

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Role zánětu v aktivaci latentní mikrosporidiózy
způsobené *Encephalitozoon cuniculi*
u imunokompetentních a imunodeficitních myší**

Diplomová práce

Bc. Klára Brdíčková

Školitel: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

Školitel specialista: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice 2019

Brdíčková K., (2019): Role zánětu v aktivaci latentní mikrosporidie způsobené *Encephalitozoon cuniculi* u imunokompetentních a imunodeficientních myší. [The role of the inflammation in activation of latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent and immunodeficient mice, Mgr. Thesis, in Czech] – 60 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice

Annotation

In this study was described the role of the inflammation in activation of latent microsporidiosis in immunocompetent BALB/c and MMF knock out mice and immunodeficient SCID mice and the correlation between inflammation induction and microsporidia occurrence. The number of spores in selected organs was located by using molecular and histology methods. Moreover, the occurrence of spores in faecal samples was monitored during the whole time of experiment.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové 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 mého 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 mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 11. 4. 2019

.....

Bc. Klára Brdíčková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D., za odborné vedení mé práce, cenné rady a trpělivost. Mé poděkování také patří školiteli specialistovi prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za podnětné konzultace a návrhy při zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie za ochotu, vstřícnost a vytvoření příjemného prostředí.

Mimořádné poděkování patří mé rodině a přátelům za podporu během celé doby studia.

Práce je součástí programu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v. v. i.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GAČR 17–12871S (řešitel RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.).

Obsah

Obsah	5
1. Úvod.....	7
2. Literární přehled.....	10
2.1. Mikrosporidie	10
2.2. Taxonomie.....	10
2.3. Morfologie a vývojový cyklus	11
2.4. Mikrosporidióza a klinické příznaky.....	13
2.5. <i>Encephalitozoon</i> spp.....	14
2.5.1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	15
2.6. Mechanizmy přenosu infekce.....	15
2.6.1. Přenos vodou.....	16
2.6.2. Přenos potravou.....	16
2.6.3. Další způsoby přenosu	17
2.7. Makrofágy	17
2.8. Zánět a mikrosporidie.....	18
2.9. Freundovo adjuvans	19
3. Cíle práce	20
4. Materiál a metodika.....	21
4.1. Paraziti.....	21
4.2. Pokusná zvířata.....	21
4.3. Infekce myši	22
4.4. Design pokusů	22
4.5. Odběr vzorků trusu.....	23
4.6. Odběr vzorků orgánů a tkání	23
4.7. Příprava histologických preparátů.....	24
4.8. Barvení podle Brown-Brenna (modifikace Grammova barvení).....	24
4.9. Barvení hematoxylin-eosinem.....	25
4.10. Izolace DNA z trusu	25
4.11. Izolace DNA z tkání	26
4.12. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	26
4.13. Gelová elektroforéza.....	27
4.14. Kvantitativní real time PCR (qRT PCR).....	28
4.15. Statistické vyhodnocení výsledků.....	30

5.	Výsledky	31
5.1.	Přítomnost spor <i>E. cuniculi</i> v tkáních BALB/c myši v akutní fázi infekce	31
5.2.	Přítomnost specifické DNA <i>E. cuniculi</i> v trusu u BALB/c myši v akutní fázi infekce	33
5.3.	Přítomnost spor <i>E. cuniculi</i> v tkáních BALB/c myši v chronické fázi infekce	34
5.4.	Přítomnost specifické DNA <i>E. cuniculi</i> v trusu u BALB/c myši v chronické fázi infekce	36
5.5.	Přítomnost spor <i>E. cuniculi</i> v tkáních MMF KO myši v akutní fázi infekce 36	
5.6.	Přítomnost specifické DNA <i>E. cuniculi</i> v trusu u MMF KO myši v akutní fázi infekce	38
5.7.	Přítomnost spor <i>E. cuniculi</i> v tkáních SCID myši v akutní fázi infekce	39
5.8.	Přítomnost specifické DNA <i>E. cuniculi</i> v trusu u SCID myši v akutní fázi infekce	42
6.	Diskuze	43
7.	Závěry	49
8.	Literatura	50

1. Úvod

Mikrosporidie jsou řazeny k jednomu z neúčinnějších a nejvyvinutějších parazitů ve smyslu produkce jedinečných spor, které se řadí mezi jedny z nejsložitějších jednobuněčných struktur známých ve světě biologie. U imunokompetentních savčích hostitelů jsou mikrosporidie schopny vytvářet typický rovnovážný stav mezi hostitelem a parazitem, často s minimálními klinickými příznaky (Didier et al. 2000, Shaddock et Orenstein 1993, Vávra et Lukeš 2013).

Patnáct druhů mikrosporidií se vyznačuje schopností infikovat lidi a druhy z rodu *Encephalitozoon* mají největší klinický význam. *Encephalitozoon cuniculi* patří k nejlépe prostudovaným druhům mikrosporidií a jsou známy čtyři hostitelsky nepříliš specifické genotypy (I – králičí kmen, II – myší kmen, III – psí kmen a IV – lidský kmen), které jsou determinovány na základě počtu krátkých opakování v ribozomální internal transcribed spacer (ITS) oblasti (Didier et Khan 2014, Talabani et al. 2010).

Druhy rodu *Encephalitozoon* infikují různé typy savčích buněk včetně epiteliálních a endotelových buněk, fibroblastů, makrofágů a astrocytů (Didier et al. 2004). U hostitelů jsou schopny dle místa lokalizace vyvolat různá onemocnění včetně encefalitidy, oční infekce, sinusitidy, myositidy. Často se jedná o systémové diseminované infekce (Keohane et Weiss 1999, Weber et al. 1994, Weber et Bryan 1994). U imunosuprimovaných osob v důsledku chemoterapie a imunomodulační léčby a příjemců orgánů a kostní dřeně jsou mikrosporidie velmi významným faktorem pro rozvoj onemocnění. Infekce těmito parazity se však vyskytuje i u imunokompetentních jedinců (Sak et al. 2011a, b).

Průběh infekce v závislosti na imunologickém stavu hostitele byl demonstrován na myších hostitelských modelech (Kotková et al. 2013, 2018, Moretto et al. 2008, Sak et Ditrich 2005, Sak et al. 2006, 2010, 2017b). Kotková et al. (2013) prokázali, že mikrosporidie přetrvávají u imunokompetentních hostitelů v latentní formě a mohou být reaktivovány. Tato studie na laboratorních zvířatech značně přispěla k předvídání a pochopení imunitních odpovědí u infikovaných hostitelů. Mikrosporidie jsou definovány jako chronické, pomalu působící patogeny, které jsou u vhodného hostitele schopny rapidního množení, aniž by však

prokazatelně postihovaly hostitelský organismus imunokompetentního jedince. (Kotková et al. 2018, Sak et al. 2017b).

Z důvodů obtížné diagnostiky mikrosporidií nejsou pacienti často testováni na přítomnost těchto parazitů. Tato situace vede k stavu, že nejsou odhalovány „skryté mikrosporidiové infekce“, které mohou působit závažné zdravotní potíže, a které jsou často označovány jako nespecifické patologie organismu. Proto také bývá velmi zřídka aplikována účinná léčba (Ditrich et al. 2011).

Horizontální přenos mikrosporidií počíná germinací (klíčením) ve střevním lumenu, kde jsou infekce zpravidla iniciovány v epitelálních střevních buňkách, ojediněle ve svalových buňkách. Tkáně, ve kterých se mikrosporidie vyvíjejí v infekční stádia, spory, jsou obvykle druhově specifické. Nejčastěji se jedná o tkáň/buňky trávicího traktu, kdy může být infekce omezena pouze na jednu část střeva, či se může šířit do různých typů tkání. Systémové mikrosporidiové infekce vyvolané požitím spor jsou rovněž iniciovány v epitelálních buňkách střeva a následně se šíří i do ostatních tkání. U myších modelů bylo pozorováno velmi rychlé šíření druhů *Encephalitozoon*, které byly schopny vyvolat systémové infekce během několika dnů (Kotková et al. 2013, 2018, Sak et al. 2017a, b).

Jelikož jsou mikrosporidie nepohyblivé, přenos v hostiteli je omezen na jedinečný mechanismus invaze hostitelských buněk, který zahrnuje vysoce specializovanou strukturu, 10–50 µm dlouhé polární vlákno, zodpovědné za infekci buněk hostitelského organismu. Jsou však reportovány případy replikace mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* v rezidentních a migrujících makrofázích, což naznačuje, že indukce chemokinů zodpovědných za vznik imunitního zánětu může vést k pokračování infekce a diseminaci (Fischer et al. 2008, Niederkorn et Shadduck 1980, Weidner 1975).

Stále častěji se však objevuje spojování mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* s běžnými infekcemi a často mohou představovat zanedbávané etiologické agens způsobující život ohrožující infekce, ke kterým mohou být řazeny encefalitida a meningitida u imunokompetentních jedinců. Dále mohou přispět k aseptické periprotetické osteolýze po primární artroplastice kyčelního kloubu, což vede k uvolnění implantátu a vyžaduje následnou revizi kyčelní náhrady (Ditrich et al. 2011, Kicia et al. 2018a).

Na základě studií lze předpokládat migrace mikrosporidií do ložiska zánětu a aktivaci zánětlivých buněk, zejména pak makrofágů a neutrofilů, jejichž produkty jsou schopny indukovat poškození tkáně. K těmto látkám se řadí cytotoxické cytokiny, kationtové proteiny, mediátory lipidů, metaloproteinázy a složky kyslíku. Vrozené i adaptivní signalizační dráhy by tudíž mohly být zapojeny do poškození tkáně. Mechanizmy však nadále zůstávají spekulativní (Achbarou et al. 1996, Cox et al. 1979, Sak et al. 2010, 2011b).

2. Literární přehled

2.1. Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární eukaryotní paraziti infikující široké spektrum živočichů včetně protist, obratlovců a bezobratlých. Řadí se do kmene Microsporidia patřícího do říše Opisthokonta. V současnosti je popsáno téměř 1500 druhů patřících do 187 rodů. Tito paraziti byli poprvé popsáni v roce 1857 jakožto patogeny bource morušového a rovněž byli rozpoznáváni jako příčina infekcí u širokého spektra hostitelů (Vávra et Lukeš 2013). První případ lidské mikrosporidiové infekce byl popsán roku 1959 (Matsubayashi et al. 1959). Mohou způsobovat latentní, benigní, či systémové infekce, které způsobují rozsáhlá poškození hostitelského organismu a často i smrt (Franzen 2008).

Struktura a biologie mikrosporidií je tak unikátní, že je jejich fylogenetický vztah s dalšími organismy nejasný. Historicky se taxon Microsporidia objevil jako izolovaná skupina organismů (Vávra 1966). Strukturní a genomická redukce těchto parazitů je možná pouze díky metabolické a energetické závislosti na hostitelské buňce (Williams 2009).

2.2. Taxonomie

Kmen Microsporidia představuje dobře definovanou monofyletickou skupinu, jejíž postavení na fylogenetickém stromu je však nejisté a za 150 let výzkumu prodělalo řadu změn (Keeling 2014). Primárně byla klasifikace založena na strukturních znacích pozorovaných světelným a elektronovým mikroskopem. Podobný problém klasifikace mikrosporidií je ten, že mnoho charakteristických struktur buď nenese fylogenetický signál, nebo signál nebyl dosud identifikován. Tudíž je formální klasifikace mikrosporidií, která je založená na morfologii a rozsahu hostitelů v mnoha případech neslučitelná s fylogenetickými vztahy odhalenými molekulárními metodami. Na druhou stranu podnítilo užití těchto metod reklasifikaci a přejmenování řady druhů mikrosporidií (Vávra et Lukeš 2013).

První popsaná mikrosporidie *Nosema bombycis* byla popisována jako kvasince podobný organizmus a řazena mezi Schizomycety (Nägeli 1857). Později je na základě buněčných podobností řadil Balbiani (1882) v rámci skupiny protist do podtřídy Cnidosporidia patřící mezi Sporozoa. Následně byly na základě absence mitochondrií řazeny mezi primitivní eukaryotní organismy do skupiny Archeozoa

(Cavalier-Smith 1983). Analýzou proteinů bylo však zjištěno, že jsou mikrosporidie příbuzné houbám a díky molekulárním metodám byla dokázána přítomnost HSP70 (70-kDa heat shock protein) genů, což dokazuje sekundární ztrátu mitochondrií a díky elektronové mikroskopii byla prokázána přítomnost mitosomů (Keeling 2014, Keeling et al. 2000, Vávra 2005).

Stále však není jisté, zda mají být řazeny v rámci říše Fungi, nebo tvoří společně s kmenem Aphelida a druhem *Rozella* spp. sesterskou skupinu hub Cryptomycota (Keeling 2014, Lutzoni et al. 2004). Podobnost mikrosporidií s houbami je založena převážně na molekulárních znacích, přičemž morfologická podobnost je velmi omezená. Mezi znaky sdílené s houbami patří přítomnost α -chitinu ve stěnách spor, trehalózy a absence bičíků. Odlišují se však přítomností ribosomů prokaryotního typu 70S, nepřítomností mitochondrií, peroxisomů a ITS2 (Vávra et al. 2013, Voigt et al. 2011).

Parazitický způsob života vedl k redukci řady genů spojených s metabolickými funkcemi. Mnoho zástupců kmene Microsporidia řadíme k organizmům s nejmenším eukaryotním genomem. Velikost genomu se pohybuje od 2,3 Mbp (mega base pairs) u *E. intestinalis*, 2,9 Mbp u prvního analyzovaného druhu *E. cuniculi* až po 24 Mbp u *Hamiltosporidium tvaerminnensis* (Katinka et al. 2001, Keeling et al. 2000).

2.3. Morfologie a vývojový cyklus

Mikrosporidie tvoří unikátní spory, které se řadí mezi jedny z nejsložitějších jednobuněčných forem známých v biologickém světě a jedná se o jediné volně se vyskytující stádium (Franzen 2008). Velikost spor se v závislosti na druhu pohybuje od 1 až do 20 μm a většinou mívají oválný, kulovitý nebo hruškovitý tvar. Druhy, které infikují savce, mají spory velikosti 1 až 3 μm (Bryan et al. 1991, Canning et al. 1986, Weber et al. 1994). Stěna spor se skládá ze tří vrstev:

- Vnější elektron-denzní proteinová vrstva – exospora
- Vnitřní chitinová vrstva – endospora
- Třívrstevná plazmatická membrána uzavírající cytoplasmu a organely

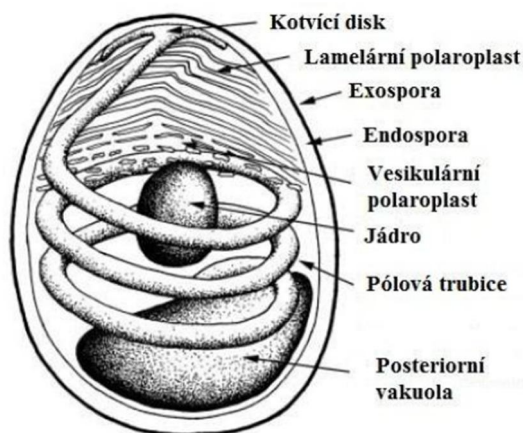
Vzhledem k obligátnímu intracelulárnímu způsobu života a velmi nízké motilitě vytvořily mikrosporidie unikátní způsob šíření mezi a v hostiteli. Klíčení spory probíhá pomocí vychlípitelné pólové trubice, pomocí níž je sporoplazma přenášena do cytoplazmy hostitelské buňky na vzdálenost až stovek μm . Pólová

trubice má průměr přibližně 0,1–0,2 μm a ve spoře vytváří 4–30 závitů okolo sporoplazmy. Infekce hostitelské buňky je založena na vzrůstání osmotického a hydrostatického tlaku během germinace, při kterém dochází ke štěpení molekul disacharidu trehalózy na dvě molekuly glukózy v posteriorní vakuole a postupné oxidaci dlouhých řetězců mastných kyselin, zvětšování vakuoly a prasknutí spory v nejtenčím místě na apikálním vrcholu. V důsledku toho dochází k vystřelení pólové trubice prasklinou, která proniká plazmatickou membránou hostitelské buňky a obsah spory zvaný sporoplazma je injikován do cytoplazmy hostitelské buňky (Keohane et Weiss 1999, Larsson 1999, Undeen et Van der Meer 1999, Vávra et Lukeš 2013)

V hostitelské buňce dochází za vhodných podmínek ke vzniku merontu, který se po období růstu a jaderném štěpení dělí na dceřiné buňky zvané merozoity, se kterými jsou morfologicky identické. Tento proces může probíhat v přímém kontaktu s hostitelskou cytoplazmou (např. *Nosema* spp., *Enterocytozoon* spp.), nukleoplasmou (např. *Nucleospora* spp., *Enterospora* spp.), v parazitoformní vakuole (např. *Encephalitozoon* spp.), či v endoplazmatickém retikulu hostitelské buňky (např. *Endoreticulatus* spp.) (Cali et Takvorian 2014, Vávra et Larsson 2014).

Následuje proces, kdy se merozoity mění ve sporonty. Tento proces lze rozeznat formováním elektro-denzní vrstvy na povrchu buněk. Během sporogonie, která může probíhat v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelské buňky, nebo uvnitř pouzdra, které je parazitárního původu, vznikají jedním nebo několika binárními množenými sporoblasty. Během zrání dochází ke zmenšení velikosti, zahušťuje se jejich cytoplazma a vznikají organely typické pro spory-pólová trubice, kotvící disk a vakuola. Celý životní cyklus je zakončen diferenciací zralých spor (Cali et Takvorian 2014, Vávra et Larsson 2014).

Obrázek 1: Mikrosporidie – spora (Keeling et Fast 2002, upraveno)



2.4. Mikrosporidíóza a klinické příznaky

Mikrosporidie infikují živočichy prakticky všech kmenů, zejména jsou pak přítomny u ryb a hmyzu. Zájem o tyto organizmy vzrostl během posledních dvaceti let poté, kdy začaly být spojovány jako původce přetrvávajících průjmů a systémových onemocnění u osob s AIDS (Desportes et al. 1985). Z téměř 1300 druhů kmene Microsporidia bylo 15 druhů hlášených jako původce lidských nákaz (Didier et Khan 2014).

Většina mikrosporidií infikuje zažívací trakt hostitele, byly však zaznamenány infekce téměř všech orgánů a mikrosporidie jsou schopny se šířit celým organismem (Weber et Bryan 1994). Poprvé byly mikrosporidie detekovány ve tkáních savců před téměř 100 lety a v roce 1959 Matsubayashi et al. (1959) popsali infekci u dítěte spojenou s encefalitidou. U laboratorně infikovaných imunokompetentních savců byly pozorovány multifokální granulomatózní a nekrotické léze, které se nejčastěji vyskytovaly v ledvinách, játrech, slezině a mozku (van Dellen et al. 1989, Shadduck et Orenstein 1993).

Oportunní mikrosporidiová infekce spojená s průjmy a systémovým onemocněním se dostala do centra zájmu v oblasti lidské medicíny s nástupem AIDS pandemie v polovině 80. let minulého století. Zvýšený zájem a vylepšené diagnostické metody vedly k rozpoznávání mikrosporidií u širší populace lidí včetně dětí, příjemců orgánů, cestovatelů, starších jedinců a osob s vysokou expozicí ke zvířatům, kontaminované vodě a půdě (Didier et Khan 2014).

Klinické příznaky a průběh infekce mikrosporidíózy závisí na imunitním stavu hostitele a druhu a genotypu parazita. U imunokompetentních jedinců bývají infekce

zpravidla asymptomatické. Mikrosporidie však byly detekovány u řady imunokompetentních jedinců a vysoká prevalence byla pozorována zejména u diabetiků, těhotných žen, pracovníků na jatkách, cestovatelů, seniorů, dětí a homosexuálů (del Aguila et al. 2001, Enriquez et al. 1998, van Gool et al. 1997, Lopez-Velez et al. 1999, Lores et al. 2002, Müller et al. 2001).

Mikrosporidíóza imunodeficitních pacientů s AIDS bývá nejčastěji provázena průjmovým onemocněním a malabsorpcí živin, výjimkou však nebývá ani hepatitida, peritonitida, keratokonjunktivitida, sinusitida, bronchitida, pneumonie, cystitida, nefritida, myositida a encefalitida (Franzen et Müller 2001, Müller et al. 2001).

Druhy rodu *Encephalitozoon* infikují u savců několik typů buněk včetně epiteliálních a endoteliálních buněk, fibroblastů, makrofágů a astrocytů. U AIDS pacientů, příjemců orgánů a kostní dřeně se nejčastěji vyskytují průjmy, pneumonie, hepatitida, cholangitida, peritonitida a nefritida. U imunokompetentních hostitelů byla prokázána možnost reaktivace latentní mikrosporidíózy (Kotková et al. 2013, Wasson et Peper 2000).

Tři druhy rodu *Encephalitozoon* infikující savce mají schopnost diseminace, jež způsobuje klinické syndromy, liší se však v rozšíření parazita v organizmu hostitele. *Encephalitozoon cuniculi* bývá detekován ve všech orgánech, avšak v gastrointestinálním traktu bývá nacházen sporadicky. Primární místa infekce u *E. hellem* bývají především oční rohovka a spojivka, močový trakt a dýchací ústrojí. *Encephalitozoon intestinalis* napadá nejčastěji gastrointestinální trakt a žlučovody a je schopen diseminovat do ledvin, očí, nosních dutin a dýchacího traktu (Franzen 2008).

2.5. *Encephalitozoon* spp.

Rod *Encephalitozoon* má izolované jádro ve všech vývojových stádiích. Vývoj probíhá v parazitoformní vakuole, u které se předpokládá, že se na jejím vzniku podílí hostitelská buňka (Bohne et al. 2011). Spory dosahují velikosti $2,5 \times 1,5 \mu\text{m}$ (Bigliardi et al. 1996). Druhy rodu *Encephalitozoon* jsou hojně využívány k laboratorním pokusům především z důvodu velmi snadné kultivace v buněčných kulturách.

Rod *Encephalitozoon* zahrnuje čtyři druhy, přičemž tři druhy, *E. cuniculi*, *E. hellem* a *E. intestinalis* jsou schopny infikovat savce. Tyto tři druhy jsou morfologicky totožné a pouze *E. intestinalis* může být odlišeno od předchozích dvou druhů přítomností volného intravakuolárního materiálu mezi parazitickými buňkami (Cali et al. 1996). Čtvrtý druh, *E. romaleae* infikuje kobylinky (Wright et Craighead 1922).

2.5.1. *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi je nejlépe prozkoumaným druhem savčích mikrosporidií a poprvé byl identifikován a popsán v mozku, míše a ledvinách králíků s paralýzou pohybu (Levaditi et al. 1923, Wright et Craighead 1922). Od té doby byl dále identifikován v širokém spektru savců zahrnujícím hlodavce, masožravce, přežvýkavce a primáty. U různých druhů savců, včetně člověka, způsobuje latentní a chronické infekce (Canning et al. 1986, Didier et al. 2000, Shaddock 1971). Jedná se o první druh savčích mikrosporidií, který byl izolován jako kontaminant buněčných kultur a je úspěšně dlouhodobě kultivován (Shaddock 1969).

Na základě počtu opakování GTTT kódovaných v rámci ITS jsou rozlišovány 4 genotypy: genotyp I (králíčí kmen), genotyp II (myší kmen), genotyp III (psí kmen) a genotyp IV (lidský kmen), který byl popsán u pacienta po transplantaci ledvin (Didier et al. 1995, Talabani et al. 2010). První tři genotypy byly nalezeny u lidí a zvířat, což naznačuje jejich zoonotický a/nebo antroponotický potenciál (Didier et al. 2000, Mathis et al. 1996, 2005, Sokolova et al. 2011).

2.6. Mechanizmy přenosu infekce

Mikrosporidie se vyskytují po celém světě a jeden z nejčastějších způsobů přenosu do vnějšího prostředí je prostřednictvím výkalů a moči infikovaných jedinců. Minimální infekční dávka je stále neznámá a pravděpodobně se liší mezi jednotlivými druhy a genotypy mikrosporidií (Didier et Weiss 2011). Na způsobu přenosu závisí počáteční místo infekce, nejčastěji proto bývají infikovány buňky dýchacího a gastrointestinálního ústrojí. Nejvíce infekcí je způsobeno fekálně orálním přenosem spor z infikovaných lidí a zvířat kontaminovanou potravou a vodou. K přenosu infekce však může dojít přes poraněnou kůži, oční léze, či pohlavním stykem (Didier et Weiss 2011). Transplacentální přenos nebyl u lidí zatím zaznamenán, avšak byl prokázán u primátů a velkého množství ostatních savců

(Fayer et Santin-Duran 2014, Kotková et al. 2018). Intenzita vylučování spor infikovaným jedincem je značně proměnlivá. Například u asymptomatického dítěte infikovaného *E. bieneusi* dosahovaly hodnoty $1,2 \times 10^5$ spor na gram stolice (Mungthin et al. 2005). U imunodeficitního pacienta s AIDS infikovaného *E. bieneusi* prokázali Goodgame et al. (1999), že se množství spor na mililitr vodnaté stolice pohybovalo v rozmezí $4,5 \times 10^5$ až $4,4 \times 10^8$. Množství vylučovaných spor tedy závisí na druhu, či genotypu patogenu stejně tak jako na věku a zdravotním stavu infikovaného jedince (Fayer et Santin-Duran 2014). Mikrosporidie patří mezi nejefektivnější a nejvíce vyvinuté parazity a u savců jsou charakteristické vyváženým vztahem mezi hostitelem a parazitem tím způsobem, že u imunokompetentních jedinců vytváří minimálně klinicky zjevná onemocnění (Didier et al. 2000, Shadduck et Orenstein 1993, Vávra et Lukeš 2013).

Mikrosporidie infikující člověka byly nalezeny ve vodních zdrojích, divokých, domácích a hospodářských zvířatech, což vyvolává obavy z přenosu vodou, potravou a pomocí zvířat (Didier 2005).

2.6.1. Přenos vodou

Díky své struktuře a stavbě jsou spory mikrosporidií schopny dlouhodobě přežít v nepříznivých podmínkách a přenos vodou patří mezi nejčastější způsoby přenosu. Studie prokázaly schopnost spor přežít ve slané i sladké vodě. Koudela et al. (1999) popsali schopnost spor *E. cuniculi* neztrácet infekčnost po tom, co byly dva roky uchovávány ve vodě za teploty 4 °C, či byly zamrazeny při -24 °C na 24 hodin. V další studii byla popsána infekce-schopnost u spor *E. intestinalis* a *E. hellem*, které byly po několik měsíců uchovávány ve vodě při teplotách od 10 do 30 °C (Didier et al. 2004). Mezi možný způsob nákazy patří požití kontaminované vody, nicméně není vyloučeno propuknutí infekce při rekreaci u vodních zdrojů, koupání a dalších činnostech, při kterých je jedinec vystaven kontaminovanému zdroji vody (Fayer et Santin-Duran 2014, Hutin et al. 1998).

2.6.2. Přenos potravou

Výzkumy prokázaly souvislost mikrosporidiózy u AIDS pacientů po konzumaci nedostatečně tepelně upraveného masa a mořských plodů. Spory byly rovněž detekovány v čerstvém ovoci a zelenině, ovocných džusech a pasterovaném kravském mléce. Recentní studie dokonce prokázaly přetrvávání infekce schopných

spor ve fermentovaných masných výrobcích (Didier et al. 2004, Fayer et Santín-Duran 2014, Kváč et al. 2016, Lee 2008, Sak et al. 2019).

Přítomnost spor mikrosporidií *E. intestinalis* byla dokázána v zavlažovací vodě používané v rostlinné produkci a další studie prokázala schopnost přežívání spor *E. bieneusi*, *E. intestinalis* a *E. cuniculi* na bobulovitých plodech a listové zelenině, přičemž detekované množství spor bylo dostačující k vyvolání infekce (Jedrzejewski et al. 2007, Thurston-Enriquez et al. 2002).

2.6.3. Další způsoby přenosu

Mezi další možný způsob přenosu mikrosporidií může být řazen přenos transplacentální, který byl popsán u hlodavců, masožravců, koní a opic. U lidí nebyla možnost přenosu mikrosporidií z matky na potomka prozatím prokázána (Snowden et al. 1998, Snowden et Shaddock 1999). Zoonotický přenos *E. cuniculi* byl prokázán u dítěte, které bylo ve styku s infikovanými štěňaty (MacInnes et Stewart 1991). Hutin et al. (1998) uvádějí, že mikrosporidíóza může souviset s rizikovými faktory a stylem života, mezi které se řadí například nitrožilní užívání drog, homosexuální praktiky a nedostatečné hygienické návyky. U imunokompetentních jedinců byl zaznamenán přenos spor vdechnutím kontaminovaného aerosolu, dále však může docházet k přenosu infekce přes rány, okem, či pohlavním stykem (Birthistle et al. 1996, Fayer et Santín-Duran 2014, Sharma et al. 2014). Byl rovněž dokumentován možný přenos infekce u příjemců orgánů od infikovaného dárce (Hocevar et al. 2014).

2.7. Makrofágy

Infekce hostitelské buňky *E. cuniculi* je možná dvěma způsoby. První je vystřelením pólové trubice a injekce sporoplazmy do cytoplazmy buňky. Druhým způsobem je fagocytóza spor makrofágy a následná infekce cytoplazmy makrofága (Schmidt et Shaddock 1984). Makrofágy patří společně s monocyty mezi buňky, které odpovídají na sekretované chemokiny (Fischer et al. 2007). Weidner (1975) prokázal, že životní cyklus *E. cuniculi*, který probíhá v parazitoforní vakuole uvnitř hostitelské buňky je možný i v makrofázích, díky nimž se mikrosporidie mohou šířit do celého těla a způsobovat systémové infekce. Předpokládá se, že sekrece chemokinů, které slouží k indukci imunitního zánětu, může vést k migraci infikovaných buněk, což zapříčiňuje pokračování infekce a diseminaci (Fischer et al.

2008, Niederkorn et Shadduck 1980). Infikované makrofágy neustále ztrácejí cytoplazmatický obsah během růstu parazitoformní vakuoly, která je pravděpodobně odvozená z membrány fagocytického měchýřku makrofágu. Přežití je možné pomocí zabránění fúze fagozomu s lysozomem, kdy je díky přítomnosti parazita blokována lysozomální aktivita v důsledku nepřítomnosti kyselé fosfatázy.

Ex vivo a *in vivo* studie však prokázaly, že se makrofágy podílí na usmrcení intracelulárních mikrosporidií. Přesný mechanismus je však stále zkoumán a předpokládá se, že ke spuštění tohoto procesu je potřeba více efektorových mechanismů.

2.8. Zánět a mikrosporidie

Mikrosporidie často způsobují onemocnění s nejednoznačnou etiologií a díky moderním diagnostickým metodám bývají stále častěji diagnostikovány u imunokompetentních jedinců.

Encephalitozoon cuniculi genotyp I byl detekován společně s bakterií *Streptococcus intermedius* v mozgovém abscesu u 56letého imunokompetentního muže, který v minulosti prodělal infarkt myokardu a rovněž u něj byl diagnostikován diabetes mellitus 2. typu. Klinické příznaky pozorované u tohoto muže byly hemiparéza a epilepsie. Spory *E. cuniculi* byly u pacienta detekovány v aspirátu z abscesu, stolici a moči. Po cílené léčbě proti mikrosporidiím došlo k odeznění klinických příznaků a detekce parazita ve sledovaných vzorcích byla negativní (Ditrich et al. 2011).

U pacientů s endoprotézou kyčelního kloubu je periprotetická osteolýza jednou z nejčastějších komplikací po primární artroplastice způsobující následnou ztrátu pevnosti implantátu, která vede k revizi artroplastiky. Ta může být mechanického, alergického či infekčního původu, což zapříčiňuje opotřebení materiálu a degradaci kostní tkáně. Jednou z možných příčin revize kyčelních kloubů jsou mikrosporidie, které migrují během zánětlivého procesu na periprotetickou tkáň. Spory a DNA *E. cuniculi* genotyp II byly detekovány u 18,9 % pacientů a předpokládá se, že by se mikrosporidie mohly podílet na destrukci tkáně v okolí kloubní náhrady a následnou osteoporózu. Žádný ze sledovaných pacientů však nejevil žádné známky mikrosporidie, jako je například průjem či horečka (Kicia et al. 2018a).

2.9. Freundovo adjuvans

Freundovo adjuvans je roztok antigenů emulgovaných v minerálním oleji. Nekompletní Freundovo adjuvans (Incomplete Freund's adjuvant) obsahuje 85 % parafinového oleje a 15 % manid monooleátu, kompletní Freundovo adjuvans (Complete Freund's adjuvant) obsahuje navíc ještě inaktivované a vysušené mykobakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Nekompletní Freundovo adjuvans indukuje především Th2 imunitní odpověď prostřednictvím vytvoření ložiska v místě vpichu a stimulací protilátek produkujících plazmatických buněk. Freundovo adjuvans může být využito k vytvoření vodno-olejnaté emulze imunogenů. V této emulzi stimulují antigeny vysoké a dlouhotrvající protilátkové odpovědi, což může být způsobeno pomalým uvolňováním antigenů. Dříve bylo Freundovo adjuvans používáno v medicíně, avšak kvůli vedlejším účinkům, mezi které můžeme zařadit například zánětlivé reakce, bylo od jeho užívání upuštěno (Alving 2002).

3. Cíle práce

- 1) Zpracovat literární rešerši o tématu.
- 2) Popsat průběh migrace infekce *E. cuniculi* do ložiska zánětu u imunokompetentních a imunodeficitních hostitelů pomocí mikroskopických a molekulárních metod.
- 3) Posoudit roli makrofágů v migraci infekce *E. cuniculi* do ložiska zánětu.
- 4) Vyvodit závěry ze získaných dat v souvislosti s epidemiologií mikrosporidiózy.

4. Materiál a metodika

4.1. Paraziti

K pokusům byly použity spory *Encephalitozoon cuniculi* kmene EC2, které byly původně izolovány Koudelou a spol. z dexamethazonem imunosuprimované myši (1994). Mikrosporidie byly kultivovány v buňkách opičích ledvin Vero 6 při teplotě 37 °C v kultivačním médiu RPMI-1640 HEPESmodification (Hepes 25mM, Biotech, Praha, Česká republika) s přidavkem 2,5% bovinního fetálního séra (Bofes, Biotech), směsí antibiotik a antimykotik (100 UI penicilinu, 10 µg streptomycinu, 0,25 µg amfotericinu B/ml média; Sigma-Aldrich, Str. Louis, MO, USA), 1% neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich) a gentamycinu (30 µg/ml RPMI; Lek Pharmaceuticals d.d., Ljubljana, Slovinsko). Adherované infikované buňky byly uvolněny pomocí skleněné tyčinky a přemístěny do deionizované vody, ve které došlo k jejich plazmolýze. Následnou centrifugací (20 minut při 1370 g) byl získán sediment obsahující spory, který byl uchován v pufrovaném fosfátovém pufru (PBS) obsahujícím směs antibiotik a antimykotik (100 UI penicilin, 10 µg/ml streptomycin, 0,25/ml µg amphotericin) při 4 °C. Pro pokusy byly spory čištěny na Percollovém gradientu (Sigma-Aldrich) (1 díl Percollu:1 díl suspenze buněk v PBS, centrifugovat 30 minut při 1100 g) a jejich množství bylo stanoveno počítáním v Bürkerově komůrce.

4.2. Pokusná zvířata

K pokusům byly použity inbrední 7týdenní samice imunokompetentního kmene BALB/c a samice s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (Severe Combined immunodeficient – SCID) (oba kmeny Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) a inbrední 7týdenní samice kmene B6.129S4-*Ccr2^{tm1Ifc}/J* s defektním migračním faktorem makrofágů (Macrophage Migration Factor KnockOut mice –MMF KO, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Myši byly chovány za standardních podmínek za konstantní teploty 22–23 °C a 60–65% relativní vlhkosti vzduchu ve sterilním prostředí v IVC jednotce (Touch SlimPlus-Blue Line, Tecniplast, Buguggiate, Itálie) s HEPA filtry ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. v Českých Budějovicích (PaÚ BC AV ČR, v. v. i.), krmeny sterilní komerční směsí

(Altromin 1314 IRR, Altromin Spezielfutter GmbH & Co. KG, Lage, Německo) a napájeny sterilní vodou *ad libitum*.

4.3. Infekce myši

BALB/c, SCID a MMF KO myši byly perorálně infikovány pomocí jícnové sondy dávkou 10^7 spor *E. cuniculi* genotyp II ve 200 μ l sterilní vody / zvíře. Infikované myši byly chovány ve sterilním prostředí v izolátorech s HEPA filtry (BEM, Znojmo, Česká republika).

4.4. Design pokusů

K pokusům bylo použito 104 BALB/c myši, 42 MMF KO myši a 24 SCID myši. Imunokompetentní BALB/c myši byly rozděleny do 4 skupin, imunodeficitní SCID a MMF KO myši byly rozděleny do 2 skupin. Přehled skupin pokusných zvířat je uveden v tabulce 1. V týdenních intervalech byla usmrcována 3 zvířata z každé skupiny a byly získány vzorky jater a svaloviny z pravého a levého stehenního svalu. Z každé skupiny byli navíc vybráni 3 jedinci, kterým byl po celou dobu pokusu jednou denně odebrán vzorek trusu, přičemž tyto myši byly usmrceny jako poslední ze skupiny.

Tabulka 1: Design pokusů: minimální počty zvířat použitých během experimentů

Skupina	Číslo skupiny	Celkový počet zvířat	Dny po infekci															
			7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98		
Kontrolní skupiny ^a	BALB/c	30	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
	BALB/c chronická fáze	21									3	3	3	3	3	3	3	
	MMF KO	21	3	3	3	3	3	3	3									
	SCID	12	3	3	3	3												
Pokusné skupiny ^b	BALB/c	30	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3					
	BALB/c chronická fáze	21									3	3	3	3	3	3	3	
	MMF KO	21	3	3	3	3	3	3										
	SCID	12	3	3	3	3												

^a perorální infekce 10^7 *E. cuniculi* genotyp II ve 200 μ l dH₂O a intramuskulární injekce PBS;

^b perorální infekce 10^7 *E. cuniculi* genotyp II ve 200 μ l dH₂O a intramuskulární injekce Freundova adjuvans incomplete; **červené pole** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modré pole** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu; **MMF KO** – myši s nefunkčním migračním faktorem makrofágů; **SCID** – myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí; **BALB/c** – imunokompetentní myši

Kontrolní skupiny:

- 1: BALB/c myši: Sedmý den po infekci byly myši intramuskulárně injikovány 50 µl sterilního PBS do pravého stehenního svalu. Do levého stehenního svalu bylo myším injikováno sterilní PBS 28. den po infekci (DPI).
- 2: BALB/c myši v chronické fázi infekce: Myši byly intramuskulárně injikovány 50 µl sterilního PBS do pravého stehenního svalu v chronické fázi infekce 56. DPI. Do levého stehenního svalu bylo myším injikováno sterilní PBS 77. DPI.
- 3: MMF KO myši: Sedmý den po infekci byly myši intramuskulárně injikovány 50 µl sterilního PBS do pravého stehenního svalu. Do levého stehenního svalu bylo myším injikováno sterilní PBS 28. DPI.
- 4: kontrolní skupina SCID myši: Sedmý den po infekci byly myši intramuskulárně injikovány 50 µl sterilního PBS do pravého stehenního svalu.

Pokusné skupiny:

5. BALB/c myši: Sedmý den po infekci byly myši intramuskulárně injikovány 50 µl Freundova adjuvans incomplete do pravého stehenního svalu. Do levého stehenního svalu bylo myším Freundova adjuvans incomplete injikováno 28. DPI.
6. BALB/c myši v chronické fázi infekce: Myši byly intramuskulárně injikovány 50 µl Freundova adjuvans incomplete do pravého stehenního svalu v chronické fázi infekce 56. DPI. Do levého stehenního svalu bylo myším Freundova adjuvans incomplete injikováno 77. DPI.
7. MMF KO myši: Sedmý den po infekci byly myši intramuskulárně injikovány 50 µl Freundova adjuvans incomplete do pravého stehenního svalu. Do levého stehenního svalu bylo myším Freundova adjuvans incomplete injikováno 28. DPI.
8. SCID myši: Sedmý den po infekci byly myši intramuskulárně injikovány 50 µl Freundova adjuvans incomplete do pravého stehenního svalu.

4.5. Odběr vzorků trusu

Vybraným myším z každé sledované skupiny byl individuálně po dobu pokusu jedenkrát denně odebírán trus. Vzorky byly zváženy a uchovávány v označených sterilních 1,5 ml mikrozkuvkách při teplotě -20 °C.

4.6. Odběr vzorků orgánů a tkání

Z každé skupiny zvířat byly v týdenních intervalech usmrcovány 3 myši pomocí cervikální dislokace. Následně byly jednotlivým myším odebrány vzorky

pravého a levého stehenního svalu a jater. Každý orgán byl odebrán za pomoci jedné sady sterilních nástrojů, aby bylo zabráněno kontaminaci vzorků. Nástroje byly sterilizovány autoklávováním při 125 °C a poté UV světlem o vlnové délce 254 nm (Uvilink CL 508, UVITEC, Cambridge, Velká Británie). Část každého orgánu byla fixována 4% formaldehydem a následně použita pro přípravu histologických preparátů. Další část vzorku tkáně byla použita pro izolaci DNA.

4.7. Příprava histologických preparátů

Vzorky odebraných tkání fixovaných ve 4% formaldehydu byly odvodněny ve vzestupné alkoholové radě. Alkohol ve tkáních byl po odvodnění nahrazen xylenem a po nasycení byl materiál přenesen do tekutého parafínu. Vzorky byly nakonec zality do přefiltrovaného parafínu a byly zhotoveny bločky. Na mikrotomu byly z bloček nakrájeny histologické řezy o tloušťce 4–6 µm a řezy byly přeneseny na podložní sklíčka. Řezy byly před barvením odparafínovány v xyleny a sestupnou alkoholovou řadou převedeny do vody. Připravené histologické preparáty byly barveny pomocí hematoxylin-eosinu a modifikací Grammova barvení (Brown et Brenn 1931), zality do kanadského balzámu a prohlíženy světelným mikroskopem.

4.8. Barvení podle Brown-Brenna (modifikace Grammova barvení)

Po dobu 1 minuty byl na odparafínované řezy nanesen 1 ml 1% vodného roztoku krystalické violeti a 50 µl 5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Sklíčka byla opláchnuta vodou, ponořena do Grammova roztoku jódu (0,33% roztok jódu, 0,66% roztok jodidu draselného ve vodě) na 1 minutu a opět opláchnuta vodou. Následně byla odbarvena v roztoku aceton-etheru 1:1, dokud nebyla vymyta modrá barva. Vzorky byly poté 1 minutu dobarčovány pomocí 0,00025% vodného roztoku bazického fuchsinu a opět opláchnuty vodou. Podložní sklíčka byla ponořena do 0,1% roztoku kyseliny pikrové v acetonu dokud nebyla odbarvena do žlutavě růžova. Následovalo opláchnutí v acetonu a ve směsi aceton-xylen 1:1. Řezy byly projasněny oplachem ve třech lázních xyleny. Obarvené vzorky tkání byly zality kanadským balzámem a překryty krycím sklíčkem.

Vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem pod olejovou imerzí při zvětšení 1000×. Spory mikrosporidií se barví tmavofialově, grampozitivní bakterie modře, gramnegativní bakterie červeně, jádra buněk červeně a ostatní tkáňové komponenty žlutě.

4.9. Barvení hematoxylin-eosinem

Po dobu 10 minut byly odparafinované řezy ponořeny do hematoxylinu (0,1 % roztok hematoxylinu, 5% roztok síranu hlinito-amonného, 0,02% roztok jodičnanu ve 4% vodném roztoku kyseliny octové). Následně byly 10 minut oplachovány od tekoucí vodou. Poté byly vzorky dobarvovány 5 minut v eosinu (0,2% roztok eosinu ve 4% vodném roztoku kyseliny octové), opláchnuty vodou a odvodněny pomocí vzestupné alkoholové řady a xylenu. Vzorky tkání byly zality kanadským balzámem a překryty krycím sklíčkem.

Vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem pod olejovou imerzí při zvětšení 1000×. Hematoxylin barví jádra buněk a cytoplazmu modře a eosin mezibuněčnou hmotu červeně.

4.10. Izolace DNA z trusu

Ze vzorků trusu byla pomocí komerčně dodávaného kitu GeneAll® Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea) extrahována celková genomová DNA.

Do 1,5 ml mikrozkušavky Safe-Lock Tube se vzorkem trusu bylo přidáno 0,5 ml skleněných kuliček (0,5 mm) a 4 zirkonové kuličky (2 mm) a napipetován 1 ml FL pufru. Vzorky byly zvortexovány a následně homogenizovány v beadbeateru (MP Fast Prep®-24 Instrument, Santa Ana, CA, USA) po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s. Po homogenizaci byl vzorek ponechán inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 5 minut a následně centrifugován 5 minut při 14 000 g. Veškerý supernatant byl přepipetován na mikrozkušavku opatřenou EzPass kolonou a centrifugován 1 minutu při 14 000 g. Ze sběrné části EzPass mikrozkušavky byl vylit odpad, na kolonu bylo napipetováno 100 µl EB pufru, který byl ponechán inkubovat při laboratorní teplotě 1 minutu a poté byla mikrozkušavka EzPass centrifugována 1 minutu při 14 000 g. Kolona byla vyhozena a do sběrné mikrozkušavky bylo napipetováno 500 µl PB pufru. Směs byla promíchána pipetováním, přenesena na Type G mini spin kolonu a centrifugována 1 minutu při 14 000 g. Ze sběrné mikrozkušavky byl vylit obsah, na střed kolony bylo napipetováno 500 µl NW pufru a mikrozkušavka byla centrifugována 1 minutu při 14 000 g. Obsah sběrné mikrozkušavky byl vylit a opět proběhla centrifugace 1 minutu při 14 000 g. Kolona byla přenesena na čistou 1,5 ml mikrozkušavku a bylo na ni napipetováno 200 µl EB pufru. Po 1minutové inkubaci při laboratorní teplotě byla mikrozkušavka

s kolonou centrifugována 1 minutu při 14 000 g. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C

4.11. Izolace DNA z tkání

Izolace DNA z tkání byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo).

Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo nastříháno 200 mg tkáně, byly přidány skleněné kuličky (0,5 mm) a 4 zirkonové kuličky (2 mm) a připipetováno 180 µl ATL pufru. Vzorky byly homogenizovány v beadbeateru (MP Fast Prep®-24 Instrument) po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s. Mikrozkušavky byly centrifugovány 10 sekund a ke vzorkům bylo připipetováno 20 µl proteinázy K a následně probíhala za pravidelného míchání inkubace v termobloku při 56 °C po dobu 1 hodiny. Vzorky byly centrifugovány 10 sekund, poté bylo připipetováno 200 µl AL pufru a obsah byl zvortexován. Následně bylo připipetováno 200 µl 96% EtOH a vzorky byly zvortexovány a centrifugovány po dobu 45 s. Supernatant byl přenesen na Mini spin kolonu a mikrozkušavky byly centrifugovány 3 minuty při 14 000 g. Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit, na kolonu bylo napipetováno 500 µl AW1 pufru a zkumavky byly centrifugovány 1 minutu při 14 000 g. Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit, na kolonu bylo napipetováno 500 µl AW2 pufru a mikrozkušavky byly centrifugovány 1 minutu při 14 000 g. Sběrné zkumavky byly nahrazeny novými 1,5 ml mikrozkušavkami a na kolonu bylo napipetováno 200 µl AE pufru. Po 1minutové inkubaci při laboratorní teplotě byly mikrozkušavky centrifugovány 1 minutu při 8 000 g. Získaná DNA byla skladována při teplotě -20 °C.

4.12. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Celkový objem reakční směsi pro každou reakci byl 20 µl u primární a sekundární PCR (Tabulka 2). Pomocí nested PCR byla provedena amplifikace 3' konce genu malé ribozomální podjednotky, celé sekvence ITS a 5' konce genu velké ribozomální podjednotky (cca 320 bp, Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996) (Tabulka 3). Každá reakce zahrnovala pozitivní a negativní kontrolu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *E. cuniculi* genotyp III (GenBank KJ577583) vyizolovaná z tkáňové kultury Vero E6, která je dlouhodobě kultivovaná *in vitro* v Laboratoři veterinární a medicínské protistologie BC AV ČR.

Amplifikační program se sestával z kroků zahrnujících počáteční denaturaci při 94 °C po dobu 3 minut, 35 cyklů skládajících se z denaturace při 94 °C po dobu 45 s, specifické nasedací teploty primerů při 58 °C pro primární a 55 °C pro sekundární reakci po dobu 45 s, extenze při 60 °C po dobu 60 s a závěrečného dosyntetizování řetězce při 72 °C po dobu 10 min.

Tabulka 2: Reakční směs pro nested PCR (1 reakce)

reagencie	množství	
AccuPower® Taq PreMix (Bioneer, Jižní Korea)	Taq DNA polymeráza	1 U
	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM každý
	reakční pufr (s 1,5 mM MgCl ₂)	1×
deionizovaná H ₂ O (Top-Bio, Česká republika)	17,0 µl	
forward primer (10 µM, Generi Biotech, Česká republika)	0,5 µl	
reverse primer (10 µM, Generi Biotech, Česká republika)	0,5 µl	
DNA	2,0 µl	
celkový objem	20,0 µl	

Tabulka 3: Nukleotidové sekvence specifických primerů *Encephalitozoon* spp. (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996)

Primární primery

INT580F 5' - TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT - 3'

INT580R 5' - TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG - 3'

Sekundární primery

MSP-3 5'- GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G) (C,T)TAT - 3'

MSP-4A 5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT - 3'

4.13. Gelová elektroforéza

Délka DNA fragmentů byla ověřena pomocí gelové elektroforézy za použití 1% agarózového gelu, který obsahoval 0,00002 % ethidium-bromidu.

Postup:

Agaróza (Biotech) byla smíchána s 1× TAE puforem (24,2% vodný roztok Tris báze, 5,7% vodný roztok ledové kyseliny octové, 10% vodný roztok 0,5 M EDTA, pH 8,00) a zahřívána v Erlenmeyerově baňce v mikrovlnné troubě do úplného

rozpuštění gelu. Erlenmeyerova baňka se vzniklým roztokem byla následně ochlazená pod tekoucí studenou vodou. Do baňky byl přidán roztok ethidium bromidu. Agarózový gel byl nalit do nosiče, byly vloženy hřebeny a gel byl ponechán ztuhnout. Ztuhlý gel byl vložen do elektroforetické vany s 1% TAE pufrům tak, aby starty ležely u záporné elektrody a byl z něj vyjmut hřeben. Do první jamky v gelu bylo napipetováno 10 μ l 100 bp DNA Ladderu (O'Gene Ruler™, Biogen, Londýn, Velká Británie) a do zbylých jamek 20 μ l sekundárního PCR produktu. Elektroforéza probíhala při 90 V (EC300XL, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) než došlo k separaci všech fragmentů.

4.14. Kvantitativní real time PCR (qRT PCR)

Pro stanovení počtu spor *E. cuniculi* v získaných vzorcích tkání či orgánů u sledovaných skupin myši byla použita kvantifikace pomocí real time PCR za použití specifických primerů amplifikujících část genu kódujícího malou podjednotku rRNA *Encephalitozoon* spp. a specifické TaqMan próby (268 bp; Wolk et al. 2002). Jako gen s konstantní expresí (housekeeping gene, HKG) byl použit gen pro β -aktin myši (137 bp; Dai et al. 2009) (Tabulka 4).

Množství reagensů pro reakční směs je uvedeno v tabulce 5. Amplifikace probíhala na přístroji Light cycler 480 (Roche, Indianapolis, IPA, USA). Monitoring a výsledky reakce byly provedeny pomocí programu Light cycler 480 Software Release 1.5.0 SP4 (Roche).

Použitá kalibrační křivka byla sestavena pomocí vyizolované DNA ze vzorků, které obsahovaly známý počet spor *E. cuniculi* genotyp II (10^3 až 10^8) v 200 mg trusu tak, že ze vzorků se známým počtem kopií myších genomů byla DNA ředěna desítkovou řadou (Mynářová 2015).

Amplifikační program pro qRT PCR sestával z počáteční denaturace při 95 °C po dobu 3 minut, amplifikace (45 cyklů sestávajících z denaturace při 95 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při teplotě 60 °C po dobu 10 s a extenze při 72 °C po dobu 16 s), závěrečné extenze při 55-85 °C trvající 16 s rychlostí 20 °C/s a chlazení 40 °C po dobu 30 s (Wolk et al. 2002).

Tabulka 4: Nukleotidové sekvence specifických primerů a prób:*Encephalitozoon* spp. (Wolk et al. 2002)

RT-ENC-F	5' - GTC CGT TAT GCC CTG AGA - 3'
ET-ENC-R	5' - ACA GCA GCC ATG TTA CGA CT - 3'
Probe1-ENC_FITC	5' - red 640-TGG ACG AAG ATT GGA AGG TCT GAG TC -phosphate-3'

β-aktin (Dai et al. 2009)

B-actinF	5'- AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC - 3'
B-actinR	5'- CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT - 3'
B-actin probe	5'- FAM CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC BHQ1 - 3'

Tabulka 5: Reakční směs pro RealTime PCR (1 reakce)

reagencie	množství
FastStart Universal Probe Master 2× (Roche, USA)	12,5 μl
deionizovaná H ₂ O (Top-Bio, Česká republika)	5,0 μl
forward primer (10 μM) (Generi Biotech, Česká republika)	1,0 μl
reverse primer (10 μM) (Generi Biotech, Česká republika)	1,0 μl
próba (10 μM) (Generi Biotech, Česká republika)	0,5 μl
DNA	5,0 μl
celkem	25,0 μl

Každá série qRT PCR zahrnovala negativní kontrolu a vzorky o známých koncentracích β-aktinu ($1,5 \times 10^5$) a *Encephalitozoon cuniculi* ($1,0 \times 10^6$), které byly použity jako standardy. Vzorky byly testovány v triplicátech. Pro výpočet koncentrace spor na 1 g tkáně byla použita automaticky odečítaná hodnota CT (threshold cycle). Množství kopií genu kódujícího malou podjednotku rRNA *E. cuniculi* genotyp II na 1 g testované tkáně byl vypočten dle vzorce - (průměrný počet kopií β-aktinu na 1 g konkrétní tkáně (tabulka 6) × průměrná naměřená CT hodnota pro *E. cuniculi* v testovaném vzorku) / průměrná naměřená CT hodnota pro β-aktin v testovaném vzorku.

Experimentálně stanovený počet kopií genu pro β-aktin v jednotlivých orgánech myši byl odvozen na základě Sak et al. (2017). Výsledné hodnoty kopií genů pro β-aktin ve tkáních a játrech jsou uvedeny v tabulce 6.

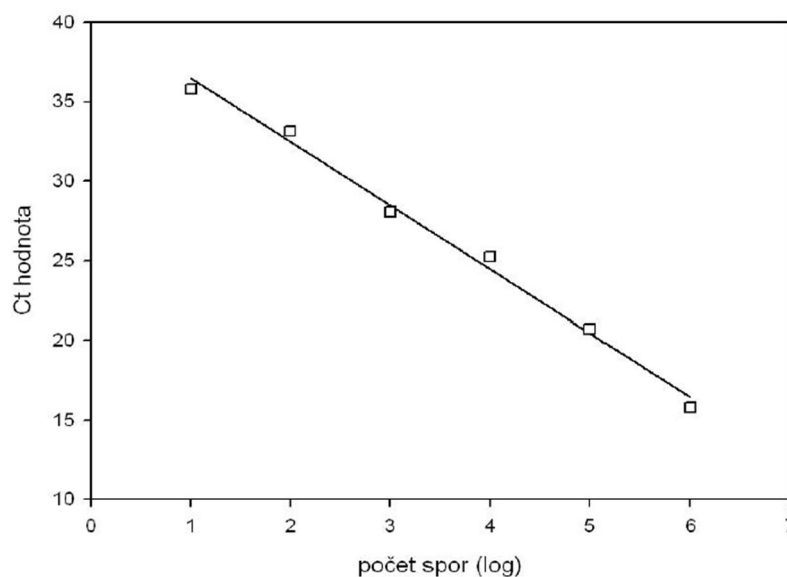
Tabulka 6: Průměrný počet kopií β -aktinu na 1 g tkáně jater, stehenního svalu a stehenního svalu s kostí u myši

orgán, tkáň	průměrný počet kopií β aktinu v 1 g tkáně
játra	$3,71 \times 10^7$
sval	$4,34 \times 10^5$
sval s kostí	$2,96 \times 10^5$

Počet spor mikrosporidií v jednotlivých analyzovaných vzorcích byl vypočítán ze získaných CT hodnot. Množství spor na 1 g tkáně bylo vypočteno na základě známého počtu kopií genu pro β -aktin v 1 gramu tkáně, či orgánu.

Výsledná kalibrační křivka pro qRT PCR jako přímka závislosti CT hodnoty na počtu spor je uvedena na obrázku 2. Hodnota regresního koeficientu této přímky dosáhla hodnoty 0,99 (Mynářová 2015).

Obrázek 2: Kalibrační křivka pro qRT PCR



4.15. Statistické vyhodnocení výsledků

Pro posouzení vlivu zánětu v postižených tkáních na migraci spor mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* byla srovnána frekvence množství spor v končetinách u kontrolních a pokusných skupin myši pomocí T-testu. Shodnost rozptylů testovaných souborů byla ověřena F-testem na hladině spolehlivosti $\alpha=0,05$ a nižší.

5. Výsledky

5.1. Přítomnost spor *E. cuniculi* v tkáních BALB/c myší v akutní fázi infekce

Z výsledků uvedených v tabulce 7 je patrné, že u pokusné skupiny imunokompetentních BALB/c myší došlo po indukci zánětu 50 μ l Freundova adjuvans v pravé noze k soustředění mikrosporidií v této oblasti, což je patrné 14. a 28. den po infekci (DPI), kdy hodnoty na 1 gram tkáně dosahovaly $7,8 \times 10^2$ a $3,8 \times 10^1$ spor, nicméně tento rozdíl nebyl oproti kontrole statisticky významný. U kontrolní skupiny BALB/c myší, která byla injikována odpovídajícím množstvím sterilního PBS lze pozorovat výskyt spor v obou nohách, přičemž rozdíl v množství spor na gram tkáně v pravé a levé noze nebyl statisticky významný.

Po sekundární indukci zánětu v levé noze u pokusné skupiny 28. DPI došlo k přesunu mikrosporidií do ložiska zánětu, což je zejména patrné z výsledků 42. a 56. DPI, kdy množství spor na 1 gram tkáně dosahovalo hodnot $3,5 \times 10^5$ a $3,2 \times 10^1$, oproti pravé noze, kde bylo detekováno $3,0 \times 10^2$ respektive 0 spor na gram tkáně. Nicméně ani tento rozdíl nebyl statisticky významný. Výskyt mikrosporidií byl potvrzen také histologicky 42. DPI v pravé indukované noze a játrech (Obrázek 3). U kontrolní skupiny byl pozorován trend postupného vymizení mikrosporidií, které byly ve tkáních a játrech detekovány 35. DPI a 42. DPI pouze v játrech. Až do konce experimentu nebyly mikrosporidie ve vybraných tkáních a orgánech detekovány.

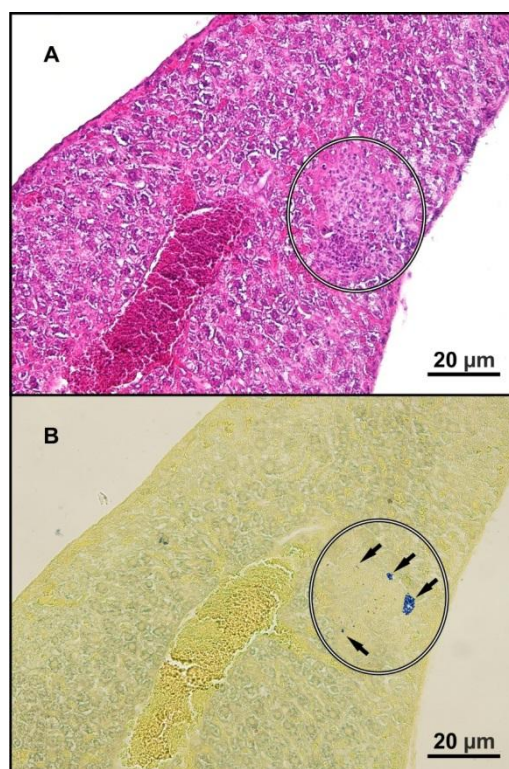
Indukce zánětu nicméně vedla k signifikantně delšímu výskytu mikrosporidií v tkáních pokusné skupiny ($p < 0,05$) naznačující pozitivní korelaci mezi výskytem zánětu a přetrváváním detekovatelné infekce (Tabulka 7).

Tabulka 7: Maximální množství spor *E. cuniculi* na 1 gram tkáně ve vybraných orgánech a tkáních u skupin BALB/c myši v akutní fázi infekce

		Dny po infekci									
		7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Kontrolní skupina	Levá noha	0	1,6E3	1,2E3	4,9E3	1,3E1	0	0	0	0	0
	Pravá noha	4,1E1	1,6E1	3,3E3	6,4E3	1,4E1	0	0	0	0	0
	Játra	8,3E3	1,5E4	1,2E5	1,0E4	2,5E3	3,8E3	0	0	0	0
Pokusná skupina	Levá noha	0	0	0	0	0	3,5E5	0	3,2E1	2,0E1	2,4E1
	Pravá noha	4,6E2	7,8E2	0	3,8E1	2,0E1	3,0E2	3,8E0	0	2,3E1	6,6E0
	Játra	1,8E4	2,1E3	0	5,1E2	3,5E2	1,6E3	1,6E3	8,3E1	2,4E1	2,9E2

červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu; žluté pole – pozitivní záchyt mikrosporidií ve vzorku

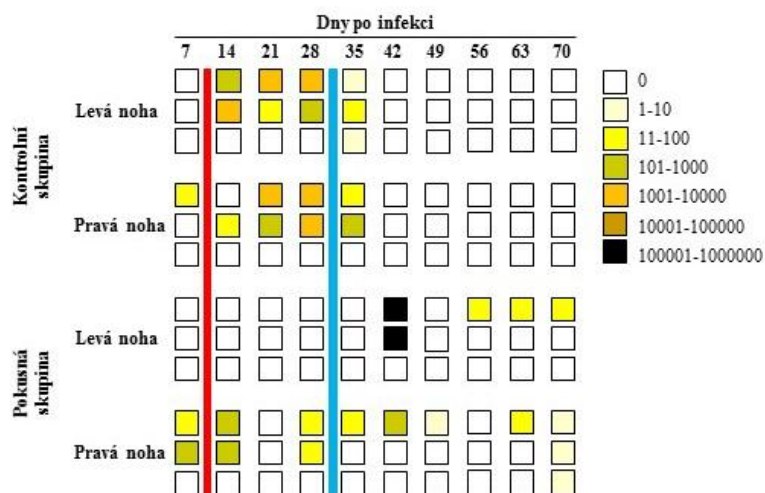
Obrázek 3: Mikroskopické detekce zánětlivé reakce v játrech barvených hematoxylinem-eosinem (A) a spor mikrosporidií ve svalovině bavené Grammovým modifikovaným barvením podle Brown-Brenna (B) BALB/c myši 42. DPI; kruh – ložisko zánětu; šipky – spory mikrosporidií na histologických řezech jater



Srovnáním frekvence výskytů spor mikrosporidií v končetinách kontrolní a pokusné skupiny (Obrázek 4) bylo zjištěno, že zatímco nebyl rozdíl mezi četností záchytu mikrosporidií v nohách kontrolní skupiny a rovněž mezi výskytem

mikrosporidií v levých nohách kontrolní a pokusné skupiny, byl signifikantní rozdíl mezi frekvencí detekce mikrosporidií v pravé noze s indukovaným zánětem 7. DPI a pravou nohou kontrolní skupiny ($p < 0,05$). Navíc po sekundární indukci zánětu v levé noze 28. DPI došlo nárůstu počtu spor v této noze 42. DPI u dvou ze tří zvířat v experimentu.

Obrázek 4: Frekvence výskytu a množství spor *E. cuniculi* na 1 gram svaloviny u skupin BALB/c myši v akutní fázi infekce

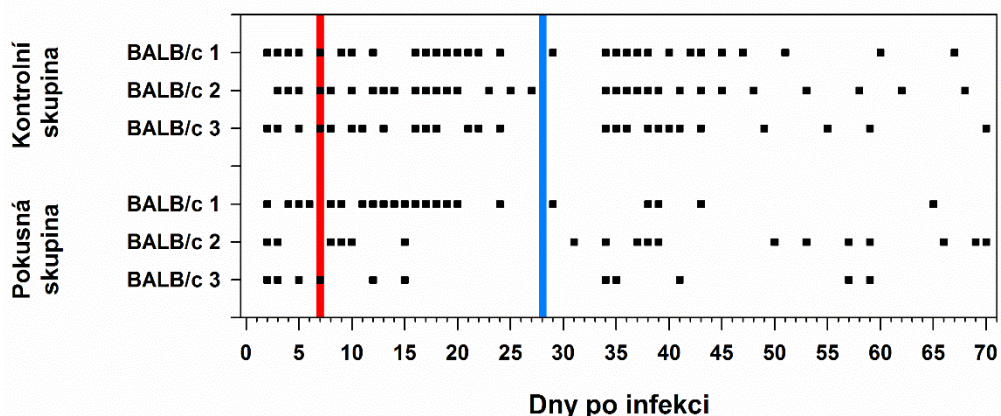


červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu; barevná pole – pozitivní záchyt mikrosporidií ve vzorku podle množství škály

5.2. Přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* v trusu u BALB/c myši v akutní fázi infekce

U obou skupin BALB/c myši v akutní fázi infekce byly mikrosporidie detekovány od 2. DPI (Obrázek 5). Při indukci zánětu Freundovým adjuvans v pravé noze 7. DPI došlo u dvou zvířat pokusné skupiny k přerušení vylučování spor v trusu po dobu 15 dnů a po sekundární indukci zánětu byly spory v trusu přítomny nepravidelně, zatímco u kontrolní skupiny injikované 7. DPI sterilním PBS lze pozorovat přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* v trusu myši po celou dobu experimentu. Navíc po celou dobu experimentu byla DNA mikrosporidií významně méně často detekována u pokusné skupiny.

Obrázek 5: Průběh vylučování spor *E. cuniculi* genotyp II u BALB/c myši v akutní fázi infekce



červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu

5.3. Přítomnost spor *E. cuniculi* v tkáních BALB/c myši v chronické fázi infekce

Při indukci zánětu v chronické fázi infekce 56. DPI (Tabulka 8) došlo u experimentální skupiny myši k reaktivaci infekce a mikrosporidie byly detekovány v obou nohách nezávisle na místě indukce zánětu, zatímco před intramuskulární injekcí Freundova adjuvans nebyla přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* prokázána. Navíc došlo k znovuobjevení mikrosporidií v játrech, i když maximální detekované množství bylo 10× nižší než v případě indukce zánětu v akutní fázi infekce (Tabulka 8).

Ani sekundární indukce zánětu neměla přímý vliv na migraci mikrosporidií do zánětlivého ložiska, jako bylo pozorováno v předchozím pokusu v akutní fázi (Tabulka 8). U kontrolní skupiny imunokompetentních myši v chronické fázi infekce nebyly mikrosporidie detekovány ve vybraných orgánech a tkáních po celou dobu infekce.

Z výsledků je patrné, že je indukce zánětu schopna vyvolat aktivaci latentní mikrosporidie u imunokompetentních jedinců, kdy došlo k signifikantnímu nárůstu počtu spor u indukované skupiny ve srovnání s kontrolními myši ($p < 0,05$).

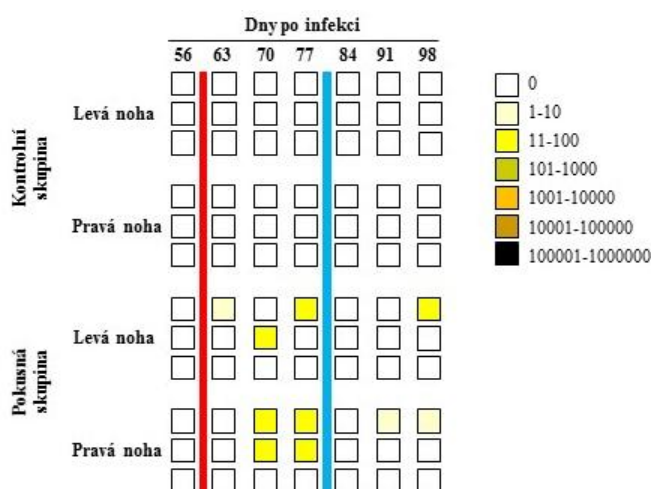
Tabulka 8: Maximální množství spor *E. cuniculi* na 1 gram tkáně ve vybraných orgánech a tkáních u skupin BALB/c myši v chronické fázi infekce

		Dny po infekci						
		56	63	70	77	84	91	98
Kontrolní skupina	Levá noha	0	0	0	0	0	0	0
	Pravá noha	0	0	0	0	0	0	0
	Játra	0	0	0	0	0	0	0
Pokusná skupina	Levá noha	0	3,3E0	7,2E1	2,3E1	0	0	1,8E1
	Pravá noha	0	0	3,0E1	6,3E1	0	9,4E0	2,9E0
	Játra	0	5,0E2	4,1E2	6,5E0	0	3,6E0	2,8E1

červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu; **žluté pole** – pozitivní záchyt mikrosporidií ve vzorku

U imunokompetentních myši BALB/c s indukovaným zánětem v chronické fázi infekce bylo pozorováno zvýšení detekce a množství spor v končetinách pokusné skupiny (Obrázek 6) oproti kontrolní skupině, kde byla všechna zvířata po celou dobu experimentu negativní. Nicméně rozdíly ve frekvenci záchytu v indukované a neindukované končetině u pokusné skupiny nebyly statisticky významné na 5% hladině významnosti.

Obrázek 6: Frekvence výskytu a množství spor *E. cuniculi* na 1 gram svaloviny u skupin BALB/c myši v chronické fázi infekce



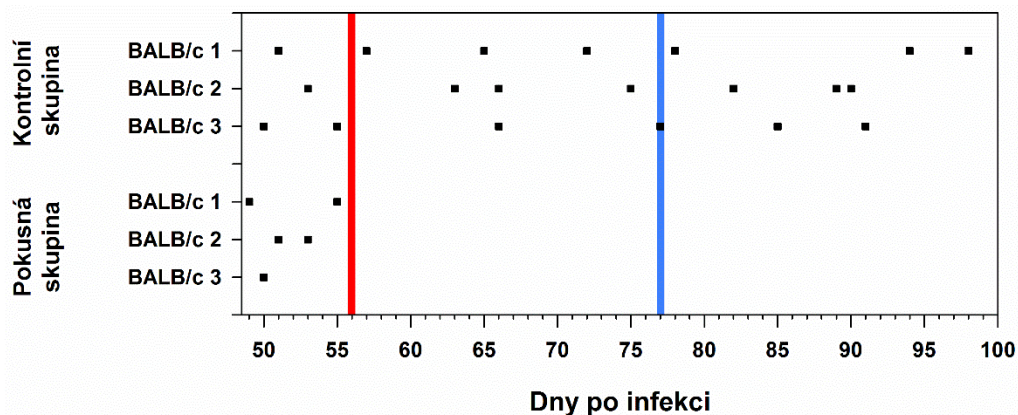
červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu; **barevná pole** – pozitivní záchyt mikrosporidií ve vzorku podle množství škály

5.4. Přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* v trusu u BALB/c myši v chronické fázi infekce

Podobně jako u pokusu prováděného v akutní fázi infekce lze pozorovat pokles vylučování spor trusem u skupiny s indukovaným zánětem (Obrázku 7). Ačkoli až do 55. DPI byla přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* v trusu prokázána u obou skupin imunokompetentních myši, po indukci zánětu již k vylučování mikrosporidií trusem nedocházelo.

U kontrolní skupiny BALB/c myši je patrné, že sledovaní jedinci vylučovali nepravidelně po celou dobu chronické infekce s maximální periodou 16 dní (Obrázek 7).

Obrázek 7: Průběh vylučování spor *E. cuniculi* genotyp II u BALB/c myši v chronické fázi infekce



červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu

5.5. Přítomnost spor *E. cuniculi* v tkáních MMF KO myši v akutní fázi infekce

U myši deficitních pro migrační faktor makrofágů byly pozorovány podobné výsledky jako u imunokompetentních myši v akutní fázi infekce. Sedmý den po indukci zánětu (14. DPI) byl *E. cuniculi* detekován v pravé noze a jeho množství na gram tkáně dosahovalo hodnot $7,4 \times 10^6$, přičemž současně došlo k navýšení maximálního počtu spor v játrech indukovaných zvířat až na hodnotu $1,2 \times 10^5$ (21. DPI). S postupem času maximální množství spor na gram tkáně klesalo (Tabulka 9). Po sekundární indukci zánětu v levé noze byly spory mikrosporidií detekovány v levé noze na konci pokusu 49. DPI, dosahující hodnot $1,6 \times 10^4$ spor na

1 gram tkáně, nicméně v porovnání s pravou nohou nebylo množství mikrosporidií signifikantně vyšší ($2,4 \times 10^3$ spor na 1 gram tkáně). I po sekundární indukci zánětu došlo k navýšení maximálních hodnot spor v játrech.

U kontrolní skupiny nebyl, podobně jako u BALB/c myši v akutní fázi infekce, pozorován žádný trend a mikrosporidie byly detekovány 14. a 21. DPI v obou končetinách a játrech a následně byl výskyt víceméně náhodný a sporadický.

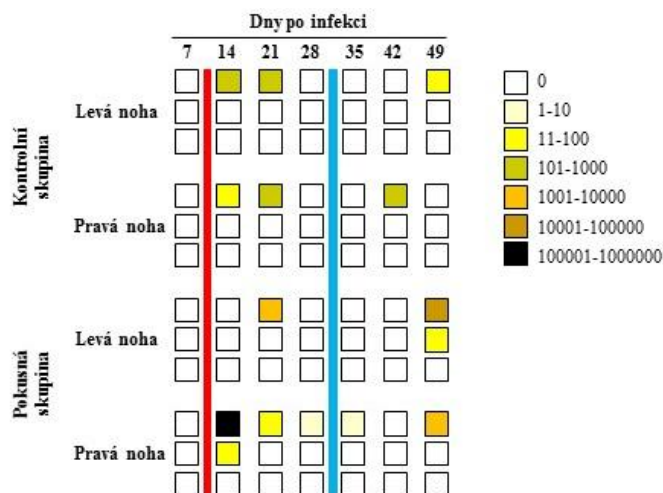
Tabulka 9: Maximální hodnota spor *E. cuniculi* na 1 gram tkáně ve vybraných orgánech a tkáních u skupin MMF KO myši v akutní fázi infekce

		Dny po infekci						
		7	14	21	28	35	42	49
Kontrolní skupina	Levá noha	0	2,0E2	2,2E2	0	0	0	7,1E1
	Pravá noha	0	7,8E1	3,5E2	0	0	4,6E2	0
	Játra	0	2,3E3	3,8E3	4,3E2	3,8E3	0	1,8E1
Pokusná skupina	Levá noha	0	0	1,1E2	0	0	0	1,6E4
	Pravá noha	0	7,4E6	3,4E1	2,6E0	0	0	2,4E3
	Játra	2,7E2	6,2E4	1,2E5	3,1E3	6,9E2	1,9E3	1,5E4

červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu; žluté pole – pozitivní záchyt mikrosporidií ve vzorku

Z obrázku 8 je patrné, že frekvence záchytu mikrosporidií ve vzorcích svaloviny kontrolní skupiny je náhodná a DNA byla zachycena vždy jen u jednoho zvířete ze tří vyšetřovaných v některých časových intervalech s množstvím pod 1000 spor na gram tkáně. Oproti tomu indukce zánětu vedla k záchytu mikrosporidií téměř každý sledovaný interval alespoň u jednoho zvířete ze skupiny vyjma 42. DPI, přičemž indukce zánětu 7. a 28. DPI vedla k nárůstu počtu spor v indukované končetině u dvou zvířat (14. DPI pravá noha a 49. DPI levá noha; Obrázek 8). Celková frekvence záchytu mikrosporidií byla nejvyšší u zvířat s primárně indukovaným zánětem ($p < 0,05$).

Obrázek 8: Frekvence výskytu a množství spor *E. cuniculi* na 1 gram svaloviny u skupin MMF KO myši v akutní fázi infekce

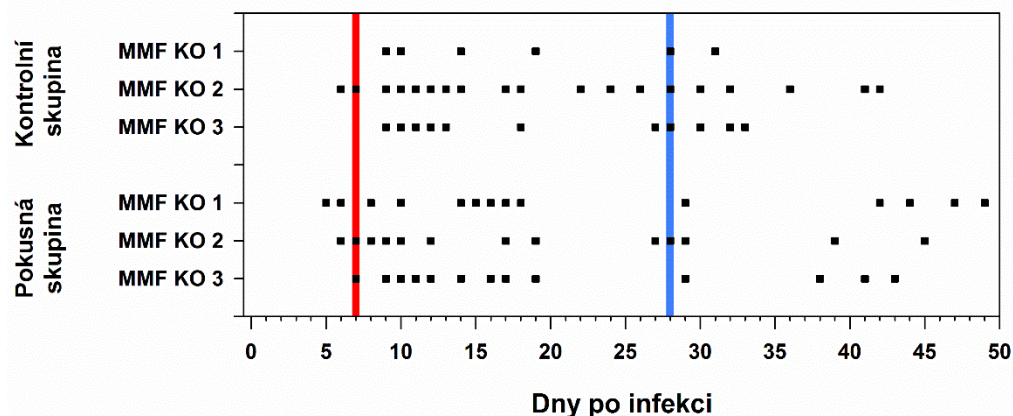


červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu; **barevná pole** – pozitivní záchyt mikrosporidií ve vzorku podle množství škály

5.6. Přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* v trusu u MMF KO myši v akutní fázi infekce

Z výsledku sledování přítomnosti specifické DNA *E. cuniculi* v trusu myši deficitních pro migrační faktor makrofágů je pro obě skupiny zjevné, že byly mikrosporidie vylučovány nepravidelně (Obrázek 9). U pokusné skupiny lze však pozorovat, že pokles frekvence vylučování mikrosporidií trusem částečně negativně koreloval s jejich výskytem ve sledovaných tkáních. Mikrosporidie byly poprvé zachyceny u pokusné skupiny 5. DPI a u kontrolní skupiny 6. DPI, což je o 3 až 4 dny později, než tomu bylo u BALB/c myši v akutní fázi infekce (Obrázek 5).

Obrázek 9: Průběh vylučování spor *E. cuniculi* genotyp II u MMF KO myši v akutní fázi infekce



červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu

5.7. Přítomnost spor *E. cuniculi* v tkáních SCID myši v akutní fázi infekce

U imunodeficitních myši byly mikrosporidie detekovány již před vyvoláním zánětu. U kontrolní skupiny v játrech, zatímco u pokusné skupiny ve všech sledovaných orgánech (Tabulka 10). Po indukci zánětu (Obrázek 10) došlo u experimentální skupiny k signifikantnímu ($p < 0,05$) navýšení počtu spor v pravé noze 21. DPI na hodnotu $7,8 \times 10^5$ spor na gram tkáně oproti noze levé, kde hodnoty dosahovaly $3,5 \times 10^5$ spor na gram tkáně. Navíc došlo k celkovému nárůstu počtu spor v obou končetinách a játrech indukovaných zvířat ve srovnání s kontrolní skupinou myši. Přítomnost spor mikrosporidií v ložisku zánětu v pravé noze byla pozorována i histologicky (Obrázek 11). Ke konci experimentu byl však počet spor v obou končetinách podobný. Hodnoty spor na gram tkáně u kontrolní skupiny SCID myši byly po celou dobu experimentu přibližně stejné pro obě končetiny, nejvyšších hodnot dosahovaly ke konci pokusu 28. DPI ($3,9 \times 10^6$ spor na 1 gram tkáně v levé noze a $5,9 \times 10^5$ spor na 1 gram tkáně v noze pravé).

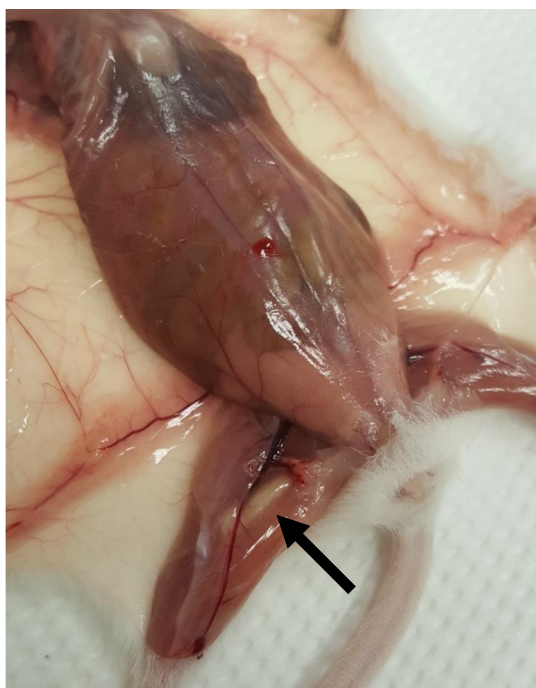
U SCID myši byly na rozdíl od ostatních použitých skupin myši pozorovány klinické příznaky mikrosporidie zahrnující naježenou srst, nahrbený hřbet a kachexie, zejména na konci sledovaného období. Nicméně průjem jakožto jeden z hlavních příznaků mikrosporidie nebyl pozorován ani u těchto myši.

Tabulka 10: Maximální hodnota spor *E. cuniculi* na 1 gram tkáně ve vybraných orgánech a tkáních u skupin SCID myši v akutní fázi infekce

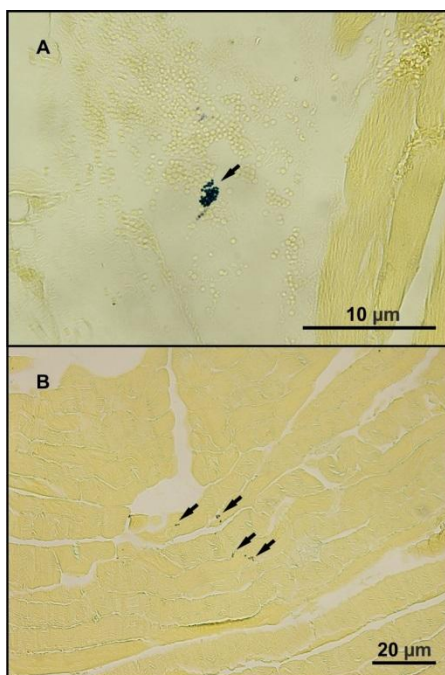
		Dny po infekci			
		7	14	21	28
Kontrolní skupina	Levá noha	0	1,5E3	2,6E4	3,9E6
	Pravá noha	0	7,4E2	2,9E4	5,9E5
	Játra	4,5E4	3,1E5	3,3E6	8,9E7
Pokusná skupina	Levá noha	1,3E1	2,7E3	3,5E5	1,6E5
	Pravá noha	3,0E3	2,2E2	7,8E5	1,3E5
	Játra	5,7E4	2,7E5	8,7E7	1,8E7

červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **žluté pole** – pozitivní záchyt mikrosporidií ve vzorku

Obrázek 10: Ilustrační obrázek indukce zánětlivé reakce v pravém stehenním svalu (šipka) u SCID myši.

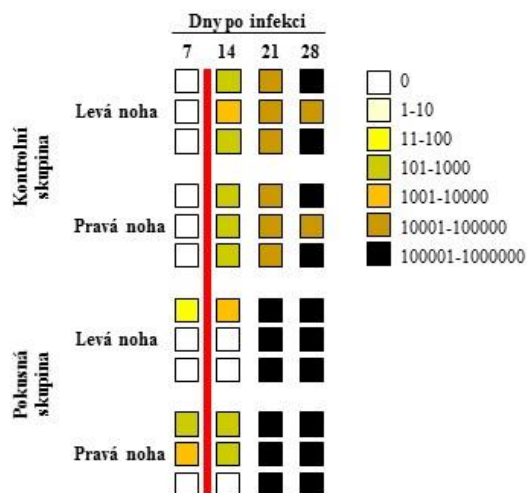


Obrázek 11: Mikroskopická detekce spor mikrosporidií (šipky) na histologických řezech stehenního svalu SCID myši s indukovaným zánětem 21. DPI barvené Grammovým modifikovaným barvením podle Brown-Brenna. Měřítko v obrázku.



Při porovnávání frekvence výskytu mikrosporidií u imunodeficitních SCID myši došlo k neočekávanému poklesu záchytu mikrosporidií ve svalovině pokusné skupiny, kdy mikrosporidie byly detekovány pouze u jednoho zvířete (neindukovaná noha) či dvou ze skupiny (indukovaná noha) ve srovnání s kontrolní skupinou, kde byla všechna zvířata pozitivní (Obrázek 12). K obratu došlo až 21. DPI, tzn. 14 dní po indukci zánětu, kdy všechna indukovaná zvířata měla ve svalech minimálně 10^6 spor na gram tkáně, zatímco zvířata v kontrolní skupině měla v tento časový interval o jeden řád méně spor na gram svaloviny.

Obrázek 12: Frekvence výskytu a množství spor *E. cuniculi* na 1 gram svaloviny u skupin SCID myši v akutní fázi infekce

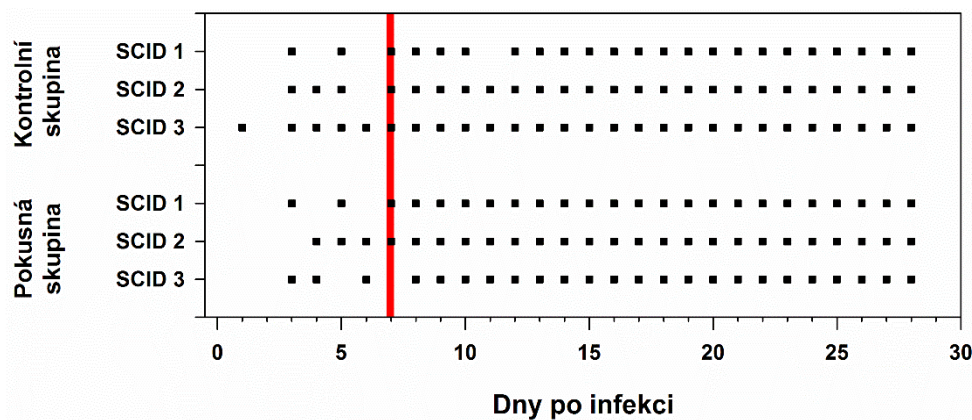


červená linka – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu; **modrá linka** – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do levého stehenního svalu; **barevná pole** – pozitivní záchyt mikrosporidií ve vzorku podle množství škály

5.8. Přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* v trusu u SCID myši v akutní fázi infekce

Specifická DNA *E. cuniculi* byla u kontrolní skupiny detekována od 1. DPI, ale pouze u jednoho zvířete (Obrázek 13). U většiny zvířat byly mikrosporidie v trusu zaznamenány 3. DPI. Spory byly trusem nadále vylučovány po celou dobu infekce až do konce experimentu bez ohledu na indukci zánětu.

Obrázek 13: Průběh vylučování spor *E. cuniculi* genotyp II u SCID myši v akutní fázi infekce



červené pole – intramuskulární injekce všech zvířat ve skupině do pravého stehenního svalu

6. Diskuze

Mikrosporidie, obligátní intracelulární eukaryotní paraziti, jsou známy pro svou schopnost infikovat široké spektrum živočichů zahrnující protista, obratlovce a bezobratlé. Recentně je známo přibližně 1500 druhů. Tyto organizmy jsou studovány již více než 150 let převážně pro svou schopnost způsobovat rozsáhlá poškození hostitelského organismu, nicméně v současné době jsou stále častěji studovány pro svou schopnost způsobovat asymptomatická onemocnění s nejednoznačnou etiologií (Vávra et Lukeš 2013).

Spory mikrosporidií jsou vylučovány trusem, močí, nebo ve sputu infikovaných jedinců, tudíž bývají lidé často infikováni pozřením kontaminované potravy nebo vody a méně často inhalací infekčních spor (Kicia et al. 2019). Didier et Weiss (2011) uvádí, že je možné nalézt mikrosporidie prakticky po celém světě a způsob přenosu určuje počáteční místo infekce, tudíž bývají nejčastěji napadány buňky gastrointestinálního a respiračního traktu. Toto lze pozorovat i v této práci, jelikož u všech skupin perorálně infikovaných myší, byly mikrosporidie nejdříve detekovány v trusu a až s postupující infekcí ve vybraných tkáních a orgánech.

Intenzita infekce, včetně množství a frekvencí vylučovaných spor, způsobená *E. cuniculi* se odvíjí od věku a zdravotního stavu infikovaného jedince stejně jako závisí na druhu a genotypu infekčního agens. Výsledky této práce odpovídají údajům publikovaným Sakem et al. (2017a, b) a Kotkovou et al. (2013), tedy že imunokompetentní BALB/c myši vylučovaly spory *E. cuniculi* s výrazně nižší frekvencí než imunodeficitní SCID myši. Sporadická přítomnost spor *E. cuniculi* v trusu infikovaného jedince byla prokázána i v dalších studiích (Kicia et al. 2018a,b, Kotková et al. 2013, 2018, Sak et al. 2011a,b). S frekvencí vylučování souvisí i množství vyloučených spor. Pozitivní korelace mezi frekvencí vylučování a intenzitou infekce byla pozorována u BALB/c a SCID myší, zatímco BALB/c myši vylučovaly intermitentně s intenzitou infekce dosahující $3,2 \times 10^6$, SCID myši vylučovaly téměř denně s intenzitou dosahující $1,2 \times 10^8$ spor na gram trusu (Kotková et al. 2013, Sak et al. 2017a,b). Obdobně bylo prokázáno, že dítě bez klinických příznaků onemocnění vylučovalo $1,2 \times 10^5$ spor na gram stolice (Mungthin et al. 2005), kdežto imunodeficitní jedinec může vylučovat až $4,4 \times 10^8$ na gram průměrné stolice (Goodgame et al. 1999).

Z ~1500 druhů popsaných mikrosporidií je 15 druhů označováno za původce onemocnění u lidí, které jsou schopny šířit se celým hostitelským organizmem (Didier et Khan 2014, Vávra et Lukeš 2013). Mikrosporidie rodu *Encephalitozoon*, infikující savčí epiteliální a endotelové buňky, fibroblasty, makrofágy a astrocyty, patří mezi nejčastější příčiny lidských mikrosporidiových infekcí (Didier et Khan 2014, Wasson et Peper 2000, Weber et Bryan 1994). *Encephalitozoon cuniculi*, patřící mezi nejlépe popsané a prostudované druhy savčích mikrosporidií, způsobuje u savců akutní, chronické i latentní infekce (Canning et al. 1986, Didier et al. 2000, Franzen 2008, Shadduck 1971, Wright et Craighead 1922). V minulosti bývaly mikrosporidiové infekce nejčastěji spojovány s imunodeficiencí, proto bývaly často diagnostikovány u pacientů trpících AIDS, příjemců orgánů a dětí s ještě neúplně vyvinutou imunitou. Díky moderním diagnostickým metodám byly mikrosporidie detekovány u imunokompetentních jedinců, například u cestovatelů, diabetiků, těhotných žen a seniorů (del Aguila et al. 2001, Didier et Khan 2014, Enriquez et al. 1998, Lopez-Velez et al. 1999, Lores et al. 2002, Müller et al. 2001, Van Gool et al. 1997). Kotková et al. (2013) experimentálně prokázala schopnost reaktivace latentní mikrosporidie u imunokompetentních hostitelů. Podobný jev byl sledován i v této studii, kdy u imunokompetentních BALB/c myši došlo po indukci zánětu k reaktivaci mikrosporidiové infekce a spory byly detekovány v námi sledovaných tkáních a orgánech. Mechanismus reaktivace mikrosporidií zánětem zůstává nicméně nejasný. Lze předpokládat, že lokální indukce chronického zánětu mohla vést ke snížení kapacity imunitního systému, který předtím udržoval množství mikrosporidií pod detekčním limitem používaných metod (qRT PCR). Obdobně Bannoura et al. (2018) popsali u čtyřletého dítěte reaktivaci latentní infekce *Toxoplasma gondii* aplikací steroidních hormonů proti encefalomyelitidě.

Na rozdíl od studií provedených na imunodeficitních pacientech, kdy infekce způsobené *E. cuniculi* jsou doprovázeny klinickými příznaky jako například průjemy a malabsorbce živin, hepatitidou, bronchitidou, pneumonií či encefalitida (Franzen et Müller 2001, Müller et al. 2001), nebyly u žádné z imunodeficitních SCID myši zaznamenány klinické příznaky mikrosporidie až do 28 DPI, kdy byly myši usmrceny.

Mikrosporidie byly v tomto experimentu u imunodeficitních myši detekovány již před indukci zánětu, či intramuskulární injekcí sterilním PBS 7. DPI. Jelikož se

však jedná o myši s nefunkčními T a B lymfocyty, lze tento jev předvídat. Indukce zánětu u pokusné skupiny vedla ke zvýšenému výskytu spor v místě zánětu, zatímco u kontrolní skupiny bylo množství spor na gram tkáně v obou končetinách přibližně stejné. Ačkoliv nejvyšší hodnoty spor ve svalových tkáních byly naměřeny ke konci experimentu, lze tento stav přisuzovat systémovému rozšíření infekce tak, jak to popsala Kotková et al. (2013).

K šíření *E. cuniculi* po celém hostitelském organismu mohou přispět i makrofágy. Bylo prokázáno, že vývoj tohoto parazita je možný i v těchto buňkách, což se může podílet na systémových infekcích. Makrofágy se však zároveň mohou podílet i na jejich eliminaci (Schmidt et Shadduck 1984, Widner 1975). Indukce zánětu může napomáhat k přenosu mikrosporidií pomocí infikovaných makrofágů do jeho ložiska. Současně však může nastat stav, kdy dochází k eliminaci mikrosporidií vyskytujících se v oblasti s indukovaným zánětem z důvodu zvýšeného výskytu makrofágů. V této studii jsme pozorovali, že po indukci zánětu v pravé noze u pokusné skupiny MMF myši byly nejvyšší hodnoty počtu spor na gram tkáně detekovány 14. DPI a toto množství už jen klesalo. Sekundární indukce zánětu v levé noze vedla k výskytu spor v zánětlivém ložisku na konci pokusu (49. DPI). Spory však byly detekovány i v pravé noze a rozdíl v jejich počtu nebyl tak výrazný. U kontrolní skupiny byla detekce spor v končetinách a játrech spíše náhodná po celou dobu experimentu, což odpovídá dříve popsanému postupnému šíření infekce do těla hostitele imunokompetentních myši BALB/c (Kotková et al. 2013). Z těchto výsledků lze usuzovat, že jsou mikrosporidie pravděpodobně schopny migrovat do ložiska zánětu i jiným cíleným způsobem než jen pomocí makrofágů. K šíření mikrosporidií tedy mohou pravděpodobně přispět i jiné fagocytující buňky jako jsou například neutrofily, monocyty, dendritické buňky a eozinofily (Couzin et al. 2000, Nasonova et al. 2001).

Spory mikrosporidií byly trusem u MMF KO myši v obou skupinách vylučovány nepravidelně po celou dobu infekce, navíc u pokusné skupiny záchyt mikrosporidií v trusu částečně negativně koreloval s výskytem spor ve vybraných tkáních a orgánech, z čehož lze usuzovat, že pravděpodobně i u myši s nefunkčním migračním faktorem pro makrofágy dochází k přesunu mikrosporidií ze zažívacího traktu do ostatních částí hostitelského organismu tak, jak již bylo popsáno dříve Sakem et al. (2017a,b).

Výsledky získané v práci Kicia et al. (2019) poukazují rovněž na signifikantní asociaci mezi výskytem mikrosporidií a respiračních symptomů u pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledvin. Z výsledků však není patrné, zda došlo k vyvolání mikrosporidie po inhalaci infekčních stádií mikrosporidií, či byli tito paraziti do respiračního traktu hematogenně rozšířeni z jiného místa infekce u těchto cíleně imunosuprimovaných pacientů (Sak et al. 2011b). Je však možné, že se mikrosporidie vyskytovaly v respiračním traktu u těchto jedinců již před zahájením léčby, protože Kotková et al. (2013) a Sak et al. (2017b) popisují běžný výskyt druhů rodu *Encephalitozoon* v plicích u imunokompetentních jedinců. Nedostatečná diagnostika mikrosporidií vyplývá převážně z důvodů nízkého povědomí o těchto patogenech a rovněž proto, že nejsou považovány za rizikové faktory (Kučerová et al. 2011). Rovněž je zvažována možnost přenosu mikrosporidií přes štěp, jelikož dárce nejsou testováni na přítomnost mikrosporidií. Výsledky studií dále poukazují na fakt, že se mikrosporidiové infekce vyskytují častěji u pacientů, kteří prodělali transplantaci než u HIV pozitivních jedinců (Kicia et al. 2014, 2018b). Recentní studie stále častěji zvažují mikrosporidie jako původce velmi závažných a problematických nemocí (Ditrich 2011, Kicia et al. 2018). Opotřebením materiálu implantátu kyčelního kloubu a degradace kostní tkáně způsobené periprotetickou osteolýzou u pacientů s endoprotézou kyčelního kloubu bývá jednou z hlavních příčin revize artroplastiky. Mikrosporidie byly zvažovány jako jedna z možných příčin, jelikož bylo předpokládáno, že jsou schopny během zánětlivých procesů migrovat do postižené oblasti a podílet se na degradačních procesech (Kicia et al. 2018a). Nezodpovězenou otázkou zůstalo, zda se v postižené oblasti mikrosporidie vyskytují již před započítáním zánětlivých procesů, či se do postižené oblasti dostanou sekundárně, ať už pomocí makrofágů, či jiných buněk podílejících se na vzniku zánětu. Naše výsledky jasně potvrdily původní domněnku o cílené migraci mikrosporidií do místa zánětu. I když se mikrosporidie ve svalovině mohou vyskytovat běžně, jak potvrdil Sak et al. (2019) v recentní studii, kdy prokázal výskyt mikrosporidií *E. cuniculi* genotyp II ve svalovině prasat. Zatímco běžné zatížení svaloviny prasat se pohybovalo od 60 do 250 spor na gram tkáně, v této práci jsme prokázali, že indukce zánětu vedla k signifikantnímu navýšení výskytu mikrosporidií v indukovaném místě až na $3,5 \times 10^5$ spor na gram tkáně, a to především čtrnáct dní po indukci zánětu. Ve srovnání s kontrolní skupinou, injikovanou sterilním PBS je výskyt mikrosporidií v končetinách zcela náhodný a od 42. DPI

nejsou mikrosporidie ve vybraných orgánech a tkáních detekovány vůbec, což naznačuje, že během našeho experimentu mohlo dojít k jejich eliminaci pomocí imunitního systému hostitele nebo mikrosporidie nadále zůstávají v organizmu v nedetekovatelném množství.

Přítomnost mikrosporidií v trusu u obou skupin BALB/c myší v akutní fázi infekce byla sledována od 2. DPI. Ve shodě s výsledky Kotkové et al. (2013) a Saka et al. (2017b), kteří sledovali vylučování mikrosporidií trusem u imunokompetentních myší, došlo v rámci našeho experimentu ke snížení až vymizení vylučování spor *E. cuniculi* trusem na 15 dnů u pokusné skupiny. Tento jev lze vysvětlit tím, že pravděpodobně dochází k migraci spor ze zažívacího traktu do ložiska zánětu. U kontrolní skupiny byly mikrosporidie v trusu detekovány po celou dobu pokusu.

V experimentu v chronické fázi infekce u BALB/c myší lze pozorovat, že ačkoliv indukce zánětu v pravé a levé noze neměla vliv na cílenou migraci mikrosporidií do zánětlivého ložiska, došlo k reaktivaci mikrosporidie a spory *E. cuniculi* byly detekovány nezávisle na místě vpichu v obou končetinách i játrech. Tyto výsledky odpovídají výsledkům studie Kotkové et al. (2013), která popsala reaktivaci latentní mikrosporidiové infekce imunokompetentních myší po imunosupresi a rovněž i to, že jsou schopny šíření během chronické infekce do různých tkání včetně svalů a v těchto místech přetrvávat. Tato tvrzení lze podpořit výsledky vylučování spor trusem, kdy u kontrolní skupiny byla specifická DNA mikrosporidií detekována nepravidelně po celou dobu experimentu, zatímco u pokusné skupiny byly spory v trusu detekovány po dobu 7 dní do doby, než byl indukován zánět v pravé noze a došlo pravděpodobně k migraci spor ze zažívacího traktu.

Ačkoliv nebyly ve většině případů u všech experimentálních skupin pozorovány statisticky významné rozdíly, je patrné, že indukce zánětu měla vliv na migraci mikrosporidií do zánětlivých ložisek a frekvence výskytu spor nebyla náhodná, ale posunutá ve prospěch místa s indukovaným zánětem, oproti kontrolním skupinám, kde byl výskyt spor náhodný, nebo nebyly spory, respektive jejich specifická DNA detekována vůbec.

Na základě výsledků této práce lze předpokládat, že jsou mikrosporidie sekundárně transportovány do ložiska zánětu za přispění imunitních buněk zodpovědných za jeho vznik. Mikrosporidie jsou také schopny dlouhou dobu přežívat v imunokompetentních hostitelích bez jakýchkoli klinických příznaků, za určitých okolností může dojít k reaktivaci infekce.

7. Závěry

- Indukce zánětu u BALB/c myši v akutní fázi infekce vedla k migraci spor do ložiska zánětu, zatímco u kontrolní skupiny byl výskyt spor náhodný.
- Indukce zánětu u BALB/c myši v chronické fázi infekce neměla vliv na migraci spor do ložiska zánětu, ale způsobila aktivaci do té doby latentní mikrosporidiové infekce. U kontrolní skupiny byl výskyt spor ve tkáních a orgánech negativní.
- Indukce zánětu u SCID myši zvýšila počet spor v zánětem postižených tkáních v porovnání s neindukovanou tkání, zatímco u kontrolní skupiny byl jejich počet srovnatelný.
- U MMF KO myši byl pozorován podobný trend jako u BALB/c myši v akutní fázi infekce.
- Indukce zánětu pravděpodobně způsobuje migraci mikrosporidií do zánětlivého ložiska a aktivaci latentní mikrosporidiové infekce, mechanismus však nadále zůstává nejasný.
- Ani u jedné ze sledovaných skupin imunokompetentních myši nebyly sledovány klinické příznaky typické pro mikrosporidiózu.

8. Literatura

- Achbarou A., Ombrouck C., Gneragbe T., Charlotte F., Renia L., Desportes Livage I., Mazier D. 1996.** Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasite Immunology*. 18: 387–392.
- Alving C. R. 2002.** Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine*. 20: 56–64.
- Balbani G. 1882.** Sur les microsporidies ou psorospermies des articules. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 95: 1168–1171.
- Bannoura S., El Hajj R., Khalifeh I., El Hajj H. 2018.** Acute disseminated encephalomyelitis and reactivation of cerebral toxoplasmosis in a child: Case report. *IDCases*. 13: e00434.
- Bigliardi E., Selmi M. G., Lupetti P., Corona S., Gatti S., Scaglia M., Sacchi L. 1996.** Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 43: 181–186.
- Birthing K., Moore P., Hay P. 1996.** Microsporidia: a new sexually transmissible cause of urethritis. *Genitourinary Medicine*. 72: 445.
- Bohne W., Böttcher K., Groß U. 2011.** The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. *International Journal of Medical Microbiology*. 301: 395–399.
- Brown J. H., Brenn L. 1931.** A method for the differential gram-positive and gram-negative bacteria in tissue sections. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*. 48: 69.
- Bryan R. T., Cali R. L., Owen R. L., Spencer H. C. 1991.** Microsporidia: Opportunistic Pathogens in Patients with AIDS. Vol 2 of *Progress in Clinical Parasitology*. Trans. Tsieh Sun. New York: Field & Wood Medical Publishers. 2: 1–26.

- Cali A., Takvorian P. M. 2014.** Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. In: *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, first edition. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.). John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK. 728 pp.
- Cali A., Weiss L. M., Takvorian P. M. 1996.** Microsporidian taxonomy and the status of *Septata intestinalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 43: 106–107.
- Canning E. U., Lom J., Dyková I. 1986.** *The Microsporidia of Vertebrates*. London: Academic Press, Inc. (London). 289 pp.
- Cavalier-Smith T. 1983.** A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. In: *Endocytobiology II: Intracellular Space as Oligogenetic Ecosystem*. Schenk H. E. A., Schwemmler W. (Eds.) Walter de Gruyter. (Berlin). 1027–1034.
- Couzinet S., Cejas E., Schittny J., Deplazes P., Weber R., Zimmerli S. 2000.** Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocyte. *Infection and Immunity*. 68: 6939–6945.
- Cox J. C., Hamilton R. C., Attwood H. D. 1979.** An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *The Journal of Protozoology*. 26: 260–265.
- Dai J., Wang P., Adusumilli S., Booth C. J., Narasimhan S., Anguita J., Fikrig E. 2009.** Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell Host & Microbe*. 6: 482–492.
- del Aguila C., Rueda C., de la Camara C., Fenoy S. 2001.** Seroprevalence of anti-*Encephalitozoon* antibodies in Spanish immunocompetent subject. *The Journal of Microbiology*. 48: 75–78.
- Desportes I., Le Charpentier Y., Galian A., Bernadr F., Cochand-Priollet B., Lavergne A., Ravisse P., Modifliani R. 1985.** Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *The Journal of Protozoology*. 32: 250–254.
- Didier E. S. 2005.** Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in human and animals. *Acta Tropica*. 94: 61–76.
- Didier E. S., Didier P. J., Snowden K. F., Shadduck J. A. 2000.** Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection/Institut Pasteur*. 2: 709–720.

- Didier E. S., Khan I. A. 2014.** The immunology of microsporidiosis in mammals. In: *Microsporidia Pathogens of Opportunity*. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.). John Wiley & Sons, Inc., Chichester UK. 728 pp.
- Didier E. S., Stovall M. E., Green L. C., Brindley P. J., Sestak K., Didier P. J. 2004** Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*. 126: 145–166.
- Didier E. S., Vossbrinck C. R., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., Shadduck J. A. 1995.** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*. 111: 411–421.
- Didier E. S., Weiss L. M. 2011.** Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 24: 490–495.
- Ditrich O., Chrdle A., Sak B., Chmelík V., Kubále J., Dyková I., Kváč. 2011.** *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2769–2771.
- Enriquez F. J., Taren D., Cruz-Lopez A., Muramoto M., Palting J. D., Cruz P., 1998.** Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. *Clinical Infectious Diseases*. 26: 1227–1229.
- Fayer R., Santín-Duran M. 2014.** Epidemiology of Microsporidia in Human Infections. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.). John Wiley & Sons, Inc., Chichester UK. 728 pp.
- Fischer J., Tran D., Juneau R., Hale-Donze H. 2008.** Kinetics of *Encephalitozoon* spp. infection of human macrophages. *The Journal of Parasitology*. 94: 169–175.
- Fischer J., West J., Agochukwu N., Suire C., Hale-Donze H. 2007.** Induction of host chemotactic response by *Encephalitozoon* spp. *Infection and Immunity*. 75: 1619–1625.
- Franzen C., Müller A. 2001.** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*. 3: 389–400.
- Franzen C. 2008.** Microsporidia: a review of 150 years of research. *The Open Parasitology Journal*. 2: 1–34.

- Goodgame R., Stager C., Marcantel B., Alcocer E., Segura A. M. 1999.** Intensity of infection in AIDS-related intestinal microsporidiosis. *The Journal of Infection Diseases*. 180: 929–932.
- Hocevar S. N., Paddock C. D., Spak C. W., Rosenblatt R., Diaz-Luna H., Castillo I., Luna S., Friedman G. C., Antony S., Stoddard R. A., Tiller R. V., Peterson T., Blau D. M., Sriram R. R., da Silva A., de Almeida M., Benedict T., Goldsmith C. S., Zaki S. R., Visvesvara G. S., Kuehnert C. S. 2014.** Microsporidiosis acquired through solid organ transplantation: a public health investigation. *Annals of Internal Medicine*. 160: 213–220.
- Hutin Y. J., Sombardier M. N., Liguory O., Sarfati C., Derouin F., Modai J., Molina J. M. 1998.** Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *The Journal of Infectious Diseases*. 178: 904–907.
- Jedrzejewski S., Graczyk T. K., Slodkiewicz-Kowalska A., Tamang L., Majewska A. C. 2007.** Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 4071–4073.
- Katinka M. D., Duprat S., Cornillot E., Méténier G., Thomarat F., Prensier G., Barbe V., Pevretailade E., Brottier P., Wincker P., Delbac F., El Alaoui H., Pevret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivares C. P. 2001.** Genome sequence and gene contraction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 414: 450–453.
- Katzwinkel-Wladarsch S., Lieb M., Helse W., Löscher T., Rinder H. 1996.** Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine & International Health*. 1: 373–378.
- Keeling P. J. 2014.** Phylogenetic Place of Microsporidia in the Tree of Eukaryotes in Microsporidia. In: *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. First Edition. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.) John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK. 728 pp.
- Keeling P. J., Fast N. M. 2002.** Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review Microbiology*. 56: 93–116.

- Keeling P. J., Luker M. J., Palmer J. D. 2000.** Evidence from beta-tubulin that microsporidia evolved from fungi. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 1–9.
- Keohane E. M., Weiss L. M. 1999.** The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. *In: Wittner M, Weiss LM (Eds.) The microsporidia and microsporidiosis*. ASM. (Washington DC). 572 pp.
- Kicia M, Weselowska M., Kopacz Z., Kváč M., Sak B., Sokulska M., Cebulski K., Hendrich A. B., Pozowski A. 2018a.** Disseminated Infection of *Encephalitozoon cuniculi* Associated with Osteolysis of Hip Periprosthetic Tissue. *Clinical Infectious Diseases*, 67: 1228–1234.
- Kicia M., Sedzimirska M., Sak B., Kváč M., Weselowska M., Hendrich A. B., Kopacz Z. 2018b.** Respiratory microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bieneusi* in an HIV-negative hematopoietic stem cell transplant recipient. *International Journal of Infectious Diseases*. 77: 26–28.
- Kicia M., Szydłowict M., Cebulski K., Jakuszko K., Piesiak P., Kowal A., Sak B., Krajewska M., Hendrich A. B., Kváč M., Kopacz Z. 2019.** Symptomatic respiratory *Encephalitozoon cuniculi* infection in renal transplant recipients. *International Journal of Infectious Diseases*. 79: 21–21.
- Kicia M., Weselowska M., Jakuszko K., Kopacz Z., Sak B., Květoňová D., Krajewska M., Kváč M. 2014.** Concurrent Infection of the Urinary Tract with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in a Renal Transplant Recipient. *Journal of Clinical Microbiology*. 52: 1780–1782.
- Kotková M., Sak B., Kváč M. 2018.** Differences in the intensity of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III – Comparison using quantitative real-time PCR. *Experimental Parasitology*. 192: 93–97.
- Kotková M., Sak B., Květoňová D., Kváč M. 2013.** Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS One*. 8: e60941.
- Koudela B., Kučerová S., Hudkovic T. 1999.** Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitologica*. 46:171–174.

- Koudela B., Lom J., Vítovec J., Kučerová Z., Ditrich O., Trávníček J. 1994.** In vivo efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 41: 49–50.
- Kučerová Z., Sokolová O. I., Demyanov A. V., Kváč M., Sak B., Květoňová D., Secor W. E. 2011.** Microsporidiosis and cryptosporidiosis in HIV/AIDS patients in St. Petersburg, Russia: serological identification of microsporidia and *Cryptosporidium parvum* in sera samples from HIV/AIDS patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 27: 13–15.
- Kváč M., Tomanová V., Samková E., Koubová J., Kotková M., Hlásková L., McEvoy J., Sak B. 2016.** *Encephalitozoon cuniculi* in raw cow's milk remains infectious after pasteurization. *Foodborne Pathogens and Disease*. 13: 77–79.
- Larsson J. I. R. 1999.** Identification of microsporidia. *Acta Protozoologica*. 38:161–197.
- Lee J. H. 2008.** Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 1664–1666.
- Levaditi C., Nicolau S., Schoen R. 1923.** Etiology of epizootic rabbit encephalitis in reports with experimental studies of encephalitis lethargica. *Encephalitozoon cuniculi* (nov spec). *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)*. 38: 675–711.
- Lopez-Velez R., Turrientes M. C., Garron C., Montilla P., Navajas R., Fenoy S., del Aguila C. 1999.** Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *Journal of Travel Medicine*. 6: 223–237.
- Lores B., Lopez-Miragaya I., Arias C., Fenoy S., Torres J., del Aguila C. 2002.** Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus–negative patients from Vigo. Spain. *Clinical Infectious Diseases*. 34: 918–921.
- Lutzoni F., Kauff F., Cox C. J., McLaughlin D., Celio G., Dentinger B., Padamsee M., Hibbett D., James T. Y., Grube M., Reeb V., Hofstetter V., Schoch C., Arnold A. E., Miadlikowska J., Spatafora J., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R., Sung G. H., Lücking R., Lumbsch T., O'Donnell K., Binder M., Diederich P., Ertz D., Gueidan C.,**

- Hansen K., Harris R. C., Hosaka K., Lim Y. W., Matheny B., Nishida H., Pfister D., Rogers J., Rossman A., Schmitt I., Sipman H., Stone J., Sugiyama J., Yahr R., Vilgalys R. 2004.** Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*. 91: 1446–1480.
- MacInnes E. F., Stewart C. G. 1991.** The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalotizoonosis. *Journal of the South African Veterinary Association*. 62: 51–54.
- Mathis A., Akerstedt J., Tharaldsen J., Odegaard O., Deplazes P. 1996.** Isolates of *Encephalitozoon cuniculi* from farmed blue fox (*Alopex lagopus*) from Norway differ from isolates from Swiss domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Parasitology Research*. 82: 727–730.
- Mathis A., Weber R., Deplazes P. 2005.** Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*. 18: 423–445.
- Matsubayashi H., Koike T., Mikata I., Takei H., Hagiwara S. 1959.** A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *AMA Archives of Pathology*. 67: 181–187.
- Moretto M. M., Lawlor E. M., Khan I. A. 2008.** Aging mice exhibit a functional defect in mucosal dendritic cell response against an intracellular pathogen. *The Journal of Immunology*. 181: 7977–7984.
- Müller A., Bialek R., Kamper A., Fatkenheuer G., Salzberger B., Franzen C. 2001.** Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1630–1632.
- Mungthin M., Subrungruang I., Naaglor T., Aimpun P., Areekul W., Leelayoova S. 2005.** Spore shedding pattern of *Enterocytozoon bieneusi* in asymptomatic children. *Journal of Medical Microbiology*. 54: 473–476.
- Mynářová A. 2015.** Prevalence a diverzita kryptosporidií, giardia a mikrosporidií u orangutanů (*Pongo* spp.) a vliv vybraných rostinných extraktů na průběh experimentální infekce *Encephalitozoon cuniculi* u BALB/c myší. Diplomová

práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta. 111 pp.

Nägeli K. W. 1857. Ueber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. Bot Zeitung. 15: 760–761.

Nassonova E., Tokarev Y. S., Trammer T., Entzeroth R., Sokolova J. 2001. Phagocytosis of *Nosema grylli* (Microsporidia, Nosematidae) spores in vivo and in vitro. Journal of Eukaryotic Microbiology. 48: 83–84.

Niederhorn J. Y., Shadduck J. A. 1980. Role of antibody and complement in the control of *Encephalitozoon cuniculi* infections by rabbit macrophages. Infection and Immunity. 27: 995–1002.

Sak B., Brady D., Pelikánová M., Květoňová D., Rost M., Kostka M., Tolarová V., Hůzová Z., Kváč M. 2011a. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. Journal of Clinical Microbiology. 49: 1064–1070.

Sak B., Ditrich O. 2005. Humoral intestinal immunity against *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) infection in mice. Folia Parasitologica. 52: 158–162.

Sak B., Jandová A., Doležal K., Kváč M., Květoňová D., Hlásková L., Rost M., Olšanský M., Nurcahyo W., Foitová I. 2017a. Effects of selected Indonesian plant extracts on *E. cuniculi* infection *in vivo*. Experimental Parasitology. 181: 94–101.

Sak B., Kašičková D., Kváč M., Květoňová D., Ditrich O. 2010. Microsporidia in exotic birds: intermittent spore excretion of *Encephalitozoon* spp. in naturally infected budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Veterinary Parasitology. 168: 196–200.

Sak B., Kotková M., Hlásková L., Kváč M. 2017b. Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis. Parasite Immunology. 39: e12496.

Sak B., Kváč M., Kučerová Z., Květoňová D., Saková K. 2011. Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals – a longitudinal study. PLoS Neglected Tropical Diseases. 5: e1162.

- 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*. *Parasite Immunology*. 28: 95–99.
- Sak B., Vecková T., Brdíčková K., Smetana P., Hlásková L., Kicia M., Holubová N., McEvoy J., Kváč M. 2019.** *Encephalitozoon cuniculi* Infection Acquired from Fermented Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*. In press.
- Schmidt E. C., Shadduck J. A. 1984.** Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *Journal of Immunology*. 133: 2712–2719.
- Shadduck J. A. 1969.** *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. *Science*. 166: 516–517.
- Shadduck J. A. 1971.** Enecephalitozoonosis (Nosematosis) and toxoplasmosis. *The American Journal of Pathology*. 64: 657–671.
- Shadduck J. A., Orenstein J. M. 1993.** Comparative pathology of microsporidiosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 117: 1215–1219.
- Sharma S., Balne P. K., Das S. 2014.** Ocular microsporidiosis. In: *In: Microsporidia: Pathogens of Oportunity*. First Edition. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.) John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK. 728 pp.
- Snowden K. F., Didier E. S., Orestein J. M., Shadduck J. A. 1998.** Animal models of human microsporidial infections. *Laboratory Animal Science*. 48: 589–592.
- Snowden K. F., Shadduck J. A. 1999.** Microsporidia of higher vertebrates. *In Wittner M, Weiss LM (Eds.), The Microsporidia and microsporidiosis*. ASM, Washington DC. 728 pp.
- Sokolova O. I., Demyanov A. V., Bowers L. C., Didier E. S., Yakoviev A. V., Skarlato S. O., Sokolova Y. Y. 2011.** Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2102–2108.
- Talabani H., Sarfati C., Pillebout E., van Gool T., Derouin F., Menotti J. 2010.** Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology*. 48: 2651–2653.

- Thurston-Enriquez J. A., Watt P., Dowd S. E., Enriquez R., Pepper I. L., Gerba C. P. 2002.** Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crops production. *Journal of Food Protection*. 65: 378–382.
- Undeen A. H., Van der Meer R. K. 1999.** Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 294–302.
- van Dellen A. F., Steward C. G., Botha W. S. 1989.** Studies of encephalitozoonis in vervet monkeys (*Cercopithecus pygerythrus*) orally inoculated with spores of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from dogs (*Canis familiaris*). *American Journal of Veterinary Research*. 56: 1–22.
- van Gool T., Vetter J. C. M., Weinmayr B., van Dam A., Derouin F., Dankert J. 1997.** High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *The Journal of Infection Diseases*. 175: 1020–1024.
- Vávra J. 1966.** Some recent advances in the study of microsporidian spores. In: Corradetti, A. (Ed.), *Proceedings of the First International Congress of Parasitology*. Pergamon Press. Oxford. 656 pp.
- Vávra J. 2005.** "Polar vesicles" of microsporidia are mitochondrial remnants ("mitosomes")? *Folia Parasitologica*. 52: 193–195.
- Vávra J., Larsson J. I. R. 2014.** Structure of Microsporidia In: *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. First Edition. Weiss L. M., Becnel J. J. (Eds.) John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK. 728 pp.
- Vávra J., Lukeš J. 2013.** **Microsporidia and 'the art of living together'**. *Advances in Parasitology*. 82: 253–319
- Voigt K., Kirk P. M. 2011.** Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90: 41–57.
- Wasson K., Peper R. L. 2000.** Mammalian microsporidiosis. *Veterinary Pathology*. 37: 113–128.
- Weber R., Bryan R. T. 1994.** Microsporidial infections in immunoneficient and immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases*. 19: 517–521.

- Weber R., Bryan R. T., Schwartz D. A., Owen R. L. 1994.** Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 7: 426–461.
- Weidner E. 1975.** Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages. Parasitophorous vacuole growth and the absence of lysosomal fusion. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 47:1–9.
- Williams B. A. P. 2009.** Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular Microbiology*. 11: 1551–1560.
- Wolk D. M., Schneider S. K., Wengenack N. L., Sloan L. M., Rosenblatt J. E. 2002.** Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3922–3928.
- Wright J. H., Craighead E. M. 1922.** Infectious motor paralysis in young rabbits. *The Journal of Experimental Medicine*. 36: 135–140.