněčné kultury (Shaddock 1969), což zajistilo dostatečný zdroj mikrosporidií pro vývoj diagnostických metod a studium experimentálních infekcí laboratorních zvířat.

Všechna vývojová stádia *Encephalitozoon cuniculi* mají během vývojového cyklu jednoduché jádro. Merogonie probíhá binárním dělením, meronti zůstávají v blízkosti membrány vakuoly. Tvar merontů je kulatý nebo oválný, někdy nepravidelný. Sporonti se shlukují v centru vakuoly. Sporogonie je většinou bisporoblastická (tj. vznikají dva sporoblasty), ale byla zaznamenána i tetrasporoblastická. Po naplnění parazitoformní

vakuoly sporami dochází k prasknutí stěny této vakuoly i membrány hostitelské buňky a infekční spory jsou uvolněny do okolního prostředí. Velikost spor *E. cuniculi* se pohybuje mezi $2,0\text{--}2,5 \times 1,0\text{--}1,5 \mu\text{m}$ a pólová trubice tvoří 5–7 závitů v jedné řadě (Canning and Lom 1986).

O původu membrány parazitoformní vakuoly mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* máme jen málo informací. Existují dva zásadně se lišící názory na to, jakým způsobem probíhá tvorba parazitoformní vakuoly u rodu *Encephalitozoon*. Podle prvního se na tvorbě podílí hostitelská buňka (Rönnebäumer et al. 2008), naopak podle druhého názoru probíhá tvorba parazitoformní vakuoly bez přispění hostitelské buňky (Fasshauer et al. 2005; Maňurová-Vancová 2001). Zda je parazitoformní vakuola původu hostitelského nebo parazitárního je zcela zásadní pro pochopení vývoje mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* v buňce. Invaginace plasmatické membrány hostitelské buňky se předpokládá pouze u tohoto rodu. Ostatní mikrosporidie vstupují do buněk penetrací plasmatické membrány (Didier et al. 1998).

Encephalitozoon cuniculi je nejlépe prostudovaným druhem mikrosporidií, a většina toho, co je známo o patogenezi mikrosporidiálního onemocnění je odvozeno ze studií tohoto organismu. Infekční spory se do volného prostředí dostávají exkrementy - močí a výkaly. Nejčastějším způsobem přenosu parazita je ingesce nebo inhalace infekčních spor. Primární infekce se tedy rozvíjí v epitelálních buňkách tenkého střeva nebo dýchacího traktu. Sexuální přenos mikrosporidiózy je založen na přítomnosti mikrosporidií v močovodu a prostatě, jak bylo patrné v několika případech u AIDS pacientů (Birthistle et al. 1996; Corcoran et al. 1996). Transplacentární přenos parazita byl pozorován u hlodavců, masožravců a u opic (Mohn et al. 1982; Botha et al. 1979; Zeman and Baskin 1985).

Encephalitozoon cuniculi je schopný přežít v buňkách hostitele navzdory aktivované imunitní odpovědi. Konkrétně přežívá v makrofázích, jejichž prostřednictvím se šíří do celého těla. Mnoho spor je procesy uvnitř makrofágů zabito. Některé však přežívají a replikují se díky absenci fúze lysozomu s fagozomem (Weidner 1975). Přítomnost parazita blokuje lysozomální aktivitu uvnitř parazitoformní vakuoly, což bylo prokázáno nepřítomností kyselé fosfatázy, která je součástí lysozomální tekutiny.

Schmidt a Shaddock (1984) potvrdili dva možné mechanismy vstupu *E. cuniculi* do hostitelské buňky, a to aktivním vystřelením pólové trubice s injekcí sporoplasmy do

buňky nebo fagocytózou. Dále provedli experiment, díky kterému zjistili, že i neopsonizované spory *E. cuniculi* mohou být fagocytovány myšními makrofágy *in vitro* a mohou se v nich namnožit. Ditrich et al. (1997) uvádí, že se pravděpodobně častěji jedná o aktivní proces vstupu mikrosporidie do buňky a v případě, že je makrofág infikován aktivně, téměř ztrácí své fagocytické schopnosti.

Na základě biochemických, imunologických a molekulárních rozdílů byly popsány tři genotypy (kmeny) *E. cuniculi*. Kmen I byl původně izolován a kultivován z králíků (Shadduck 1969), kmen II pochází z myši, ale později byl nalezen v norských polárních liškách (*Alopes lagopus*) (Didier et al. 1995) a kmen III byl původně popsán u domácích psů (Shadduck et al. 1978). Tyto kmeny nejsou přísně hostitelsky specifické. Všechny kmeny *E. cuniculi* byly nalezeny u člověka.

Bylo zjištěno, že velká část populace se během svého života s touto mikrosporidií setkala, protože mnoho jedinců bez klinických projevů infekce bylo serologicky pozitivních (Hollister et al. 1991, van Gool et al. 1997).

1.5. Mikrosporidióza

1.5.1. Zdroje lidské nákazy

Mikrosporidióza je relativně nedávno rozpoznaná infekce u lidí, a pouze několik málo studií zjišťovalo zdroj a způsob přenosu mikrosporidií na člověka. Nicméně, informace z jednotlivých případů mikrosporidiózy u lidí a přírodní a experimentální infekce u zvířat poskytují náhled na možné způsoby přenosu parazita na člověka (Shadduck et al. 1996). Tabulka I shrnuje možné zdroje mikrosporidií *E. cuniculi* jakožto infekční agens pro člověka.

1.5.1.1. Člověk (vertikální a horizontální přenos)

Vertikální přenos mikrosporidiózy z matky na potomka přes placentu byl popsán u hlodavců, králíků, masožravců a primátů (Snowden et al. 1998; Snowden and Shadduck 1999). Vertikální přenos mikrosporidiózy u člověka nebyl dosud zaznamenán.

Přítomnost mikrosporidií v dýchacím a zažívacím traktu infikovaných jedinců a vylučování spor stolicí a močí indikuje, že horizontální přenos je možný cestou fekálně-orálního přenosu, orálně-orálního přenosu, inhalací kontaminovaného aerosolu a požitím kontaminované potravy nebo vody (Bryan and Schwartz 1999; Mota et al. 2000; Weber et al. 2000). Rizikové faktory spojené s mikrosporidiózou, které podporují

horizontální přenos jsou homosexuální praktiky, nitrožilní užívání drog, a kontakt s kontaminovanou vodou (Hutin et al. 1998).

1.5.1.2. Zvířata (zoonotický přenos)

Přímý důkaz pro zoonotický přenos mikrosporidíózy byl zaznamenán u dítěte, které bylo serologicky pozitivní poté, co bylo v kontaktu se štěňatou, která byla infikovaná *E. cuniculi* (MacInnes and Stewart 1991). Mnoho druhů mikrosporidií, které infikují člověka, bylo také nalezeno v široké škále savců. To podporuje názor, že dochází k zoonotickému přenosu (Mathis et al. 2005). Experimenty ukázaly, že spory mikrosporidií zůstávají životaschopné nejenom ve vodě, ale i po vyschnutí následovaném inkubací v různých teplotách. To nasvědčuje tomu, že nepřímý zoonotický přenos mikrosporidií mezi zvířaty a člověkem je možný přes vodu a jídlo kontaminované zvířecím trusem nebo močí, nebo aerosolem (Bryan and Schwartz 1999; Deplazes et al. 2000).

1.5.1.3. Voda

Zdá se, že druhy mikrosporidií, které infikují člověka, postrádají hostitelskou specifickou a mohou být jednoduše vylučovány infikovanými zvířaty močí nebo výkaly a kontaminovat tak vodní zdroje. Spory mikrosporidií jsou odolné nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí a jsou schopné přežít po dlouhou dobu ve vodě. Pro jejich malou velikost není snadné zachytit je filtrací a pro infekci postačí relativně malá dávka (Franzen and Müller 1999). Podle epidemiologických studií, rizikový faktor spojený s lidskou mikrosporidíózou je vystavení se vodě při rekreaci, při práci, koupání ve vaně i samotné pití vody (Hutin et al. 1998). Zvýšené procento infekcí je identifikováno u lidí žijících blízko vodních zdrojů (Cotte et al. 1999).

1.5.1.4. Potraviny

Organismy patřící do rodu *Nosema* byly identifikovány uvnitř buněk kosterního svalstva, ve stolici HIV-pozitivního jedince, avšak žádné známky rozvinuté mikrosporidíózy u tohoto člověka nebyly pozorovány (MacDougall et al. 1993). Výzkum ukázal, že přítomnost mikrosporidií v tomto případě byl náhodný nález, nikoli pravá infekce. Nicméně, v nedávné epidemiologické studii byla prokázána souvislost několikanásobné konzumace nedostatečně tepelně upraveného hovězího masa s mikrosporidíózou u HIV-pozitivního člověka (Hutin et al. 1998). Buckholt a spol.

(2002) identifikoval *E. bienersi* v praseti na jatkách v Massachusetts, USA a navrhnul, že dostatečnou tepelnou úpravou masa se dá předejít infekci. Další studie ukázaly, že mikrosporidie příbuzná rodu *Pleistophora*, která typicky infikuje ryby a hmyz, byla identifikována jako původce infekce u lidí (Chup et al. 1993; Vávra et al. 1998). *Trachipleistophora hominis*, která je morfologicky podobná druhu *Pleistophora* z ryb, byla rozpoznána jako příčina myositis u AIDS pacienta (Field et al. 1996). Ale také bylo zjištěno, že mikrosporidie *T. hominis* roste v kultuře mnohem aktivněji při teplotě 32–34 °C, což naznačuje, že tento druh není na člověka plně adaptovaný (Cheney et al. 2000). Další případ podporující možnost přenosu mikrosporidie přes potraviny, byl důkaz *E. intestinalis* v zavlažovací vodě, která se používala v rostlinné produkci (Thurston-Enriquez et al. 2002). V nedávné době byla publikovaná studie, která potvrzuje, že čerstvé potraviny jako jsou bobulovité plody, kapusta a jiné druhy listové zeleniny mohou obsahovat životaschopné spory mikrosporidií druhů *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis* a *E. cuniculi* v takovém množství, které již může způsobit infekci u lidí (Jedrzejewski et al. 2007).

1.5.1.5. Hmyz (přenos pomocí vektoru)

Existuje důkaz, že také existuje přenos mikrosporidie pomocí hmyzu. *Brachiola* (syn. *Nosema*) *algerae* je přirozený patogen moskytů. Pokus způsobit systémovou infekci u krys a athymických myší po intravenózním a orálním podání dávky parazita byl neúspěšný. Avšak lokalizovaná infekce se rozvinula po podkožní inokulaci mikrosporidie do ocasu, tlapky nebo ucha výše zmíněných hostitelů (Undeen and Alger 1976; Trammer et al. 1997). Weidner a spol. (1999) provedl pokus, ve kterém přenesl *Trachipleistophoru hominis* do komárů (*Anopheles quadrimaculatus* a *Culex quinquefasciatus*). Infekce se v komárech rozvinula ve svalových svazcích 4. až 6. abdominálního segmentu. Spory *T. hominis* byly později znovuzískány z cukerného roztoku, který byl používán pro krmení moskytů, a některé spory byly nalezeny v žaludku a střevě komára. To poukazuje na možný přenos mikrosporidií na savce při sání vektora (Weidner et al. 1999).

Tabulka I: Příklady zdrojů mikrosporidií druhu *Encephalitozoon cuniculi*, jakožto infekční faktory pro člověka (Didier et al. 2004)

Zdroj	Reference
Masožravci, králíci, hlodavci	Canning and Lom (1986); Snowden and Shadduck (1999); Deplazes et al. (2000)
Lišky	Akerstedt (2002)
Kozy	Cislaková et al.(2001)
Koně	van Rensburg et al. (1991); Patterson-Kane et al. (2003)
Primáti	Zeman and Baskin (1985); Guscetti et al. (2003)
Krasy (ve volné přírodě)	Müller-Doblies et al. (2002)
Voda	nebylo pozorováno
Potraviny	Jedrzejewski et al. 2007

1.5.2. Interakce parazit-hostitel

Protože členové rodu *Encephalitozoon* jsou paraziti lidí i jiných hostitelů, experimentální a přirozená encephalitozoonóza savců může sloužit jako vhodný model lidské systémové mikrosporidiózy. Nicméně, průběh onemocnění způsobených mikrosporidii rodu *Encephalitozoon* se značně liší u různých druhů hostitelů, způsobem infekce i faktory, jako jsou věk hostitele v době infekce a síla imunitní odpovědi. Pro druh *Enterocytozoon bieneusi* neexistuje žádný zvířecí model (Weber et al. 1994).

Pro encephalitozoonózu lidí a savců byly popsány čtyři kategorie interakcí parazit-hostitel (Shadduck and Greeley 1989);

- 1) latentní asymptomatická nebo chronická infekce s mírnými symptomy, která je známá u myši a králíků všech věkových kategorií, u psů, polárních lišek a kotula veverkovitého, kteří byli infikováni v dospělém věku (Bismanis 1970; Canning et al. 1986);
- 2) akutní, potenciálně fatální onemocnění, pozorované u novorozených štěňat, lišcat lišky polární a mláďat kotula veverkovitého (Mohn et al. 1982; Botha et al. 1979; Zeman and Baskin 1985);
- 3) proliferace parazita u hostitelů s absencí kompetentní ochrany, pozorovaná u pacientů s imunodeficiencí a athymických myši *in vivo* a v buněčných kulturách *in vitro* (Gannon J 1980);
- 4) symptomatické onemocnění u imunokompetentního člověka (Sandfort et al. 1994).

1.5.3. Klinické příznaky

Mikrosporidie u lidí jsou považovány za oportunní patogeny, protože jsou především příčinou onemocnění, je-li imunita hostitele snížena tak, že infekce nemůže být kontrolována. Klinické symptomy a onemocnění spojené s mikrosporidiózou se liší podle druhu mikrosporidie a podle stavu imunitního systému hostitele.

Nejběžnější klinickou manifestací lidské mikrosporidiózy při infekci druhem *E. bienewisi* nebo *E. intestinalis* je průjem. HIV-pozitivní jedinci s méně než 100 CD4+ buněk na mm³ krve jsou k infekci mikrosporidii citliví, ale stejně tak i imunokompetentní či zcela zdraví jedinci, především cestovatelé, mohou být stejně postiženi (Lopez-Velez et al. 1999; Müller et al. 2001). Zatímco *E. bienewisi* způsobuje relativně lokalizované onemocnění, především gastrointestinálního a méně běžně i respiračního traktu, všechny tři druhy rodu *Encephalitozoon* typicky diseminují a způsobují klinické syndromy zahrnující sinusitidu, keratokonjunktivitidu, encefalitidu, tracheobronchitidu, intersticiální nefritidu, hepatitidu nebo myositidu. Nicméně, mezi druhy mikrosporidií jsou jasné rozdíly v rozšíření parazita v hostitelském organismu. *Encephalitozoon hellem* parazituje především v oční rohovce a spojivce, v močovém traktu, nosních dutinách a bronchiálním systému. *Encephalitozoon intestinalis* se zase zdá být spojen s gastrointestinálním traktem a žlučovody, s diseminací do ledvin, očí, nosních dutin a někdy také do dýchacího traktu. Naproti tomu *E. cuniculi* se zpravidla rozšiřuje do všech orgánů v těle, vyjma gastrointestinálního traktu, kde bývá jen sporadicky. Klinické projevy infekce mikrosporidií *E. cuniculi* se liší od asymptomatických až po vážná onemocnění (Franzen 2008).

Druhy mikrosporidií jako jsou *E. bienewisi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*, *T. hominis*, *T. anthropophthera* a *A. vesicularum* byly prvotně identifikovány u HIV-pozitivních jedinců. Ale nedávné případy ukázaly, že většina těchto druhů není omezena jen na AIDS pacienty. *Enterocytozoon bienewisi* a *E. intestinalis* byly nalezeny jako původci průjmu u imunokompetentních osob (Sandfort et al. 1994; Raynaud et al. 1998). Naproti tomu se mikrosporidie objevily u pacientů, kteří byli po orgánové transplantaci nebo protinádorové léčbě (Goetz et al. 2001; Gumbo et al. 1999).

1.5.4. Léčba mikrosporidiózy

Mnoho různých léčiv bylo testováno pro kontrolu neseamatózy u včel medonosných, avšak pouze Fumagillin a acyklická antibiotika produkovaná kmenem *Aspergillus fumigatus* byla efektivní (Katznelson and Jamiesin 1952). Fumagillin je také účinný

proti lidské mikrosporidiióze a působení proti *E. cuniculi* bylo prokázáno Shaddockem již v roce 1980, který navrhnul tuto látku jako léčivo pro encephalitozoonózu (Shaddock 1980). Fumagillin byl poprvé použit pro léčbu mikrosporidiální keratokonjunktivitidy u tří HIV-pozitivních pacientů (Diesenhouse et al. 1993; Rosberger et al. 1993) a poté bylo mnoho dalších pacientů úspěšně vyléčeno tímto přípravkem (Friedberg and Ritterband 1999). Fumagillin je také efektivní léčivo pro chronickou infekci druhem *E. bieneusi* u imunokompromitovaných jedinců, avšak u 50 % z léčených pacientů byly pozorovány vedlejší efekty léčby jako je neutropenie a trombocytopenie (Molina et al. 2002).

Počáteční zprávy o úspěšné léčbě střevní mikrosporidiiózy pomocí metronidazolu nebyla podpořena dalšími studiemi, a také se ukázalo, že metronidazol není účinný proti mikrosporidiím v kulturách *in vitro* (Beauvais et al. 1994). Bylo testováno několik dalších prostředků, avšak bezúspěšně, kromě albendazolu, benzimidazolu, který se váže k tubulinu a byl tak sledovaný jako vysoce účinný přípravek proti mikrosporidiím hmyzu a člověka (Haque et al. 1993). Léčba lidských mikrosporidiálních infekcí způsobených rodem *Encephalitozoon* pomocí albendazolu ukázala výrazné zlepšení příznaků onemocnění a postupnou likvidaci parazita ve všech orgánech (Molina et al. 1995). Počáteční zprávy popisovaly klinické působení albendazolu proti *E. bieneusi* (Dieterich et al. 1994), avšak následné studie toto tvrzení vyvrátily (Molina et al. 1997).

Od té doby, co se používá vysoce efektivní antiretrovirální terapie u HIV-pozitivních pacientů, výskyt mikrosporidiiózy u těchto jedinců výrazně klesl. Několik studií potvrzuje zmírnění symptomů spojených s mikrosporidiiózou u AIDS pacientů (Carr et al. 1998; Contreas et al. 1998) a dokonce bylo zdokumentováno i úplné vymizení parazita z orgánů (Miao et al. 2000).

1.6. Imunosupresiva

Látky tlumící činnost imunitního systému se nazývají imunosupresiva. Do této skupiny léčiv patří celá řada látek, které jsou odlišné mechanismem účinku i chemickou strukturou. Imunosupresiva se používají k potlačení nepřiměřené imunitní reakce při autoimunitních chorobách a k potlačení normální imunitní reakce při transplantacích orgánů či kostní dřeně.

1.6.1. Cyklosporin A

Cyklosporin A (CsA) je neutrální polypeptid, který inhibuje proliferaci T lymfocytů, jejich aktivaci a uvolňování lymfokinů. Kvůli jeho lipofilnímu charakteru se volně v plasmě vyskytuje v množství menším než 5 %. Ve formě vázané na plazmatické lipoproteiny je ho přes 35 %, v leukocytech je vázáno 10 % a v erytrocytech 50 % (Hughes et al. 1991).

Cyklosporin A inhibuje kalcineurin-fosfatázovou aktivitu, což ve výsledku potlačuje buněčnou imunitu stejně tak jako humorální odpověď, avšak v menší míře. Kalcineurin je potřebný pro transkripci genu interleukinu-2 uvnitř T lymfocytů. Pomocí inhibice kalcineurinové aktivity potlačuje cyklosporin produkci a uvolňování interleukinu-2, což ve výsledku inhibuje růst a množení T lymfocytů. Cyklosporin působí na lymfocyty specificky a reverzibilně a na rozdíl od cytostatik nesnižuje hemopoézu a neovlivňuje funkci fagocytů.

Cyklosporin A se používá jako imunosupresivum v posttransplantační terapii. Prodlužuje přežívání alogenních transplantátů kůže, srdce, ledvin, pankreatu, kostní dřevě, tenkého střeva a plic. V posledních letech se úspěšně užívá i u nemocných s idiopatickými střevními záněty.

V případě imunosuprese myši byly popsány imunosupresivní účinky cyklosporinu A při dávkách 5–10 mg/kg denně podávaných perorálně (Dong-Gyun et al. 2007).

1.6.2. Takrolimus

Takrolimus je makrolidní imunosupresivum izolované ze *Streptomyces tsukubaensis* (Kino et al. 1987), který se běžně používá při orgánových transplantacích a k léčbě atopické dermatitidy, psoriázy a střevního onemocnění. Klinické studie rovněž potvrdily jeho účinek při léčbě revmatoidní artritidy.

Takrolimus inhibuje zejména tvorbu cytotoxických lymfocytů, které jsou hlavně zodpovědné za odhojení štěpů. Potlačuje aktivaci T lymfocytů a proliferaci B lymfocytů a také tvorbu lymfokinů a expresi receptorů interleukinu-2. Imunosupresivní účinky takrolimu jsou primárně spojeny s aktivací T buněk (Roehrl et al. 2004). Mechanismem je navázání intracelulárních proteinů zvaných imunofiliny (FKBP-12) za vytvoření takrolimus-FKBP-12 komplexu. Tento komplex napomáhá inhibici kalcineurin-fosfatázy, enzymu zahrnutého v aktivaci transkripčního faktoru potřebného k expresi genů cytokinů. Výsledkem je kompletní blokáda tvorby cytokinů produkovaných T lymfocyty, jako jsou tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-2 (IL-2) a

interferon gama (INF- γ) a také narušení proliferace T lymfocytů a následně jejich funkce.

Takrolimus může být podáván intramuskulárně, intraperitoneálně nebo perorálně. V případě imunosuprese myši byly popsány imunosupresivní účinky takrolimu při dávkách 2–5 mg/kg denně podávaných perorálně (Asano et al. 1995).

1.6.3. Mykofenolát mofetil

Mykofenolát mofetil (2-morfolinoethylester kyseliny mykofenolové) je imunosupresivum, které je úspěšně používáno v prevenci akutní rejekce ledvinového aloštěpu a v léčbě rejekce u pacientů po transplantaci ledvin, srdce nebo jater.

Mykofenolát mofetil je hydrolyzován na kyselinu mykofenolovou, což je farmakologicky účinná látka, která selektivně inhibuje inosin-monofosfát dehydrogenázu (IMP-DH). Tento enzym je klíčový v *de novo* syntéze purinu a v přeměně IMP na GMP. Zatímco jiné buňky mohou využít tzv. záchranou syntézu purinových nukleosidů, proliferace T a B lymfocytů je kriticky závislá na *de novo* syntéze purinů (Padalko et al. 2003). Kyselina mykofenolová inhibuje syntézu guanosinových nukleotidů. Nemá vliv na časnou fázi aktivace lymfocytů (neinhibuje syntézu interleukinu-2), ale zřejmě zasahuje až do pozdějších proliferativních a diferenciacních pochodů; dochází k potlačení produkce protilátek i ke snížení buněčné imunitní reakce (Slíva and Votava 2010).

Mykofenolát mofetil může být podáván intramuskulárně, intraperitoneálně nebo perorálně. Při imunosupresi laboratorních myši se používají dávky 50–100 mg/kg, což je mnohonásobně větší dávka, než se doporučuje u člověka.

2. CÍLE PRÁCE

- Zaznamenat průběh mikrosporidiózy u BALB/c a SCID myší; zdokumentovat šíření mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* do jednotlivých orgánů a zjistit její přítomnost či nepřítomnost v trusu
- Provést léčbu pomocí albendazolu u infikovaných BALB/c a SCID myší
- Za použití imunosupresiv vyvolat snížení imunity u infikovaných BALB/c myší a případně sledovat rozšíření mikrosporidií do jednotlivých orgánů
- Provést reinfekci BALB/c myší po léčbě albendazolem a v chronické fázi

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Spory mikrosporidií

Byly použity spory *Encephalitozoon cuniculi* kmene EC2 izolovaného Koudelou a spol. (1994) z dexamethazonem imunosuprimované myši, které byly kultivovány v buňkách opičích ledvin Vero E6 v termostatu při teplotě 37 °C v kompletním kultivačním médiu RPMI-1640 HEPESmodification (hepes 25mM, Sigma) s přísávkem 2,5% bovinního fetálního séra (Bofes, ZVOS Hustopeče), směsi antimykotik, antibiotik (Sigma) (100 UI penicilinu, 10 µg streptomycinu, 0,25 µg amfotericinu B/ml média), gentamycinu (30 µg/ml RPMI) a neesenciálních aminokyselin (SEVAC, Praha). Naadherované infikované buňky byly uvolněny pomocí skleněné tyčinky. V deionizované vodě došlo k plasmolýze buněk a jejich centrifugací (20 min při 1370 g) byl získán sediment se spory, který byl uchováván v pufru PBS s obsahem antibiotik a antimykotik v chladničce při 4 °C.

3.2. Myši

K pokusům byly použity imbrední myši kmene BALB/c – samice 7–9 týdnů staré (Charles River, Germany, distributor ANLAB ČR) a myši kmene SCID – samice 7–9 týdnů staré (vlastní chov, PaÚ BC AVČR v Českých Budějovicích). Myši byly chovány za standardních podmínek ve sterilním prostředí v IVC (Air Handling Solutions; Tecoplast, Italy) s HEPA filtry ve zvěřinci PaÚ AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. Byly krmeny sterilní komerční směsí (TOP – VELAZ Praha) a napájeny sterilní vodou *ad libitum*.

3.3. Imunosupresiva

K pokusu byla použita následující směs imunosupresiv: Cyklosporin A (10 mg/kg) + takrolimus (5 mg/kg) + mykofenolát mofetil (75 mg/kg). Všechna imunosupresiva byla v prášku, proto musela být nejprve rozpuštěna v cremoforu. Cremofor je důležité rozpouštědlo, díky němuž je poté látka rozpustná ve vodných roztocích.

3.4. Léčivo

Pro léčbu mikrosporidiózy byl aplikován Aldifal (MEVAK NITRA, SR), jež obsahuje 100 g albendazolu v 1000 ml.

3.5. Infekce SCID a BALB/c myši

SCID a BALB/c myši byly perorálně infikovány mikrosporidiiemi *E. cuniculi* v dávce 1×10^7 spor v 0,2 ml vody na myš pomocí jícnové sondy. Infikované myši byly chovány ve sterilním prostředí v izolátorech (BEM, Znojmo, ČR) s HEPA filtry.

3.6. Léčba vybraných skupin SCID a BALB/c myši pomocí albendazolu

Vybraným skupinám myši bylo denně po dobu 14 dnů perorálně podáváno léčivo. Objem dávky pro jednu myš byl 200 μ l, jež obsahoval 0,18 mg albendazolu rozpuštěného ve vodě. Pro docílení toho, aby každá myš dostala stejnou dávku léčiva, byla použita jícnová sonda.

Skupině BALB/c myši byl lék aplikován denně v rozmezí 28.–42. DPI. Jedné skupině SCID myši bylo léčivo podáváno v akutní fázi infekce (14.–28. DPI), druhé skupině v chronické fázi infekce (28.–42. DPI).

3.7. Reinfekce BALB/c myši v chronické fázi a po léčbě albendazolem

Skupina BALB/c myši po léčbě albendazolem a skupina BALB/c myši po samovyléčení byla 56. DPI perorálně reinfikována mikrosporidiiemi *E. cuniculi* dávkou 1×10^7 spor v 0,2 ml vody na myš.

3.8. Imunosuprese vybraných skupin BALB/c myši

Směs imunosupresiv (10 mg/kg cyklosporinu A + 5 mg/kg takrolimu + 75 mg/kg mykofenolát mofetilu) rozpuštěných ve vodě ve výsledném množství 200 μ l na myš, byl podáván denně pomocí jícnové sondy. Skupině BALB/c myši v akutní fázi infekce, byla imunosupresiva aplikována od 35. do 60. DPI. Dvěma skupinám myši, z čehož jedna byla po léčbě albendazolem, byla dávka imunosupresiv podávána po dobu 5 dnů, tj. 56.–60. DPI.

3.9. Sledování průběhu mikrosporidiózy u jednotlivých skupin myší na základě koprologického vyšetření

3.9.1. Odběr trusu

Od každé myši byl každý den odebrán vzorek trusu. Vzorky byly uchovávány v označených sterilních ependorfkách v mrazničce při teplotě -20 °C. Z jednotlivých vzorků byly také vytvořeny nátěry na podložní sklíčko a barveny pomocí Calcofluoru (viz. níže).

3.9.2. Barvení pomocí Calcofluoru White M2R

Vzorky trusu na podložních sklíčkách byly fixovány methanolem a ponechány zaschnout 2 minuty. Následovalo barvení 1% Calcofluorem White M2R v PBS (fosfátový pufr, pH 7,2–7,4) po dobu 10 minut. Poté byla sklíčka opláchnuta v PBS a dobarvena 0,5% Evansovou modří ve vodě po dobu 30 sekund. Podložní sklíčko bylo opět opláchnuto v PBS a ve tmě ponecháno zaschnout. Takto obarvené vzorky trusu byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení 1000× s olejovou imerzí při vlnové délce 490 nm. Obarvené spory mikrosporidií mají oválný tvar a pod mikroskopem svítí jasně modrobíle.

3.9.3. Izolace DNA z trusu

Do mikrozkušavky se 180–200 mg trusu byly přidány skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA), byl připipetován 1 ml pufru ASL a takto připravené vzorky byly rozbíjeny pomocí beadbeateru (FastPrep[®] -24, M.P. Biomedicals, CA, USA) po 1 minutu při rychlosti 5,5 rpm. Dále bylo postupováno podle návodu výrobce komerčně dodávaného izolačního kitu QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), který je určen pro čištění a izolaci DNA ze vzorků trusu pro následnou detekci patogenů. Součástí kitu, kromě výše zmíněného ASL pufru, byly inhibiční tablety, AL pufr, promývací pufr AW1 a AW2, eluční pufr AE, proteináza K lyzující bílkoviny a QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

3.10. Sledování průběhu mikrosporidiezy u jednotlivých skupin myši na základě vyšetření vzorků orgánů

3.10.1. Odběr vzorků orgánů a tkání

V týdenních intervalech byly usmrcovány vždy 3 myši z každé sledované skupiny (BALB/c, SCID, BALB/c-léčba albendazolem, SCID-léčba albendazolem, BALB/c-reinfekce po léčbě albendazolem, BALB/c-reinfekce v chronické fázi, BALB/c-imunosuprese v akutní fázi infekce, BALB/c-imunosuprese po léčbě albendazolem a BALB/c-imunosuprese v chronické fázi). Jednotlivým myším byla odebrána krev z retroorbitálního sinu, moč, byl proveden výplach peritonea sterilním chlazeným PBS (2 ml) a byly odebrány vzorky jednotlivých orgánů (žaludek, duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon, slezina, játra, ledvina, močový měchýř, srdce, plíce a mozek). Aby se zabránilo kontaminaci vzorků, byla na každý orgán zvlášť použita jedna sada nástrojů, která byla předem vysterilněna autoklávováním při 125 °C a následně UV světlem o vlnové délce 254 nm (Uvilink CL 508, UVITEC, UK). Část z každého orgánu byla okamžitě fixována v 10% formaldehydu pro přípravu histologických preparátů. Další část orgánů byla použita pro izolaci DNA a následné stanovení přítomnosti či nepřítomnosti mikrosporidií ve tkáni. U imunosuprimovaných myši byla použita část sleziny k získání splenocytů a 75 µl krve odebírané z retroorbitálního sinu pro analýzu poměrů lymfocytů průtokovým cytometrem.

3.10.2. Příprava histologických preparátů

Vzorky výše uvedených tkání v 10% formaldehydu byly odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě. Po odvodnění byl alkohol v tkáních nahrazen xylenem. Po nasycení byl materiál přenesen do tekutého parafínu. Nakonec byly vzorky zality do přefiltrovaného parafínu a zhotoveny bločky. Z bloček byly nakrájeny na mikrotomu histologické řezy tenké 4–6 µm. Řezy byly přeneseny na podložní sklíčka. Před barvením byly řezy odparafínovány v xylenu a sestupnou alkoholovou řadou převedeny do vody. Připravené řezy byly barveny pomocí hematoxylin-eosinu a modifikací Gramova barvení (Brown and Brenn 1931). Nabarvené řezy byly zality do kanadského balzámu a prohlíženy světelným mikroskopem.

3.10.3. Barvení podle Brown-Brenna (modifikace Gramova barvení)

Samotnému barvení předcházela příprava jednotlivých roztoků:

- 1% krystalová violet: 1 g ve 100 ml destilované vody

- 5% hydrogenuhličitan sodný: 5 g ve 100 ml destilované vody
- Gramův jodový roztok: jód 1 g, jodid draselný 2 g, 300 ml destilované vody
- nasycený roztok bazického fuchsinu: 0,25 g fuchsinu ve 100 ml destilované vody
- pracovní roztok fuchsinu: nasycený roztok ředěný vodou 1:1000
- 0,1% roztok kyseliny pikrové: 0,1 g kyseliny pikrové ve 100 ml acetonu

Na odparafinované řezy byl nanesen 1 ml krystalické violeti a 50 μ l hydrogenuhličitanu po dobu 1 minuty. Poté byla sklíčka opláchnuta vodou a ponořena do roztoku jódu na 1 minutu. Podložní sklíčka byla opět opláchnuta vodou a odbarvena v roztoku aceton-éter 1:1, dokud nebyla odmyta modrá barva. Následovalo dobarvení roztokem fuchsinu (1 minutu). Po opětovném oplachu vodou byla sklíčka ponořena do roztoku kyseliny pikrové, dokud nebyly řezy odbarveny do žlutavě růžova. Poté byla sklíčka opláchnuta v acetonu a ve směsi aceton-xylen 1:1. V poslední fázi byly řezy projasněny oplachem ve třech lázních xyleny. Obarvené vzorky byly zakápnuty kanadským balzámem a ihned na ně bylo přiloženo krycí sklíčko.

Výsledné zbarvení preparátu je následovné: mikrosporidie tmavofialově, grampozitivní bakterie modře, gramnegativní bakterie červeně, jádra buněk červeně a ostatní tkáňové komponenty žlutě. Vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem pod olejovou imerzí při zvětšení 1000 \times .

3.10.4. Barvení hematoxylin-eosinem

Před samotným barvením byly nejprve připraveny následující roztoky:

- eosin: 0,5 g eosin + 250 ml deionizované H₂O + 10 ml kyseliny octové
- hematoxylin: 0,5 g hematoxylinu + 500 ml deionizované H₂O + 25 g síranu hlinito-amonného + 0,1 g jodičnanu sodného + 20 ml kyseliny octové

Odparafinované řezy na podložních sklíčkách byly ponořeny do hematoxylinu po dobu 10 minut. Poté byly 10 minut oplachovány pod tekoucí vodou. Následovalo dobarvení v eosinu (5 minut), opláchnutí vodou a odvodnění řezů pomocí vzestupné alkoholové řady: 70% ethanol – 80% ethanol – 96% ethanol – karboxylen – xylen – xylen – xylen. Nakonec byly řezy zakápnuty kanadským balzámem a překryty krycím sklíčkem.

Výsledek barvení: Hematoxylin barví jádra buněk a cytoplazmu, eosin barví mezibuněčnou hmotu. Jádra a bazofilní struktury jsou tedy modré, ostatní části preparátu odstínovaně červené. Vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem při zvětšení 1000× s použitím olejové imerze.

3.10.5. Izolace DNA z tkání

Do mikroskopické zkumavky byl nastříhán vzorek tkáně o velikosti 0,5 cm³, byly přidány skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) a 2–3 zirkoniové kuličky o velikosti 2 mm (Invitek, Germany). Bylo připipetováno 180 µl ATL Buffer (Tissue Lysis Buffer; QIAGEN) a takto připravená tkáň byla rozbíjena v beadbeateru (FastPrep[®]-24, M.P. Biomedicals, CA, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 rpm. Dále bylo postupováno podle návodu výrobce komerčně dodávaného izolačního kitu QIAamp[®] DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), který je určen pro čištění a izolaci DNA ze vzorků živočišných tkání a buněk, kvasinek a bakterií. Součástí kitu, kromě výše zmíněného ATL pufru, byly AL pufr, promývací pufr AW1 a AW2, eluční pufr AE, proteináza K lyzující bílkoviny a QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

3.10.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Celkový objem reakční směsi (Tabulka II) pro každou PCR byl 25 µl a součástí každé PCR reakce byla také pozitivní a negativní kontrola. Taq polymeráza byla vždy přidávána jako poslední.

Použité roztoky:

- 10× koncentrovaný kompletní pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, 15 mM MgCl₂)
- Taq purple DNA polymeráza (Top-Bio, 1 U/µl)
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP's; Top-Bio, 10 mM roztok - 2,5 mM každé báze)
- BSA (Sigma, 10 mg/ml)
- MgCl₂ (Top-Bio, 25 mM)
- Primery (Generi Biotech, 10 pmol/µl)

Primární PCR M2F 5'– CGG AGA GGA AGC CTT AGA GA – 3'
M2R 5'– ATA GTG ACG GGC GGT GTG T – 3'

Sekundární PCR MFNest 5'– GAG AGA TGG CTA CTA CGT CCA AGG – 3'
MSP1R 5'– ACA GGG ACM CAT TCA – 3'

Tabulka II: Reakční směs pro PCR (pro 1 reakci)

Použitý roztok	Primární PCR	Sekundární PCR
deionizovaná H ₂ O	12,87 µl	15,87 µl
pufr	2,50 µl	2,50 µl
MgCl ₂	1,50 µl	1,50 µl
dNTP's	0,50 µl	0,50 µl
primer 5'	0,50 µl	0,50 µl
primer 3'	0,50 µl	0,50 µl
BSA	1,00 µl	–
Taq polymeráza	0,63 µl	0,63 µl
templátová DNA/PCR produkt	5,00 µl	2,00 µl
celkem	25,00 µl	25,00 µl

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA vyizolovaná z tkáňové kultury Vero E6 s *E. cuniculi* v koncentraci 8×10^7 spor na 1 ml.

Amplifikační program pro termocykler (Little Genius, BIOER) byl následující - počáteční denaturace při 94 °C po dobu 3 min, denaturace při 94 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při 58 °C po dobu 45 s, syntéza nového řetězce při 72 °C trvající 1 min, vše ve 35 cyklech, a dosyntetizování nového řetězce při 72 °C po dobu 7 min.

3.10.7. Gelová elektroforéza

Délka DNA fragmentů byla ověřována gelovou elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu obarveným ethidium bromidem (Sigma) při 70 V (EC300XL, Thermo Scientific) po dobu 60 minut. Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Electronic UV transilluminator, Ultra-Lum, Inc.) při vlnové délce 312 nm. Jako DNA marker byl použit 100 bp DNA ladder (Fermentas).

3.10.8. Analýza průtokovým cytometrem

3.10.8.1. Izolace splenocytů

Sleziny odebrané z usmrcených myší byly zpracovány dle následujícího postupu;

Použité roztoky a chemikálie:

- RPMI-1640 (RPMI základ)
- RPMI obsahující 10% BOFES (10% RPMI)
- PBS s 0,2% želatiou a 0,01% azidem sodným (flow roztok)
- Trypanová modř

Slezina byla protlačena přes sterilní sítko pomocí pístu stříkačky. Vzniklá suspenze byla naředěna v RPMI základ a centrifugována 10 min při 150 g a 4 °C. Sediment byl resuspendován v RPMI základ a opět centrifugován 10 minut při 150 g a 4 °C. Tento postup byl zopakován ještě dvakrát. Poté byl pelet naředěn pomocí 10% RPMI na 1 ml. 10 µl z této suspenze bylo smícháno s 500 µl trypanové modři a 500 µl 10% RPMI a v Bürkerově komůrce byly spočítány splenocyty (mikroskop Olympus BX 51, zvětšení 40×).

3.10.8.2. Izolace lymfocytů z krve

Použité roztoky a chemikálie:

- 0,84% NH₄Cl
- PBS s 0,2% želatinou a 0,01% azidem sodným (flow roztok)
- 5 µM EDTA v PBS

75 µl krve odebrané z retroorbitálního sinu myši bylo přidáno do zkumavky s 1 ml 5 µM EDTA. Červené krvinky byly zlyzovány přidáním 3,5 ml 0,84% NH₄Cl. Zkumavky byly protřepávány 3 minuty ve vodní lázni při 37 °C. Lyzování bylo zastaveno přidáním 3,5 ml flow roztoku. Následovala centrifugace 10 minut při 150 g a 4 °C. Pelet byl rozmíchán v nadbytku flow roztoku a opět centrifugován 10 minut při 150 g a 4 °C.

3.10.8.3. Průtoková cytometrie

Do jamek 96-jamkového panelu s dnem tvaru U bylo napipetováno 200 µl PBS s azidem a želatinou a přidáno $0,5 \times 10^6$ splenocytů. Pelet krve byl naředěn na 200 µl pomocí flow roztoku a přenesen do jamek panelu. Poté byl panel centrifugován při 580 g 2 min a obsah jamek vyklepnut. Na mokrý pelet buněk bylo přidáno 10 µl flow roztoku s naředěnými protilátkami (Tabulka III). Zároveň byla od každého vzorku sleziny a krve provedena negativní kontrola. Následovala inkubace 20 minut ve tmě při 4 °C. Poté bylo do každé jamky přidáno 150 µl flow roztoku, destička byla

centrifugována 2 min při 580 g a vysušena. Tento postup byl ještě jednou zopakován. Nakonec bylo přidáno 150 µl flow roztoku a následovalo měření na BD FACSCantoII flow cytometru (BD Biosciences, USA) vybaveného dvěma lasery s excitačními vlnovými délkami 488 a 633 nm. Nabarvená populace buněk byla analyzována pomocí softwaru DIVA.

Tabulka III: Použité monoklonální myší protilátky

Protilátka	Fluorescenční značení	Výrobce
anti-CD45 MAb	PerCP-Cy5,5	BD Biosciences
anti-CD3 MAb	FITC	BD Biosciences
anti-CD4 MAb	AlexaFluor 700	BD Biosciences
anti-CD8 MAb	Pe-Cy7	BD Biosciences
anti-CD19 MAb	APC-H7	BD Biosciences

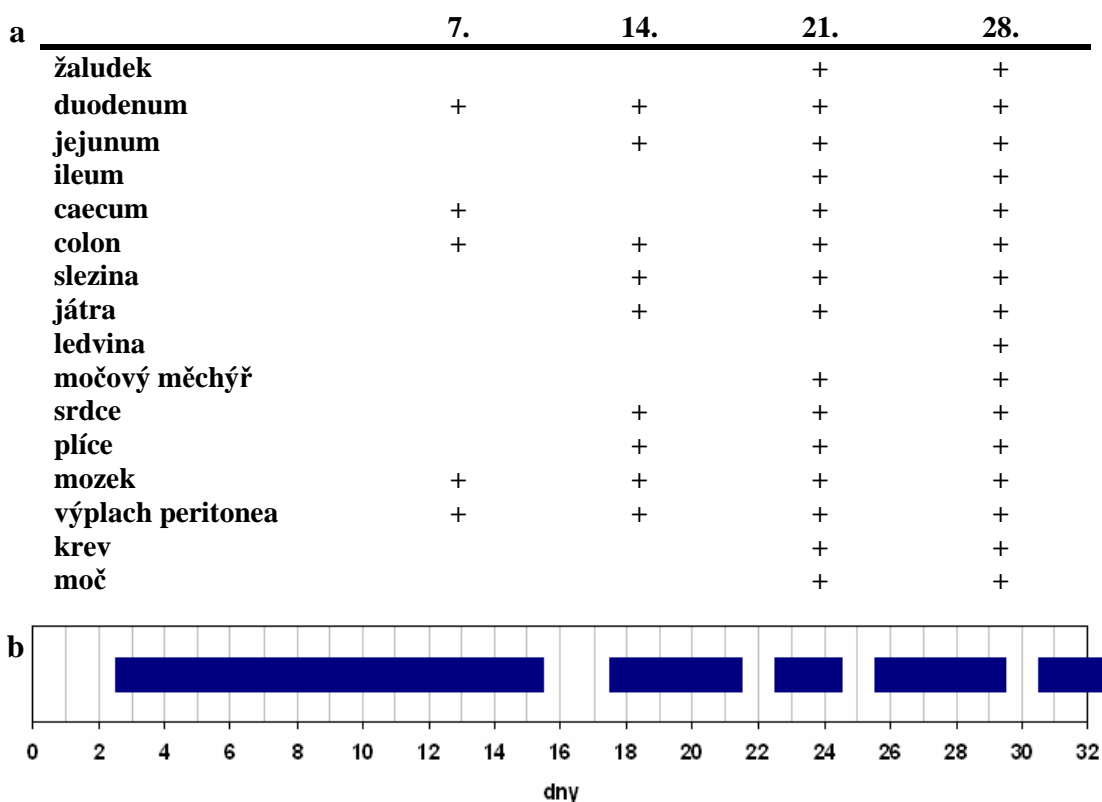
4. VÝSLEDKY

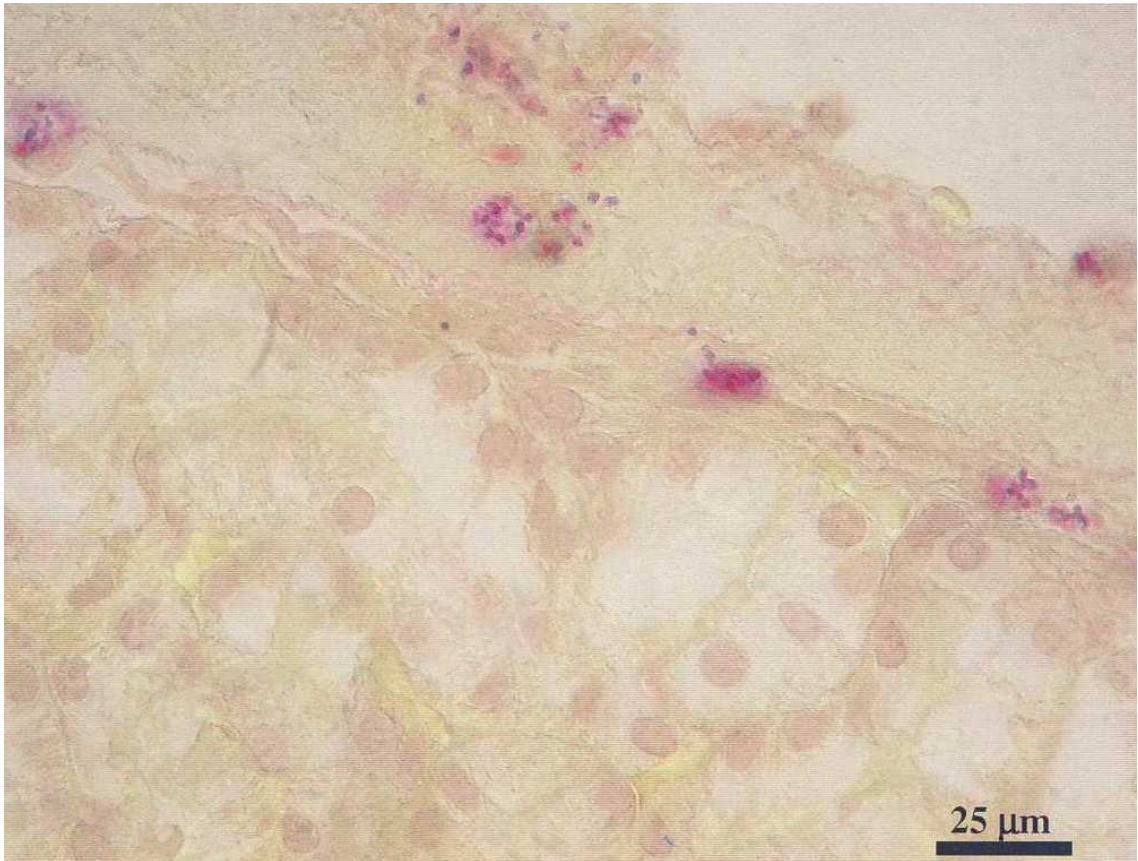
4.1. Stanovení průběhu mikrosporidiózy u SCID myši

U 15 SCID myši inokulovaných p.o. dávkou 1×10^7 spor *E. cuniculi* byl sledován průběh infekce způsobený mikrosporidii. V týdenních intervalech byly usmrceny a vypitvány 3 myši, jejichž orgány byly vyšetřeny na přítomnost parazita. Protože se jednalo o perorální infekci, první byly mikrosporidii napadeny buňky střeva a DNA mikrosporidií byla detekována také v trusu. Skrze stěnu střeva se mikrosporidie dostaly do dutiny břišní, kde byly zjištěny díky výplachu peritonea. Následující týdny byl pozorován nárůst počtu infikovaných orgánů. 28. den po infekci (DPI) byly myši v akutní fázi infekce, neboť DNA mikrosporidií byla prokázána ve všech orgánech a tkáních jak mikroskopicky (Obrázek 1) tak pomocí molekulárních metod (Tabulka IVa). Zbylé 3 myši uhynuly 32. DPI.

Metodou barvení pomocí Calcofluoru White nebyly v trusu žádné z myši detekovány spory mikrosporidií. Pomocí molekulárních metod byly mikrosporidie v trusu přítomny téměř nepřetržitě již od 4. dne od infekce až do 32. DPI, kdy došlo k úhynu posledních jedinců (Tabulka IVb).

Tabulka IV: Průběh mikrosporidiózy u SCID myši v orgánech (a) a trusu (b)





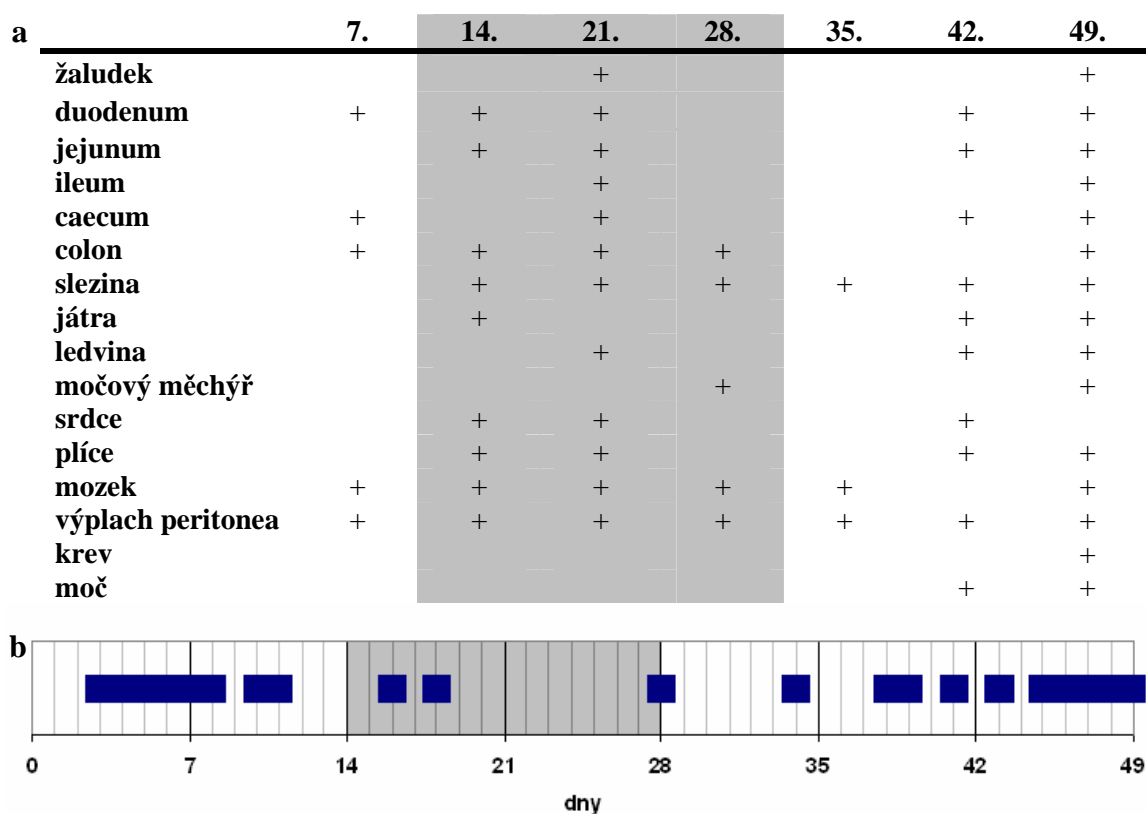
Obrázek 1: Ložiska se sporami *E. cuniculi* na povrchu ledvin SCID myši 28. DPI. Gramovo modifikovaný barvení.

4.2. Stanovení průběhu mikrosporidiózy u SCID myši léčených albendazolem 14. – 28. DPI

SCID myši p.o. inokulované dávkou 1×10^7 spor *E. cuniculi* a od 14. DPI léčené albendazolem vykazovaly pomalejší průběh mikrosporidiózy než myši neléčené. Ve druhém týdnu aplikace léku (tj. 21.–28. DPI) bylo zjištěno vymizení parazita z většiny orgánů. Tento trend byl pozorován ještě týden po ukončení léčby. Od 42. DPI byla zjištěna rekrudescence parazita, 49. DPI byla DNA mikrosporidií detekována ve všech orgánech a tkáních, kromě srdce (Tabulka Va). Během následujících tří dnů docházelo k postupnému úhynu zbylých SCID myší.

Během léčby albendazolem byly mikrosporidie nacházeny v trusu pouze sporadicky. Od 38. DPI (tj. 2. týden po ukončení léčby) byly vzorky trusu opět pozitivní na přítomnost mikrosporidií (Tabulka Vb).

Tabulka V: Průběh mikrosporidiózy v orgánech (a) a trusu (b) u SCID myši léčených albendazolem 14. – 28. DPI



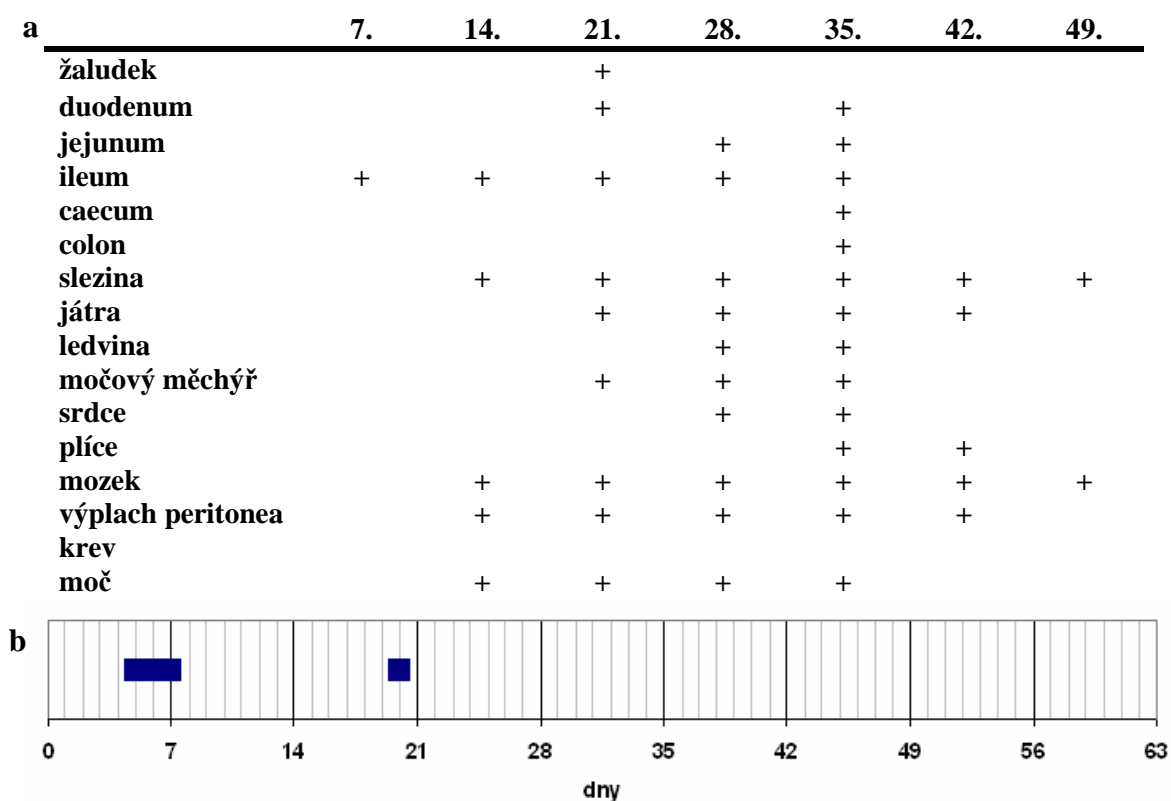
Léčba albendazolem SCID myši od 28. DPI byla bez účinku, neboť aplikace léku nezabránila jejich úhynu. Průměrná úmrtnost infikovaných SCID myši byla 32. DPI.

4.3. Stanovení průběhu mikrosporidiózy u BALB/c myši

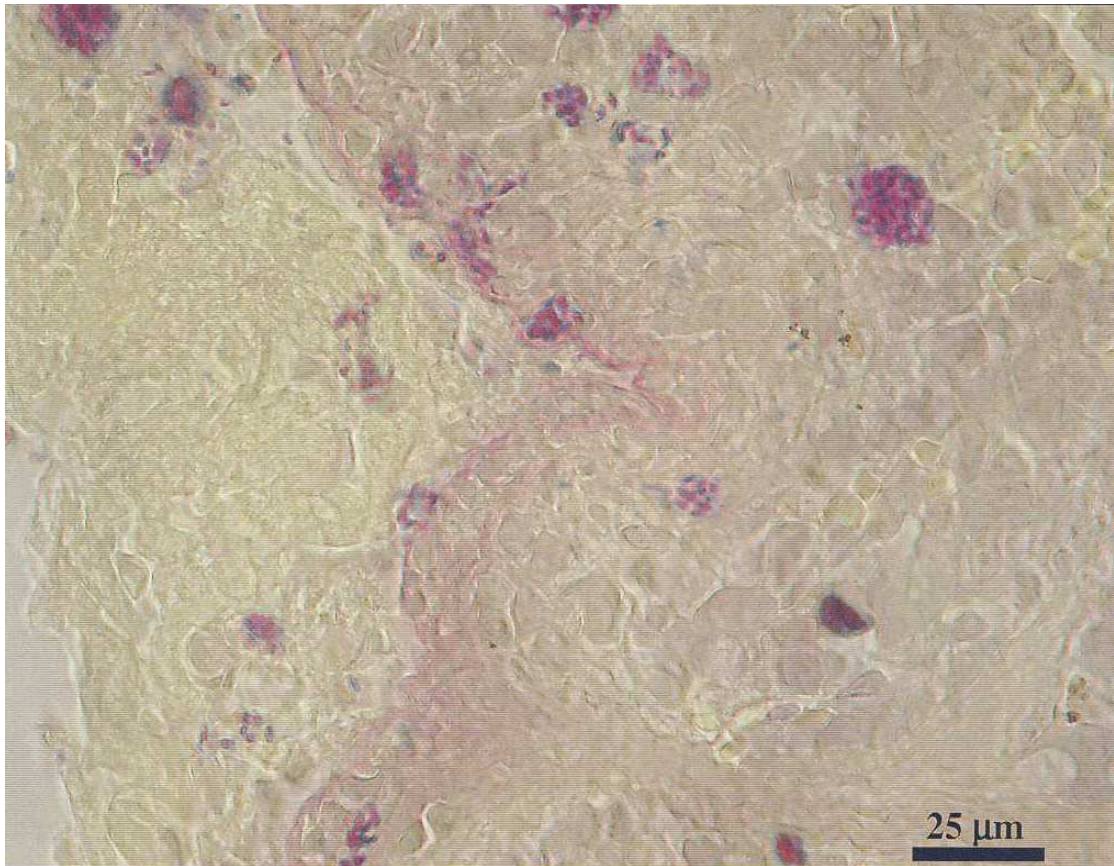
Týden po p.o. inokulaci sporami *E. cuniculi* byl parazit u BALB/c myši nalezen pouze v trusu. 14. DPI byla mikrosporidiální infekce detekována v části tenkého střeva (ileu), slezině, mozku, vzorku moči a výplachu peritonea. Následující týdny docházelo k rozšiřování mikrosporidií do dalších orgánů, přičemž vrchol infekce byl 35. DPI, kdy byla DNA mikrosporidií nalezena téměř ve všech orgánech kromě žaludku. Další týden (tj. 42. DPI) došlo k nápadné regresi infekce a v následujícím týdnu (49. DPI) byly mikrosporidie detekovány pouze ve slezině a mozku, a to jak mikroskopicky (Obrázek 2), tak pomocí molekulárních metod (Tabulka VIa.).

Vyšetřované vzorky trusu byly pozitivní pouze 5.–7. den po infekci. Ostatní dny, kromě 20. DPI, byly na mikrosporidie negativní (Tabulka VIb).

Tabulka VI: Průběh mikrosporidiózy u BALB/c myši v orgánech (a) a trusu (b)



Myši vyšetřené na přítomnost mikrosporidií v orgánech 91. den po infekci, byly pozitivní pouze ve vzorku sleziny. Vzorek trusu byl negativní.



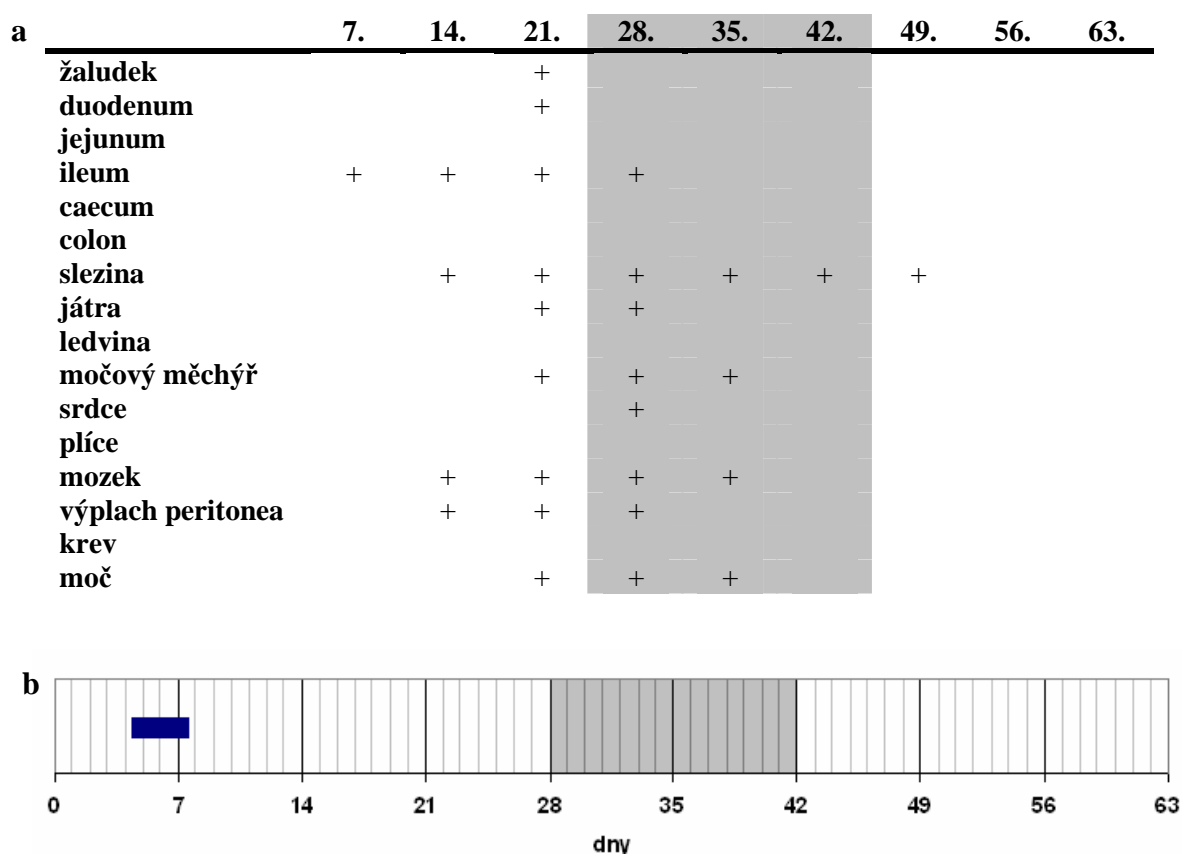
Obrázek 2: Mikrosporidiová infekce ve slezině p.o. infikované BALB/c myši, 35.DPI.
Gramovo modifikované barvení.

4.4. Stanovení průběhu mikrosporidiózy u BALB/c myši léčených albendazolem 28. – 42. DPI

Účinek albendazolu, jež byl podáván od 28. DPI do 42. DPI, byl markantní již po prvním týdnu aplikace. 35. DPI byly spory *E. cuniculi* detekovány pouze ve slezině, močovém měchýři, v mozku a moči. Ve slezině byly mikrosporidie prokázány ještě následující dva týdny (tj. 42. a 49. DPI), avšak byl to jediný orgán, ve kterém byly zjištěny. Následující týdny po 49. DPI byly všechny orgány i tkáně na mikrosporidie negativní (Tabulka VIIa).

Vzorky trusu vyšetřované na *E. cuniculi* byly pozitivní pouze 5.–7. DPI. V následujících dnech nebyly mikrosporidie v trusu zjištěny (Tabulka VIIb).

Tabulka VII: Průběh mikrosporidiózy v orgánech (a) a trusu (b) u BALB/c myši léčených albendazolem 28. – 42. DPI

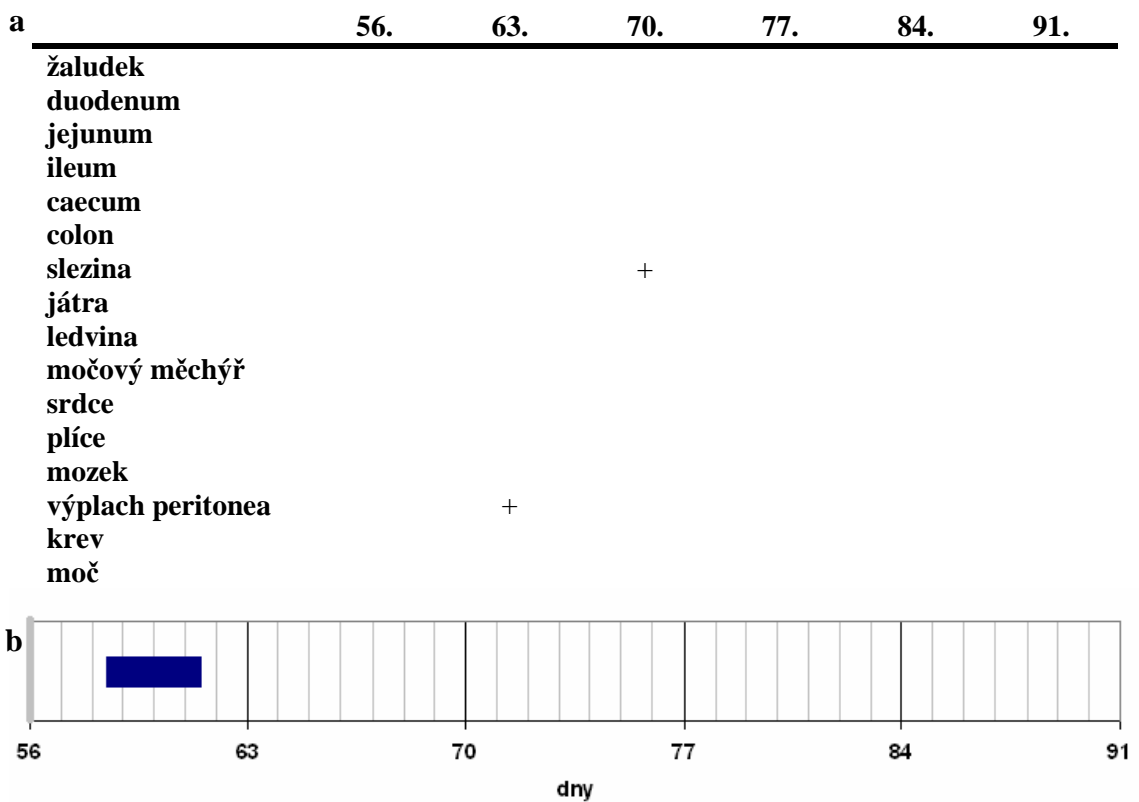


4.5. Stanovení průběhu mikrosporidiózy u BALB/c myši po léčbě albendazolem 28.– 42. DPI a následné reinfekci 56. DPI

Po prokázání nepřítomnosti spor ve všech orgánech a tkáních byla skupina BALB/c (Tabulka VII) perorálně reinfikována dávkou 1×10^7 spor *E. cuniculi*. Bylo sledováno opětovné proniknutí parazita do orgánů. Týden po reinfekci (63. DPI) byly mikrosporidie prokázány pouze ve výplachu peritonea a v týdnu následujícím (70. DPI) pouze ve slezině. V dalších týdnech nebyly mikrosporidie detekovány v žádném orgánu ani tkáni (Tabulka VIIIa).

Přítomnost mikrosporidií v trusu byla prokázána pouze ve 4.–6. dnu po reinfekci (tj. 59.–61. DPI). Ostatní dny byly na mikrosporidie negativní (Tabulka VIIIb).

Tabulka VIII: Průběh mikrosporidiózy v orgánech (a) a v trusu (b) u BALB/c myši po léčbě albendazolem a následné reinfekci 56. DPI

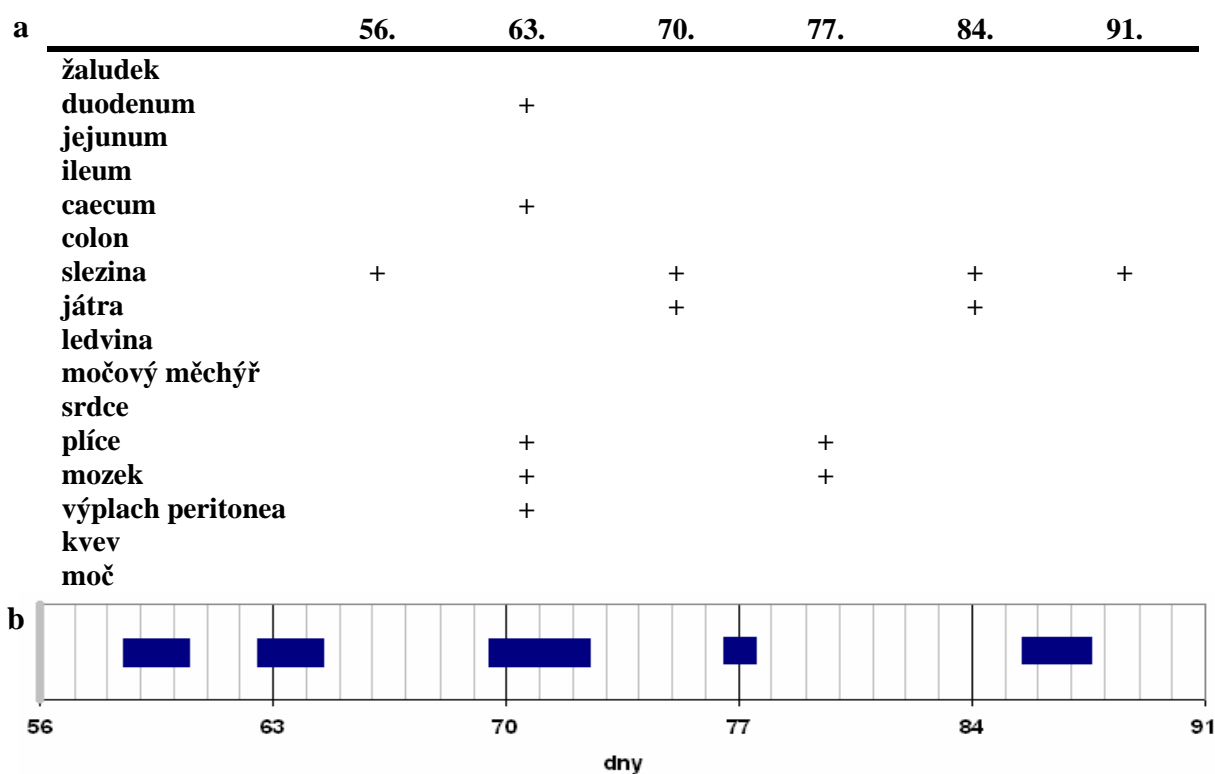


4.6. Stanovení průběhu mikrosporidiózy u BALB/c myši reinfikovaných 56. DPI v chronické fázi infekce

56. DPI byla skupina BALB/c myši (Tabulka VI) p.o. reinfikována dávkou 1×10^7 spor *E. cuniculi*. Po sedmi dnech od reinfekce (63. DPI) byla zjištěna přítomnost parazita v duodenu, céku, plicích, mozku, ve výplachu peritonea a v trusu. Následující týden (70. DPI) byly mikrosporidie detekovány ve slezině a játrech. Přítomnost mikrosporidií v trusu byla rovněž prokázána. 77. DPI byly opět zjištěny v plicích a mozku, 84. DPI ve slezině a v játrech (Tabulka IXa).

Vzorky trusu vyšetřené na přítomnost mikrosporidií byly v nepravidelných intervalech střídavě pozitivní a negativní (Tabulka IXb).

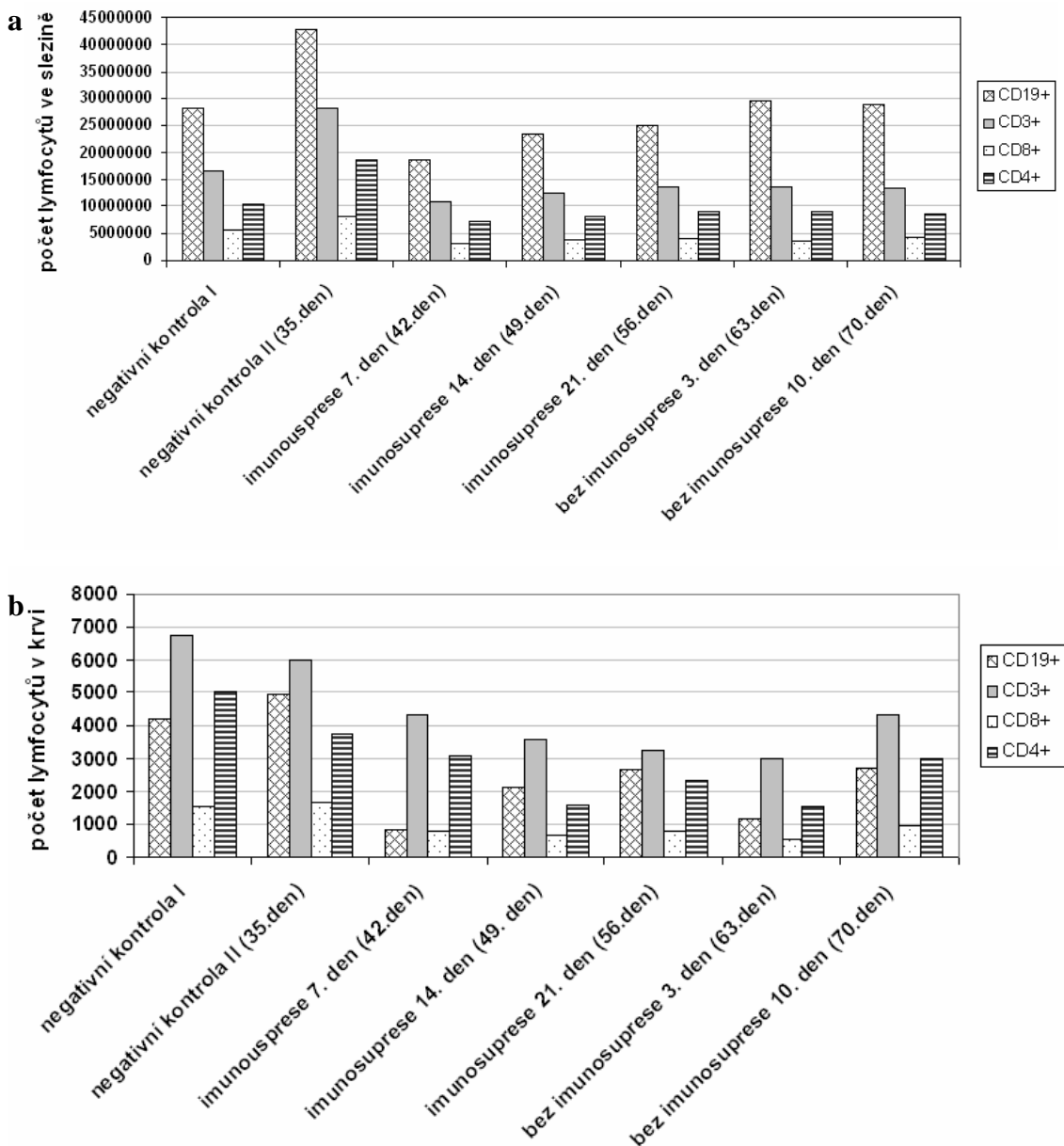
Tabulka IX: Průběh mikrosporidiózy v orgánech (a) a trusu (b) u BALB/c myši reinfikovaných 56. DPI v chronické fázi infekce



4.7. Stanovení průběhu mikrosporidiózy u BALB/c myši po imunosupresi 35.–60. DPI v akutní fázi infekce

Výrazný pokles počtu lymfocytů díky aplikaci imunosupresiv byl zaznamenán sedm dní po zahájení imunosuprese. U sleziny docházelo následující týdny k opětovnému nárůstu počtu lymfocytů (Graf 1a), v krvi však hladina lymfocytů nadále klesala (Graf 1b). Vzestup počtu lymfocytů v krvi byl zaznamenán až 10. den (70. DPI) po ukončení aplikace imunosupresiv. Jako negativní kontrola I byla použita myš bez infekce i bez použití imunosupresiv, jako negativní kontrola II myš infikovaná mikrosporidiiemi *E. cuniculi*.

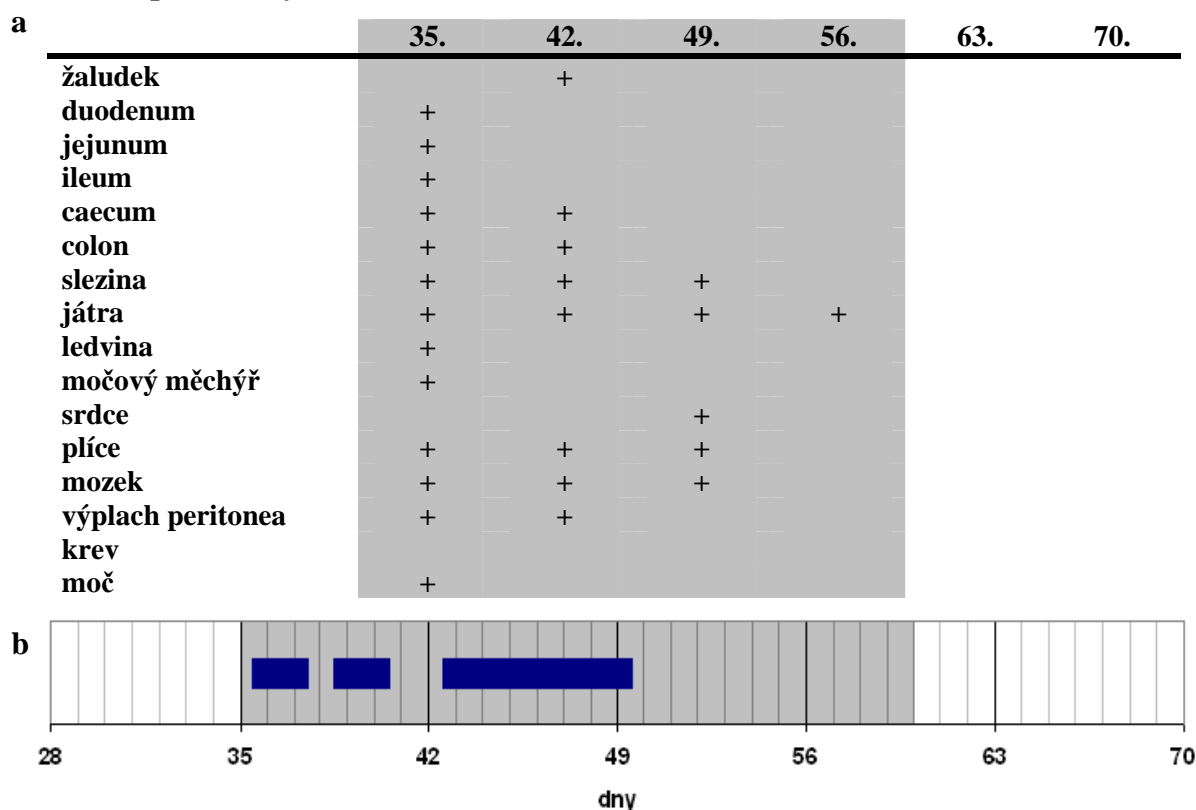
Graf 1: Počet lymfocytů ve slezině (a) a krvi (b) během imunosuprese BALB/c myši v akutní fázi mikrosporidiózy



U skupiny BALB/c myši, která byla v akutní fázi infekce, byly mikrosporidie zjištěny téměř ve všech orgánech kromě žaludku a srdce. Krev a trus byly na přítomnost mikrosporidií rovněž negativní. Na základě těchto výsledků byly skupině myši aplikovány imunosupresiva od 35. DPI. Následující týden (tj. 42. DPI) došlo k vymizení parazita ze všech částí tenkého střeva, ledvin a močového měchýře. Nebyl rovněž detekován ve vzorcích moči a trusu. Naproti tomu byl parazit nově zjištěn v žaludku. 49. DPI byly vzorky jater, sleziny, srdce, plic, mozku, moči a trusu pozitivní, 56. DPI byla zjištěna přítomnost parazita pouze v játrech. Analýza vzorků následujících dvou týdnů prokázala vymizení mikrosporidií ze všech orgánů a tkání (Tabulka Xa).

Vyšetřované vzorky trusu byly již den po zahájení imunosuprese (tj. 36. DPI) pozitivní na přítomnost mikrosporidií a to až do 49. DPI. Další dny nebyly mikrosporidie v trusu zjištěny (Tabulka Xb).

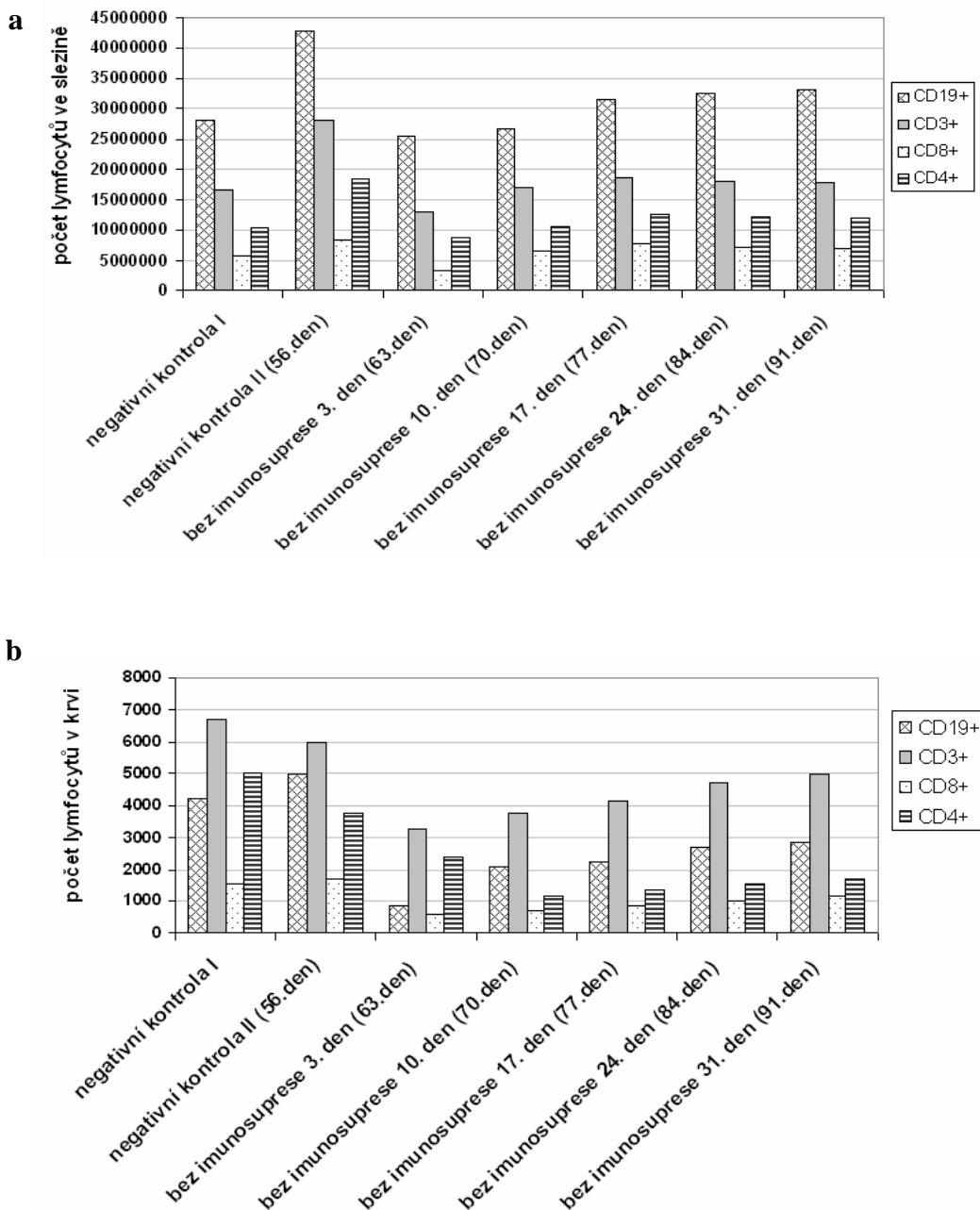
Tabulka X: Průběh mikrosporidiózy v orgánech (a) a trusu (b) u BALB/c myši imunosuprimovaných 35.–60. DPI v akutní fázi infekce



4.8. Stanovení průběhu mikrosporidiózy u BALB/c myši po léčbě albendazolem 28.–42. DPI a následné imunopresi 56.–60. DPI

Výrazný pokles počtu lymfocytů byl zaznamenán 63. DPI, což bylo 3. den od ukončení aplikace imunopresiv. Téměř stejná hladina lymfocytů byla zjištěna 70. DPI (10. den od ukončení aplikace imunopresiv). Následující týdny byl prokázán pozvolný nárůst počtu lymfocytů. Tento trend byl pozorován u lymfocytů obsažených jak ve slezině (Graf 2a), tak v krvi (Graf 2b). Ve slezině došlo k největšímu poklesu CD8 T lymfocytů, v krvi to byly B lymfocyty.

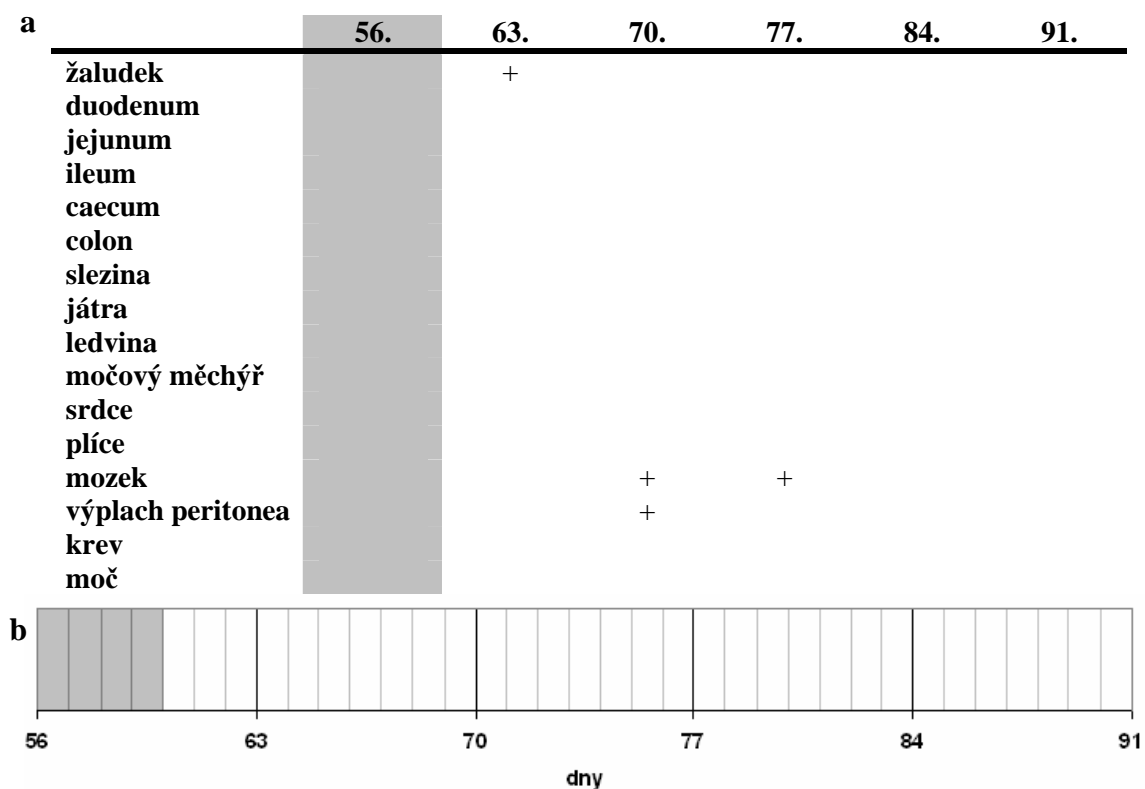
Graf 2.: Počet lymfocytů ve slezině (a) a krvi (b) během imunoprese BALB/c myši 56.–60. DPI po léčbě albendazolem 28.–42. DPI



Před aplikací imunosupresiv byla skupina BALB/c myši vyšetřena na přítomnost mikrosporidií ve všech orgánech a tkáních (Tabulka VII). Na základě negativních výsledků všech vyšetřovaných vzorků byla započata p.o. aplikace imunosupresiv po dobu 5 dní. 7 dní od zahájení imunosuprese (tj. 63. DPI) byly mikrosporidie zjištěny v žaludku, následující týden (70. DPI) v mozku a výplachu peritonea. V mozku byly mikrosporidie zjištěny ještě 77. DPI. Následující dva týdny nebyla zjištěna přítomnost mikrosporidií v žádném orgánu ani tkáni (Tabulka XIa).

Vzorky trusu byly během celé aplikace imunosupresiv i po jejím ukončení negativní (Tabulka XIb).

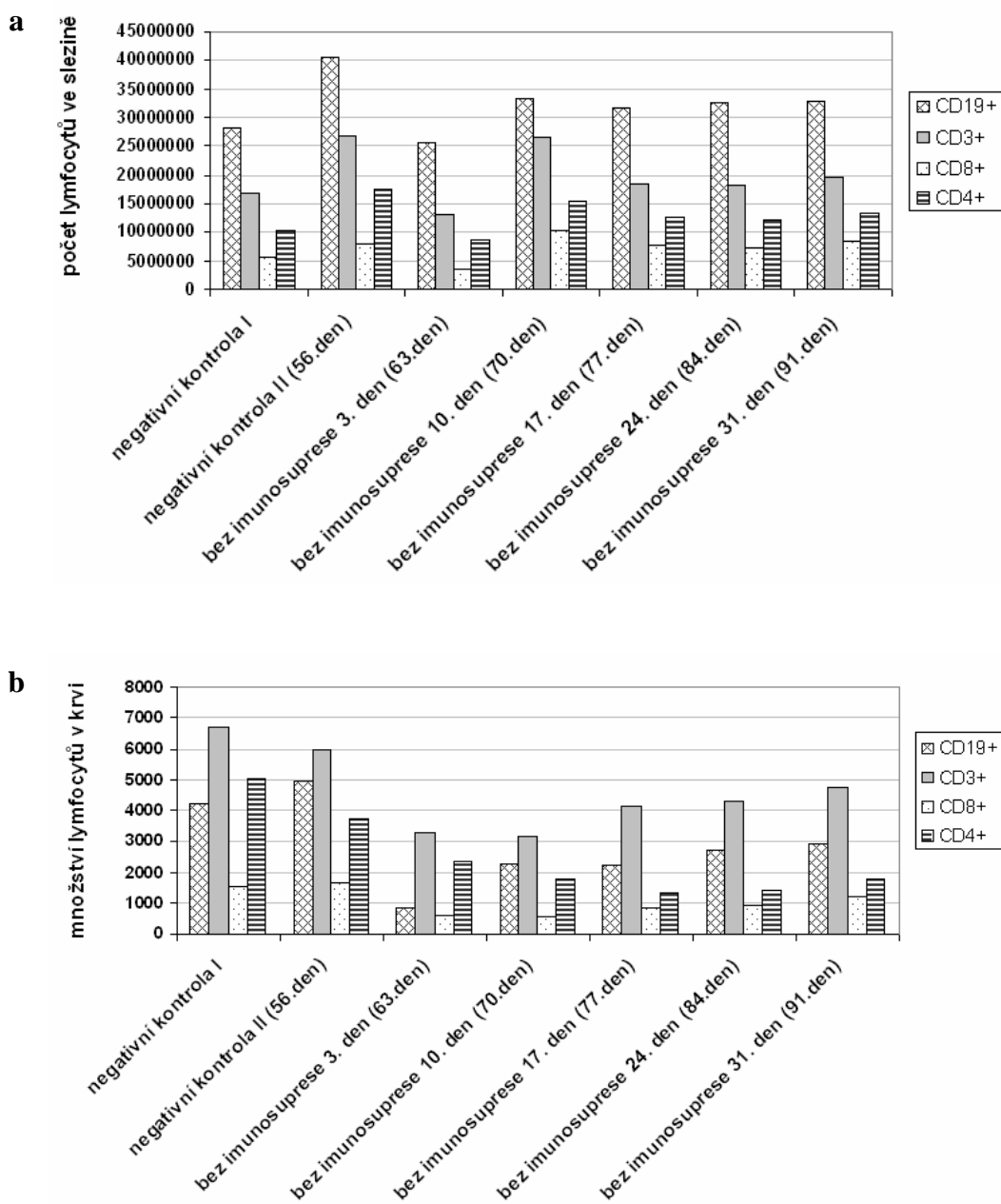
Tabulka XI: Průběh mikrosporidiózy v orgánech (a) a v trusu (b) u BALB/c myši imunosuprimovaných 56.–60. DPI po léčbě albendazolem



4.9. Stanovení průběhu mikrosporidiózy u BALB/c myši po aplikaci imunosupresiv 56.–60. DPI v chronické fázi

První týden po podání imunosupresiv (63. DPI) byl zaznamenán pokles počtu lymfocytů ve slezině. Následující týden (70. DPI) však došlo k jeho opětovnému nárůstu a jejich hladina byla více méně stejná i v dalších týdnech (Graf 3a). Snížená hladina počtu lymfocytů v krvi byla pozorována 3. a 10. den od ukončení aplikace imunosupresiv. Následující týdny bylo zaznamenáno zvýšení počtu lymfocytů a ustálení na přibližně stejné hladině (Graf 3b).

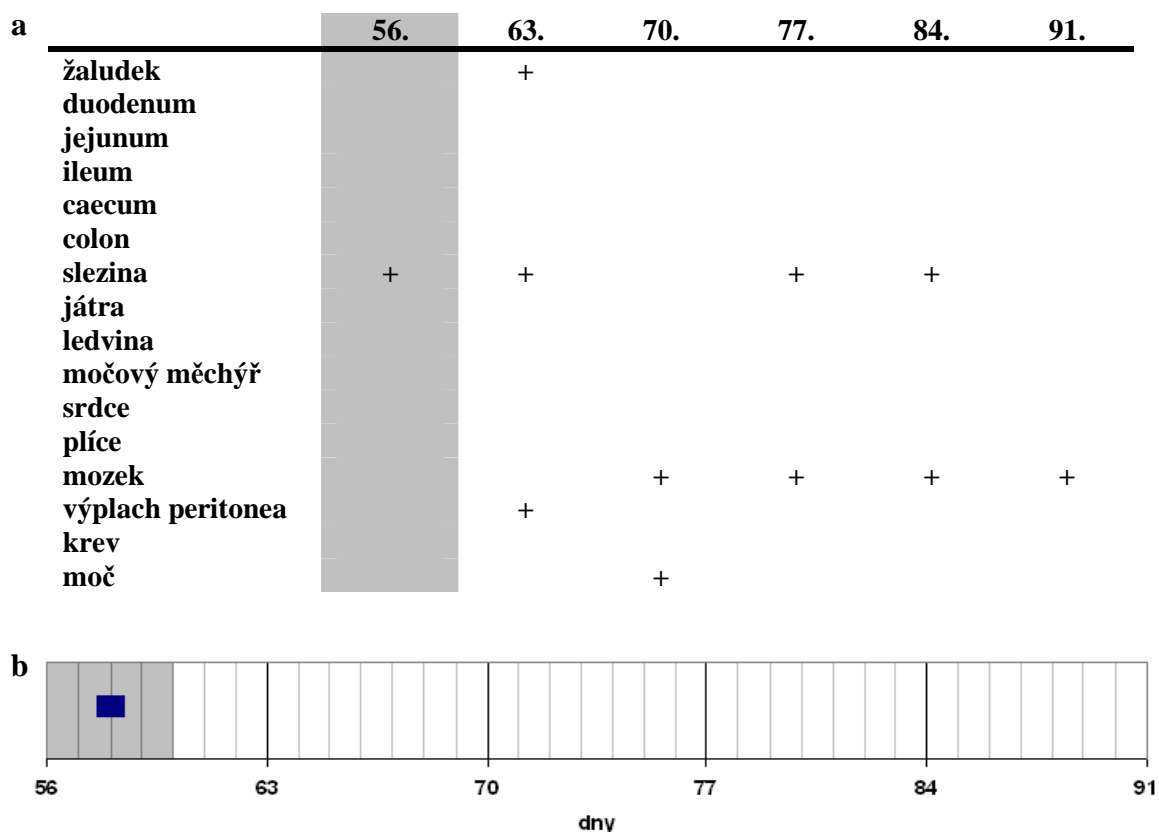
Graf 3: Počet lymfocytů ve slezině (a) a krvi (b) během imunosuprese BALB/c myši v chronické fázi mikrosporidiózy



U skupiny BALB/c myši, která byla v chronické fázi infekce, byly mikrosporidie přítomny pouze ve slezině. Trus byl na přítomnost mikrosporidií rovněž negativní. Na základě těchto výsledků byly skupině myši aplikovány imunosupresiva od 56.–60. DPI. Následující týden (tj. 63. DPI) byl parazit zjištěn ve vzorcích žaludku, sleziny a ve výplachu peritonea, týden poté v mozku a moči. Analýza vzorků orgánů následujících dvou týdnů prokázala přítomnost mikrosporidií pouze ve slezině a mozku (Tabulka XIIa).

Vzorky trusu byly pozitivní na přítomnost mikrosporidií pouze 3. den od zahájení imunosuprese (tj. 58. DPI). Další dny nebyly mikrosporidie v trusu zjištěny (Tab. XIIb).

Tabulka XII: Průběh mikrosporidiózy v orgánech (a) a trusu (b) u BALB/c myši po imunosupresi 56.–60. DPI v chronické fázi



5. DISKUSE

V posledních letech se o mikrosporidiích mluví jako o příčině oportunních infekcí především u pacientů s AIDS (Desportes-Livage 1996; Orenstein 1991). Před začátkem světové pandemie AIDS na počátku 80. let, byly mikrosporidiové infekce způsobené *E. cuniculi* běžně nacházeny u laboratorních zvířat (Shaddock and Orenstein 1993; Snowden and Shaddock 1999), avšak vzácně i u člověka. Ačkoli serologická data ukazovala 0–42% prevalenci, většina pozitivních jedinců byla nacházena mezi homosexuálními mužskými páry nebo u jedinců s další parazitární infekcí (Hollister and Canning 1987). Jak pandemie AIDS pokračovala, prevalence mikrosporidiových infekcí u HIV-pozitivních jedinců se zvýšila na 5–50 %. Dnešní nálezy mikrosporidiálních infekcí způsobené druhem *E. cuniculi*, jež jsou detekovány imunologickými či molekulárními metodami, jsou především u pacientů se sníženou imunitou (HIV-pozitivní jedinci, pacienti po orgánové transplantaci či pacienti s idiopatickou CD4+ T lymfocytopenií) (Mathis et al. 2005). V případě, že počet T lymfocytů v 1 μ l krve klesne pod 100, projevuje se mikrosporidióza jako akutní, často systémové onemocnění (Weber et al. 1994; Orenstein 1991). V posledních letech jsou mikrosporidie detekovány i u nezanedbatelné části imunokompetentních jedinců, u nichž je průběh infekce asymptomatický (Coyle et al. 1996, Sak et al. 2011, Samie et al. 2007), případně se u nich může vyvinout akutní střevní mikrosporidióza (Sandfort et al. 1994). Předpokládalo se, že u imunokompetentních osob nedochází k systémové mikrosporidióze. Jenže Ditrich a spol. (2011) nedávno popsali případ imunokompetentního pacienta s nálezem mozkového abscesu, který byl způsoben mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I.

Není reálné předpokládat, že lidé se infikují mikrosporidii pouze pokud dojde k poškození či potlačení imunitního systému. Jelikož spory mikrosporidií jsou všudypřítomné v prachu, ve vodě a na některých druzích potravin (Cotte et al. 1999, Thurston-Enriquez et al. 2002), pravděpodobnost infekce je relativně vysoká. Infekční spory mikrosporidií se do volného prostředí dostávají exkrementy – močí, výkaly a sputem infikovaných hostitelů. Nejčastějším způsobem přenosu infekce na člověka je inhalace a ingesce spor, kdy dojde k pozření kontaminované potravy nebo vody, nebo inhalaci kontaminovaného aerosolu (Bryan and Schwartz 1999; Deplazes et al. 2000). Bylo zjištěno, že velká část populace se během svého života s touto mikrosporidií

setkala, protože mnoho jedinců bez klinických projevů infekce bylo serologicky pozitivních (van Gool et al. 1997).

Jak ukazují epidemiologická data a jak bylo již výše zmíněno, především osoby s vážnou imunodeficiencí jsou ohroženou skupinou lidí pro rozvoj mikrosporidiálního onemocnění (Weber et al. 1994). Proto jako vhodný model pro sledování různých aspektů oportunních infekcí u zvířat i u člověka jsou imunodeficitní kmeny myši (např. SCID). Vhodnost použití těchto myši pro studium mikrosporidíózy charakterizovali Koudela a spol. (1993). SCID myši mají deficienci B a T lymfocytů, která je podmíněná dědičně a je pod kontrolou autosomálně recesivního genu, který je označován *scid*. U těchto myši dochází postupně k diseminaci mikrosporidií z místa infekce do okolních orgánů a tkání, přičemž rozšíření parazita v hostitelském organismu závisí na způsobu infekce (Koudela et al. 1993). SCID myši jsou vhodným modelem pro studium patogeneze, mechanismů rezistence, imunoterapie a případných chemoterapeutik s antimikrosporidiální aktivitou (Koudela et al. 1993).

Při infekci *E. cuniculi* je důležitá úloha makrofágů, které se významnou měrou podílí na imunitní odpovědi proti mikrosporidiím, a zároveň na rozšíření parazita uvnitř hostitelského organismu. Marková ve své práci zjistila, že fagocytóza spor v počátečních fázích interakce je méně výrazná u BALB/c myši než u SCID myši. Podle rozdílu v počtu živých-mrtvých spor usuzovala, že u imunokompetentních BALB/c myši existuje mechanismus, který umožňuje potlačit fagocytární schopnosti u makrofágů aktivně infikovaných mikrosporidiemi. Výrazně vyšší fagocytární aktivita makrofágů u SCID myši naznačuje absenci tohoto mechanismu (Marková 1997). Makrofágy SCID myši roznášejí velmi časně spory *E. cuniculi* do okolních tkání a jejich parazitární obsah se stává pro organismus fatálním. Toto tvrzení jsme potvrdili experimentem, který demonstroval rychlost šíření mikrosporidií ve SCID myši. Již po prvním týdnu p.o. inokulace parazita byl detekován nejen v buňkách střeva, ale i v mozkové tkáni. Během následujících tří týdnů došlo k diseminaci mikrosporidií do všech orgánů hostitele a následně k jeho úhynu. Infekce jater, sleziny, plic, srdce, ledvin, mozku a peritonea způsobila v těchto orgánech velké množství granulomatózních ložisek. Tyto detaily parazitární infekce bylo možné pozorovat díky nabarvení histologických řezů.

Pro léčbu mikrosporidiálních infekcí se používají deriváty benzimidazolu, především albendazol (Molina et al. 1995; Didier et al. 2005). Mechanismus jeho účinku spočívá v inhibici polymerace tubulinu v těle parazitů, což vede k rozvratu metabolismu a

následné smrti parazita. Aplikací tohoto léku BALB/c myším po dobu 14 dnů od 28. dne infekce jsme docílili eliminace parazita ze všech orgánů včetně sleziny. Podání léku SCID myším od 28. dne infekce bylo bez účinku, neboť 32. DPI uhynuly na systémové poškození způsobené mikrosporidiiemi. Na základě těchto výsledků byl jiné skupině SCID myši lék podáván již od 14. DPI. Výsledkem bylo vymizení parazita z mnoha orgánů. Avšak po ukončení léčby došlo k relapsu mikrosporidie a za tři týdny k úhynu myši. Tyto výsledky naznačují, že účinnost léčby albendazolem závisí na stupni rozvinutí infekce u imunodeficientního hostitele, ale i včasná aplikace nemusí vést k vyléčení.

Akutní fáze mikrosporidie u BALB/c myši byla prokázána 35. den po infekci, kdy téměř všechny orgány byly pozitivní na přítomnost parazita. Tento stav však nevedl ke smrti hostitele jako tomu bylo u SCID myši, nýbrž došlo k regresi infekce a vymizení parazita z mnoha orgánů již následující týden. Jediný orgán, ve kterém byly mikrosporidie nadále detekovány, a to i 91. den po infekci, byla slezina. Z toho usuzujeme, že slezina slouží jako potencionální rezervoár mikrosporidií, ve kterém mohou perzistovat, aniž by hostitele nějak vážně poškozovaly. Tento stav popsal Shaddock a spol. (1979) jako vyrovnaný vztah hostitele a parazita na základě přežívání hostitele a přetrvávání infekce parazita po dlouhou dobu. Pokud však z nějakého důvodu imunitní systém hostitele nedokáže udržet množení parazita pod kontrolou, dojde k rozvoji infekce, což má za následek poškození jater, ledvin, plic nebo mozku (Mathis et al. 2005; Canning and Lom 1986). V kontextu s tímto poznatkem jsme pomocí směsi imunosupresiv (cyklosporin A, takrolimus, mykofenolát mofetil) uměle vyvolali snížení imunity u třech skupin BALB/c myši, které byly v různých stupních parazitární infekce a sledovali jsme případné rozšíření mikrosporidií do dalších orgánů.

25-ti denní p.o. aplikace imunosupresiv (Uchida et al. 1999) u BALB/c myši v akutní fázi infekce zpočátku vyvolala snížení počtu lymfocytů ve slezině i v krvi. Zatímco hladina lymfocytů v krvi nadále klesala souběžně s pokračující imunosupresí, počet lymfocytů ve slezině se začal opět zvyšovat již druhý týden po zahájení aplikace imunosupresiv. Následující týdny byl pozorován nejenom vzestupný trend počtu lymfocytů ve slezině, ale také došlo k vymizení parazita ze všech orgánů. Domníváme se, že k vymizení mikrosporidií nedošlo díky imunitním mechanismům hostitele, nýbrž díky účinku imunosupresiv na populaci makrofágů, jimiž mikrosporidie nemohly být fagocytovány a roznášeny po těle hostitele, ale i na parazita samotného. Nicméně, ověření případného mikrosporidocidního účinku zmíněných imunosupresiv bude

zapotřebí ověřit experimenty *in vitro*. Na základě těchto výsledků jsme skupině BALB/c myši v chronické fázi a skupině BALB/c myši po léčbě albendazolem podávali imunopresiva pouze po dobu pěti dnů (Jegorov, ústní podání). Účinek imunopresiv byl patrný jak ve slezině, tak v krvi, ale pouze krátkodobě. U skupiny BALB/c myši léčených albendazolem došlo k nálezům mikrosporidií nejprve v žaludku, posléze i v peritoneu a mozku i přesto, že vyšetření všech orgánů a tkání na přítomnost parazita před podáním imunopresiv bylo negativní. Z toho vyplývá, jak již bylo zmíněno výše, že léčba albendazolem není stoprocentně účinná a že jisté množství mikrosporidií přežívá v orgánech, avšak ani citlivé molekulární metody mnohdy nedokážou takto malé množství parazita zachytit.

U skupiny BALB/c myši, u nichž byla v chronické fázi prokázána přítomnost mikrosporidií ve slezině, způsobila aplikace imunopresiv rozšíření parazita do dalších orgánů. Slezina zde posloužila jako zásobárna živých spor, které po narušení imunitního systému okamžitě diseminovaly do těla hostitele. Jak se hladina lymfocytů ve slezině a v krvi postupně dostávala do původního stavu, docházelo k opětovnému vymizení mikrosporidií z orgánů.

Jelikož potlačení imunitního systému pomocí trojkombinace výše zmíněných imunopresiv nepřineslo očekávaný účinek a bylo pouze krátkodobé, bylo by zajímavé experiment zopakovat s použitím jiného imunopresiva, například dexametazonu. Po provedení předpokusu bylo zjištěno, že imunopresivní účinek dexametazonu byl 40× vyšší než u trojkombinace cyklosporin A-tacrolimus-mykofenolát mofetil. Účinnější imunoprese byla patrná i u BALB/c myši imunoprimovaných od 62. DPI, kdy byly mikrosporidie 91. DPI detekovány ve slezině, játrech, močovém měchýři, srdci, plicích a výplachu peritonea.

Na základě poznatků o všudypřítomnosti mikrosporidií v životním prostředí a pravděpodobnosti opakované infekce mikrosporidii jsme navrhli pokus, kdy jsme skupinu BALB/c myši vyléčených albendazolem a skupinu BALB/c myši v chronické fázi infekce reinfikovali dávkou 1×10^7 spor. V případě myši léčených albendazolem byly mikrosporidie detekovány po reinfekci pouze v peritoneu a ve slezině. Následující týdny byly všechny vyšetřované orgány a tkáně na přítomnost mikrosporidií negativní. Vyšetřované vzorky trusu byly na přítomnost parazita pozitivní pouze 3. až 5. den po reinfekci, stejně jako u BALB/c myši, které byly parazitem infikovány poprvé.

Naproti tomu reinfekce BALB/c myši v chronické fázi způsobila rozšíření parazita do více orgánů a také vzorky trusu byly v nepravidelných intervalech střídavě pozitivní

a negativní na přítomnost mikrosporidií. Z toho vyplývá, že mikrosporidie je možné ze vzorku trusu detekovat pouze tehdy, setká-li se hostitel s parazitem více než jedenkrát. Také nepravidelné vylučování spor v trusu poukazuje na to, že je vždy potřeba provést opakovaná vyšetření stolice v rozmezí několika dnů. Dá se tedy předpokládat, že prevalence mikrosporidií u asymptomatických zdravých osob může být mnohem vyšší, než uvedli Sak a spol. (2011).

Všechna tato zjištění jasně ukazují, že mikrosporidie se běžně vyskytují u jedinců bez jakýchkoli klinických příznaků i přes plně funkční imunitní systém, což popírá dosavadní poznatky o imunitní odpovědi proti mikrosporidiovým infekcím. Přestože Khan a spol. (2001) zjistili, že obranná imunitní odpověď proti mikrosporidiím je závislá na přítomnosti cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů, jež jsou schopny zničit infikované buňky, a CD4⁺ T lymfocyty mohou hrát částečnou roli v případě perorální infekce pomocí produkce interferonu gama (IFN γ) (Sak et al. 2006; Salát et al. 2006), naše výsledky naznačují, že mikrosporidie *E.cuniculi* jsou schopny v dostatečném množství přežít v orgánech jedince bez klinických příznaků infekce a při porušení rovnováhy imunitního systému jsou schopny iniciovat rozšíření infekce do dalších orgánů, což při dramatickém snížení imunity může vést k rozvoji životohrožující mikrosporidiózy.

6. ZÁVĚRY

- Léčba albendazolem není stoprocentně účinná, neboť nedojde k úplné likvidaci mikrosporidií. Určité množství spor přežívá asymptomaticky v orgánech, a pokud dojde k narušení rovnováhy imunitního systému, mikrosporidie se mohou rozšířit po těle hostitele.
- Imunosuprese vyvolá částečné rozšíření parazita v těle hostitele. V korelaci s opětovným zvyšováním počtu lymfocytů ve slezině a v krvi, které nastane po ukončení aplikace imunosupresiv, dochází k eliminaci parazita v orgánech.
- Trojkombinace imunossupresiv cyklosporin A-tacrolimus-mykofenolát mofetil nejsou vhodné k navození dlouhodobého potlačení imunitního systému.
- Dojde-li k infekci mikrosporidii pouze jedenkrát, DNA parazita lze v trusu detekovat pouze na počátku infekce. Dojde-li však k opakovaným reinfekcím, je možné zachytit DNA mikrosporidií v trusu i následující dny po reinfekci a mikrosporidie napadají po reinfekci další orgány.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Akerstedt J (2002) An indirect ELISA for detection of *Encephalitozoon cuniculi* infection in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*). Acta Vet Scand 43:211-220

Asano K, Matsuo S, Okamoto K (1995) Generation of effector T cells in *Hymenolepis nana*-infected, FK-560-treated BALB/c mice. Immunol Lett 46:195-198

Beauvais B, Sarfati C, Challier S, Derouin F (1994) *In vitro* model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. Antimicrob Agents Chemother 38:2440-2448

Birthing K, Moore P, Hay P (1996) Microsporidia: a new sexually transmissible cause of urethritis. Genitourin Med 72:445

Bismanis JE (1970) Detection of latent murine nosematosis and growth of *Nosema cuniculi* in cell cultures. Can J Microbiol 16:237-242

Botha WS, van Dellen AF, Stewart CG (1979) Canine encephalitozoonosis in South Africa. J S Afr Vet Med Assoc 50:135-144

Brown JH, Brenn L (1931) A method for the differential a gram positive and gram negative bacteria in tissue sections. Bull Johns Hopkins Hosp 48:69

Bryan RT, Schwartz DA (1999) Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner M, Weiss LM (eds.) The microsporidia and microsporidiosis. ASM, Washington DC, pp 502-516

Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S (2002) Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. Appl Environ Microbiol 68:2595-2599

Cali A, Owen RL (1990) Intracellular development of *Enterocytozoon*, a unique microsporidian found in the intestine of AIDS patients. J Protozool 37:145-155

Cali A, Kotler DP, Orenstein JM (1993) *Septata intestinalis* n.g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. J Protozool 40:101-112

Canning EU, Lom J, Dyková I (1986) The microsporidia of vertebrates. Academic Press, Inc., New York

Canning EU, Hollister WS (1992) Human infections with microsporidia. Rev Med Microbiol 2:35-42

Canning EU (1993) Microsporidia. In Kreier JP and Baker JR (eds.) Parasitic protozoa, 2nd ed., vol. 6. Academic Press, Inc., New York, N.Y. pp 299-385

Carr A, Marriott D, Field A, Vasak E, Cooper DA (1998) Treatment of HIV-1-associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet* 351:256-261

Cavalier-Smith T (1983) A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. *In* Schenk HEA and Schwemmler WS (eds.), *Endocytobiology*, vol. 2. Walter de Gruyter & Co., Berlin, Germany, pp 1027-1034.

Conteas CN, Berlin OG, Speck CE, Pandhumas SS, Lariviere MJ, Fu C (1998) Modification of the clinical course of intestinal microsporidiosis in acquired immunodeficiency syndrome patients by immune status and anti-human immunodeficiency virus therapy. *Am J Trop Med Hyg* 58:555-558

Corcoran GD, Isaacson JR, Daniels C, Chiodini PL (1996) Urethritis associated with disseminated microsporidiosis: clinical response to albendazole. *Clin Infect Dis* 22:592-593

Corradi N, Haag KL, Pombert JF, Ebert D, Keeling PJ (2009) Draft genome sequence of the *Daphnia* pathogen *Octosporea bayeri*: insights into the gene content of a large microsporidian genome and a model for host-parasite interactions. *Genome Biol* 10:R106

Corradi N, Pombert JF, Farinelli L, Didier ES, Keeling PJ (2010) The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nat Commun* 1:77

Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, Gelas P, Persat F, Piens MA, Trepo C (1999) Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in person with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 180:2003-2008

Coyle CM, Wittner M, Kotler DP, Noyer C, Orenstein JM, Tanowitz HB, Weiss LH (1996) Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. *Clin Infect Dis* 23:1002-1006

Čisláková L, Literák I, Bálent P, Hipíková V, Levkutová M, Trávnicek M, Novotná A (2001) Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia) in angora goats - a potential risk of infection for breeders. *Ann Agric Environ Med* 8:289-291

Deplazes P, Mathis A, Weber R (2000) Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib Microbiol* 6:236-260

Desportes-Livage I (1996) Microsporidia and other opportunistic protozoa in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Microbiol Infect* 1:152-153

Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN, Stenson SM, Orenstein JM, Yee RW, Tio FO, Davis RM, Vossbrinck C, Millichamp N, Shadduck JA (1991) Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *Eukaryot Microbiol* 43:34-43

Didier ES, Vossbrinck CR, Baker MD, Rogers LB, Bertucci DC, Shadduck JA (1995) Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111:411-421

Didier ES, Snowden KF, Shadduck JA (1998) Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv Parasitol* 40:283-320

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

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

Diesenhouse MC, Wilson LA, Corrent GF, Visvesvara GS, Grossniklaus HE, Bryan RT (1993) Treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with tropical fumagillin. *Am J Ophthalmol* 115:293-298

Dieterich DT, Lew EA, Kotler DP, Poles MA, Orenstein JM (1994) Treatment with albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 169:178-183

Ditrich O, Cross MF, Jones J, Hensel J, Enriquez FJ (1997) Strategy of microsporidial evasion of macrophage killing. P. 19, in Abstracts of 2nd Workshop on Microsporidiosis and Cryptosporidiosis In Immunodeficient Patients. České Budějovice, Czech Republic, June 30 – July 3, 1997

Ditrich O, Chrdle A, Sak B, Chmelík V, Kubále J, Dyková I, Kváč M (2001) *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol in press*

Dong-Gyun Lim, In-Yi Joe, Youn-Hee Park, Sung-Ho Chang, Yu-Mee Wee, Duck-Jong Han, Song-Cheol Kim (2007) Effect of immunosuppressants on the

expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. *Transplant Immunology* 18:94-100

Fasshauer V, Gross U, Bohne W (2005) The parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. *Eukaryot Cell* 4:221-224

Fast NM, Keeling PJ (2001) Alpha and beta subunits of pyruvate dehydrogenase E1 from microsporidian *Nosema locustae*: mitochondrion-derived carbon metabolism in Microsporidia. *Mol Biochem Parasitol* 117:201-209

Field AS, Marriott DJ, Milliken ST, Brew BJ, Canning EU, Kench JG, Darveniza P, Harkness JL (1996) Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 34:2803-2811

Franzen C (2008) Microsporidia: A review of 150 years of research. *The Open Par J* 2:1-34

Franzen C, Müller A (1999) Cryptosporidia and microsporidia – waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:245-262

Friedberg DN, Ritterband DC (1999) Ocular microsporidiosis. *In: Wittner M, Weiss LM (eds.) The microsporidia and microsporidiosis.* ASM, Washington DC, pp 292-314

Gannon J (1980) The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab Anim* 14:189-192

Goetz M, Eichenlaub S, Pape GR, Hoffmann RM (2001) Chronic diarrhea as a result of intestinal microsporidiosis in a liver transplant recipient. *Transplantation* 71:334-337

Gumbo T, Hobbs RE, Carlyn C, Hall G, Isada CM (1999) Microsporidia infection in transplant patients. *Transplantation* 67:482-484

Guscetti F, Mathis A, Hatt JM, Deplazes P (2003) Overt fatal and chronic subclinical *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*Saguinus imperator*). *J Med Primatol* 32:111-119

Haque A, Hollister WS, Willcox A, Canning EU (1993) The antimicrosporidial activity of albendazole. *J Invertebr Pathol* 62:171-177

Hashimoto T, Sánchez LB, Shirakura T, Müller M, Hasegawa M (1998) Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6860-6865

Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, Canning EU, Embley TM (1997) A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol* 7:995-998

Hirt RP, Logsdon Jr. JM, Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM (1999) Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:580-585

Hollister WS, Canning EU (1987) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. *Parasitology* 94:209-219

Hollister WS, Canning EU, Willcox A (1991) Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitology* 102:33-43

Hughes TA, Gaber AO, Montgomery ChE (1991) Plasma distribution of cyclosporine with lipoproteins and *in vitro* transfer between very-low-density lipoproteins, low-density lipoproteins, and high-density lipoproteins. *Therapeutic Drug Monitoring* 13:289-295

Hutin YJ, Sombardier MN, Liguory O, Sarfati C, Derouin F, Modai J, Molina JM (1998) Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J Infect Dis* 178:904-907

Cheney SA, Lafranchi-Tristem NJ, Canning EU (2000) Phylogenetic relationships of *Pleistophora*-like microsporidia based on small subunit ribosomal DNA sequences and implications for the source of *Trachipleistophora hominis* infections. *J Eukaryot Microbiol* 47:280-287

Chupp GL, Alroy J, Adelman LS, Breen JC, Skolnik PR (1993) Myositis due to *Pleistophora* (Microsporidia) in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 16:15-21

Jedrzejewski S, Graczyk TK, Slodkiewicz-Kowalska A, Tamang L, Majewska AC (2007) Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Appl Environ Microbiol* 73:4071-4073

Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prenier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivarés CP (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414:450-453

- Katznelson H, Jamieson CA (1952)** Control of nosema disease of honeybees with fumagilin. *Science* 115:70-71
- Keeling PJ, McFadden GI (1998)** Origins of microsporidia. *Trends Microbiol* 6:19-23
- Keeling PJ, Fast NM (2002)** Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Ann Rev Microbiol* 56:93-116
- Keoghane EM, Weiss LM (1999)** The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. *In: Wittner M, Weiss LM (eds.) The microsporidia and microsporidiosis.* ASM, Washington DC, pp 196-224
- Khan IA, Moretto M, Weiss LM (2001)** Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect* 3:401-405
- Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H (1987)** FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot* 40:1249-1255
- Koudela B, Vítovec J, Kučerová Z, Ditrich O, Trávníček J (1993)** The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol (Praha)* 40:279-286
- Koudela B, Didier ES, Rogers LB, Modrý D, Kučerová S (1998)** Intestinal microsporidiosis in African skink *Mabuya perrotetii*. *Folia Parasitol (Praha)* 45:149-155
- Lange CE, Johnny S, Baker MD, Whitman DW, Solter LF (2009)** A new *Encephalitozoon* species (Microsporidia) isolated from the lubber grasshopper, *Romalea microptera* (Beauvois) (Orthoptera: *Romaleidae*). *J Parasitol* 95:976-986
- Larsson JIR (1999)** Identification of microsporidia. *Acta Protozool* 38:161-197
- Levaditi C, Nicolau S, Schoen R (1923)** Etiology of epizootic rabbit encephalitis in reports with experimental studies of encephalitis lethargica. *Encephalitozoon cuniculi (nov spec)*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 38:675-711
- Lopez-Velez R, Turrientes MC, Garron C, Montilla P, Navajas R, Fenoy S, del Aguila C (1999)** Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J Travel Med* 6:223-227
- MacDougall RJ, Tandy MW, Boreham RE, Stenzel DJ, O'Donoghue PJ (1993)** Incidental finding of a microsporidian parasite from an AIDS patient. *J Clin Microbiol* 31:436-439

MacInnes EF, Stewart CG (1991) The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. J S Afr Vet Assoc 62:51-54

Maňurová-Vancová M (2001) Parasitophorous vacuola of microsporidian species *Encephalitozoon intestinalis* and *Encephalitozoon cuniculi*. Master Thesis, in Czech. – 73 p., Faculty of Biological Sciences of the University of South Bohemia

Marková Petra (1997) Interakce myších peritoneálních makrofágů se sporami *Encephalitozoon cuniculi* *in vivo* a *in vitro*. Master Thesis, in Czech. 21 p., Faculty of Biological Sciences of the University of South Bohemia

Mathis A, Weber R, Deplazes P (2005) Zoonotic potential of the microsporidia. Clin Microbiol Rev 18:423-445

Matsubayashi H, Koike I, Mikata I, Takei H, Higiwara S (1959) A case of *Encephalitozoon*-like infection in man. Arch Pathol 67:181-187

Miao YM, Awad-El-Kariem FM, Franzen C, Ellis DS, Müller A, Counihan HM, Hayes PJ, Gazzard BG (2000) Eradication of cryptosporidia and microsporidia following successful antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndrom 25:124-129

Mohn SF, Nordstoga K, Dishington IW (1982) Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Clinical, serological and pathological examination of vixens after oral and intrauterine inoculation. Acta Vet Scand 23:490-502

Molina JM, Oksenhendler E, Beauvais B, Sarfati C, Jaccard A, Derouin F, Modai J (1995) Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. J Infect Dis 171:245-249

Molina JM, Goguel J, Sarfati C, Chastang C, Desportes-Livage I, Michiels JF, Maslo C, Katlama C, Cotte L, Leport C, Raffi F, Derouin F, Modai J (1997) potential efficacy of fumagillin in intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with HIV infection: results of a drug screening study. AIDS 11:1603-1610

Molina JM, Tourneur M, Sarfati C, Chevret S, de Gouvello A, Gobert JG, Balkan S, Derouin F (2002) Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. N Engl J Med 346:1963-1969

Mota P, Rauch CA, Edberg SC (2000) Microsporidia and Cyclospora: epidemiology and assessment of risk from the environment. *Crit Rev Microbiol* 26:69-90

Müller A, Bialek R, Kämper A, Fätkenheuer G, Salzberger B, Franzen C (2001) Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J Clin Microbiol* 39:1630-1632

Müller-Doblies UU, Herzog K, Tanner I, Mathis A, Deplazes P (2002) First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Vet Parasitol* 107:279-285

Nägeli KW (1857) Ueber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot Z* 15:760-761

Orenstein JM (1991) Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Parasitol* 77:843-64

Padalko E, Verbeken E, Matthys P, Aerts JL, De Clercq E, Neyts J (2003) Mycophenolate mofetil inhibits the development of Coxsackie B3-virus-induced myocarditis in mice. *BMC Microbiol* 3:25

Patterson-Kane JC, Caplazi P, Rurangirwa F, Tramontin RR, Wolfsdorf K (2003) *Encephalitozoon cuniculi* placentitis and abortion in a quarterhorse mare. *J Vet Diagn Invest* 15:57-59

Raynaud L, Delbae F, Broussolle V, Rabodonirina M, Girault V, Wallon M, Cozon G, Vivarés CP, Peyron F (1998) Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J Clin Microbiol* 36:37-40

Roehrl MH, Kang S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, Hogan P (2004) Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7554-7559

Rönnebäumer K, Gross U, Bohne W (2008) The nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. *Eukaryot Cell* 7:1001-1008

Rosberger DF, Serdarevic ON, Erlandson RA, Bryan RT, Schwartz DA, Visvesvara GS, Keenan PC (1993) Successful treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with tropical fumagillin in a patient with AIDS. *Cornae* 12:261-265

Sak B, Salát J, Horká H, Saková K, Ditrich O (2006) Antibodies enhance the protective effect of CD4+ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol Immunol* 28:95-99

Sak B, Brady D, Pelikánová M, Květoňová D, Rost M, Kostka M, Tolarová V, Hůzová Z, Kváč M (2011) Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 49:1064-1070

Salát J, Horká H, Sak B, Kopecký J (2006) Pure CD4⁺ T lymphocytes fail to protect perorally infected SCID mice from lethal microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol Res* 99:682-686

Samie A, Obi CL, Tzipori S, Weiss LM, Guerrant RL (2007) Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:547-554

Sandfort J, Hannemann A, Gelderblom H, Stark D, Owen RL, Ruf B (1994) *Enterocytozoon bieneusi* infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 19:514-516

Scanlon M, Shaw AP, Zhou CJ, Visvesvara GS, Leitch GJ (2000) Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle. *J Eukaryot Microbiol* 47:525-531

Shadduck JA (1969) *Nosema cuniculi*: *in vitro* isolation. *Science* 166:516-517

Shadduck JA, Bendele R, Robinson GR (1978) Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Vet Pathol* 15:449-460

Shadduck JA, Watson WT, Pakes SP, Cali A (1979) Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Parasitol* 65:123-129

Shadduck JA (1980) Effect of fumagillin on *in vitro* multiplication of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Protozool* 27:202-208

Shadduck JA, Greeley E (1989) Microsporidia and human infections. *Clin Microbiol Rev* 2:158-165

Shadduck JA, Orenstein JM (1993) Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch Pathol Lab Med* 117:1215-1219

Shadduck JA, Storts R, Adams LG (1996) Selected examples of emerging and reemerging infectious diseases in animals. *Am Soc Microbiol News* 62:586-588

Schmidt EC, Shadduck JA (1984) Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J Immunol* 133:2712-2719

Scholtyssek E, Piekarski G (1965) Electron microscopic studies on merozoites of *Eimeria* (*Eimeria perforans* and *E. stidae*) and *Toxoplasma gondii*. On the systematic position of *T. gondii*. *Z Parasitenkd* 26:91-115

Slíva J, Votava M, Farmakologie. Praha: Triton 2010, ČR

Snowden KF, Didier ES, Orenstein JM, Shadduck JA (1998) Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci* 48:589-592

Snowden KF, Logan K, Didier ES (1999) *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *J Infect Dis* 180:2086-2088

Snowden KF, Shadduck JA (1999) Microsporidia of higher vertebrates. *In* Wittner M, Weiss LM (eds.), *The Microsporidia and microsporidiosis*. ASM, Washington DC, pp. 393-419

Sprague V and Vávra J (1976) Biology of the microsporidia.. *In* Bulla Jr. LA and Cheng TC (eds.), *Comparative pathobiology*. vol. 1. Plenum Press, New York, pp. 1-370

Sprague V (1982) Microspora, *In* Parker SB (eds.), *Synopsis and classification of living organisms*. vol. 1. McGraw Hill, New York, pp. 589-594

Sprague V, Becnel JJ, Hazard EI (1992) Taxonomy of phylum Microspora. *Crit Rev Microbiol* 18:285-395

Thurston-Enriquez JA, Watt P, Dowd SE, Enriquez R, Pepper IL, Gerba CP (2002) Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crops production. *J Food Prot* 65:378-382

Trammer T, Dombrowski F, Doehring M, Maier WA, Seitz HM (1997) Opportunistic properties of *Nosema algerae* (Microspora), a mosquito parasite, in immunocompromised mice. *J Eukaryot Microbiol* 44:258-262

Uchida H, Kobayashi E, Ogino Y, Mizuta K, To H, Okabe R, Hashizume K, Fujimura A (1999) Chronopharmacology of tacrolimus in rats: toxicity and efficacy in a mouse-to-rat intestinal transplantant model and its pharmacokinetic profile. *Transplant Proc* 31:2751-2753

Undeen AH, Alger NE (1976) *Nosema algerae*: infection of the white mouse by a mosquito parasite. *Exp Parasitol* 40:86-88

Undeen AH, Van der Meer RK (1999) Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *J Invertebr Pathol* 73:294-302

van Gool T, Vetter JCM, Weinmayr B, van Dam A, Derouin F, Dankert J (1997) High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *J Infect Dis* 175:1020-1024

van Rensburg IB, Volkmann DH, Soley JT, Stewart CG (1991) *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. *J S Afr Vet Assoc* 62:130-132

Vávra J, Yachnis AT, Shadduck JA, Orenstein JM (1998) Microsporidia of the genus *Trachipleistophora* – causative agents of human microsporidiosis: description of *Trachipleistophora anthropophthera* n. sp. (Protozoa: Microsporidia). J Eukaryot Microbiol 45:273-283

Vávra J, Larsson JIR (1999) Structure of the microsporidia. In Wittner M, Weiss LM (eds.) American Society of Microbiology Press, Washington D.C., pp. 7-84

Voigt K, Kirk PM (2011) Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 90:41-57

Vossbrinck CR, Maddux JV, Friedman S, Debrunner-Vossbrinck BA, Woese CR (1987) Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. Nature (London) 326:411-414

Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL (1994) Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev 7:426-461

Weber R, Deplazes P, Schwartz D (2000) Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. Contrib Microbiol 6:166-192

Weidner E (1975) Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages. Parasitophorous vacuole growth and the absence of lysozomal fusion. Z Parasitenkd 47:1-9

Weidner E, Canning EU, Rutledge CR, Meek CL (1999) Mosquito (Diptera: *Culicidae*) host compatibility and vector competency for the human myositic parasite *Trachipleistophora hominis* (Phylum Microspora). J Med Entomol 36:522-525

Wright JH, Craighead EM (1922) Infectious motor paralysis in young rabbits. J Exp Med 36:135-140

Zeman DH and Baskin GB (1985) Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). Vet Pathol 22:24-31