

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Diseminovaná latentní mikrosporidióza jako potenciální
příčina ohrožení lidského zdraví**

Bakalářská práce

Katka Mansfeldová

Školitel: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

Školitel – specialista: Ing. Nikola Holubová, Ph.D.

České Budějovice 2023

Mansfeldová K., (2023): Diseminovaná latentní mikrosporidióza jako potenciální příčina ohrožení lidského zdraví. [Disseminated latent microsporidiosis as a potential cause of threat to human health. Bc. Thesis, in Czech.], 31 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Microsporidiosis cause serious health problem, especially in immunodeficient patients. However, the occurrence of latent infection has also been confirmed in immunocompetent patients who do not have any clinical signs of infection. As the problematics of microsporidiosis is generally underestimated and patients are not usually tested for microsporidia, the latent infection can cause fatal consequences leading even to death if not detected and properly treated.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2023

.....

Katka Mansfeldová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady a velkou trpělivost. Velké poděkování patří také mé školitelce Ing. Nikole Holubové, Ph.D. za odborné rady a pomoc při zpracování vzorků. V neposlední řadě děkuji také celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného a nápomocného pracovního prostředí.

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

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GAČR 20-10706S
(řešitel RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.).

Obsah

1	Úvod.....	5
1.1	Mikrosporidie.....	6
1.1.1	Historie a taxonomie.....	6
1.1.2	Morfologie a vývojový cyklus.....	7
1.1.3	Mechanismy přenosu infekce	10
1.1.4	Druhy lidských mikrosporidií.....	11
1.1.5	Projevy infekce	12
1.1.6	Metody detekce.....	14
1.1.7	Léčba mikrosporidiiózy	14
2	Cíle práce.....	15
3	Materiál a metody	16
3.1	Mozkomíšní moky	16
3.2	Koncentrace mozkomíšních moků – centrifugace.....	16
3.3	Izolace DNA z mozkomíšního moku.....	16
3.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	17
3.5	Gelová elektroforéza.....	19
3.6	Extrakce DNA z gelu	19
3.7	Sekvenace	20
3.8	Kvantitativní Real-Time PCR (qRT PCR)	21
4	Výsledky	23
5	Diskuze	24
6	Závěry	27
7	Seznam použité literatury	28

1 Úvod

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární paraziti, kteří mimo hostitelskou buňku přežívají ve stádiu spory, jež je velmi odolná vůči vnějšímu prostředí. Mikrosporidie se nejčastěji přenáší na své hostitele pomocí aerosolu, vody nebo potravy. Tito paraziti mohou infikovat celou řadu organismů včetně člověka a způsobit tak řadu závažných onemocnění. U imunokompetentních jedinců se nákaza projevit nemusí, ale v případě stavu imunodeficiency může onemocnění způsobit vážné a zhoršující se zdravotní komplikace vedoucí až k mortalitě. Nejvíce ohroženou skupinou jsou HIV pozitivní pacienti, onkologicky nemocní nebo příjemci transplantovaných orgánů. Spousta závažných latentních infekcí však z důvodu nízkého povědomí o této diagnóze zůstává neodhalena a není léčena včas.

Mikrosporidie mohou infikovat téměř jakýkoli orgánový systém počínaje nejčastěji gastrointestinálním traktem až po mozek a míchu. V případě imunodeficiency jedince, způsobené např. onemocněním diabetes mellitus, může latentní mikrosporidíóza způsobit životu ohrožující stav. Ve studii Ditrich et al. (2011) byla popsána kazuistika o pacientovi ve věku 56 let, který prodělal infarkt myokardu a byl mu diagnostikován diabetes mellitus 2. typu. Muž byl do nemocnice převezen s teplotou, těžkou kognitivní poruchou a hemiparézou na levé straně. Na základě symptomů pacienta došlo k podezření na bakteriální či virový zdroj nákazy, molekulární vyšetření mozkomíšního moku však tuto možnost vyloučilo. Vyšetření CT a magnetická rezonance odhalila vývoj abscesové dutiny v pravém frontálním laloku. Po extrakci hnisu v abscesové dutině bylo provedeno parazitologické vyšetření, jež odhalilo spory mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*, které byly následně identifikovány také v moči a stolici pacienta. Po účinné léčbě albendazolem a mebendazolem byly provedeny bakteriální a parazitologické testy abscesové dutiny s již negativním výsledkem. Tento příběh se zdárným koncem aplikované léčby a včasnou detekcí zdroje nákazy je však ojedinělý. Z důvodu nesnadné diagnostiky mikrosporidií a velmi nízkém povědomí praktických lékařů o těchto patogenech nebývají pacienti na jejich přítomnost testováni včas.

Tato práce se zabývá problematikou latentní mikrosporidíózy a její prevalencí u pacientů s nespecifickým a těžce diagnostikovatelným onemocněním. Účelem práce je rozšířit povědomí o mikrosporidiích a tím zvýšit pravděpodobnost cíleného vyšetření a včasné léčby pacienta.

1.1 Mikrosporidie

Mikrosporidie se řadí mezi eukaryotní organismy. Jedná se o parazity, kteří jsou schopni infikovat velmi široké spektrum hostitelů včetně obratlovců a bezobratlých. Dosud bylo popsáno více než 1400 druhů mikrosporidií a každý rok jsou objevovány nové druhy. Spory těchto organismů jsou všudypřítomné a byly detekovány v různých prostředích, běžně se vyskytují např. v povrchových vodách. Životní cyklus těchto organismů začíná pomocí přenosu infekční sporoplazmy skrze pólovou trubici do hostitelské buňky, kde podstoupí replikační cyklus a poté diferencují zpět na spory, jež se uvolní do prostředí (Szumowski at Troemel 2015, Han at Weiss 2017).

Mikrosporidie jsou patogenní pro hmyz, ryby, králíky i laboratorní hlodavce. Několik druhů mikrosporidií způsobuje rozsáhlé hospodářské ztráty v zemědělství, především u včel medonosných (*Nosema apis*, *Nosema ceranae*) (Fries 1993), bource morušového (*Nosema bombycis*) (Nägeli 1857), lososovitých ryb (*Loma salmonae*) (Kent et al. 1989) i u krevet (*Thelohania* sp.) (Overstreet 1973). Bylo zjištěno, že mikrosporidie jsou zodpovědné za smrt imunokompromitovaných pacientů po transplantaci orgánů a za profuzní průjem u pacientů s onemocněním AIDS. Mikrosporidie mohou infikovat jakýkoli orgánový systém, nejčastěji je však infikována gastrointestinální soustava.

V této době není velké množství léčiv, které by mikrosporidíózu účinně léčily a zároveň byly bezpečné z hlediska užívání. Jednou z mála sloučenin, které spolehlivě brání mikrosporidiální infekci, je např. Fumagillin, jež je bohužel pro člověka toxický. Z nejnovějších poznatků vyplývá, že prevalence mikrosporidiálních infekcí u imunokompetentních lidí je podhodnocena, spousta osob o nákaze neví, jelikož se u nich jedná o latentní nebo asymptomatickou infekci (Sak et al. 2011 a,b, Szumowski at Troemel 2015, Han at Weiss 2017).

1.1.1 Historie a taxonomie

Mikrosporidie byly poprvé popsány před 150 lety při identifikaci organismu *Nosema bombycis*, který byl zodpovědný za onemocnění housenek bource morušového. Od té doby byla popsána celá řada druhů mikrosporidií infikujících bezobratlé a obratlovce včetně člověka, některé druhově specifické, jiné s širokou hostitelskou specifitou. Mikrosporidiové infekce u lidí, způsobující encefalitidu, byly popsány v roce 1959 (Han at Weiss 2017).

Mikrosporidie jsou jednobuněční paraziti. Dříve byly mikrosporidie na základě strukturální podobnosti buňky klasifikovány jako protista (Vossbrinck et al. 1987), nyní se na základě fylogenetické analýzy genů HSP70 (70-kDa heat shock protein) řadí mezi houby – Fungi (Germot et al. 1996). Z důvodu přítomnosti jádra s jaderným obalem, intracytoplazmatického membránového systému, separace chromozomů pomocí mitotických vřetének a také zbytkové organely odvozené z mitochondrií (mitozomu) se řadí mezi eukaryotické organismy. S prokaryotickými organismy také sdílí podobnost, neboť obsahují ribozomy typu 70S a postrádají klasické mitochondrie, peroxisomy a Golgiho aparát (Weber et al. 1994, Han et al. 2021, Szumowski at Troemel 2015, Brdíčková 2019).

K řešení otázky ohledně fylogeneze, evoluce a patogeneze mikrosporidií velmi přispěly počty dostupných mikrosporidiálních genomových sekvencí z novějších výzkumů. Klasifikace mikrosporidií probíhá na základě jejich ultrastrukturálních znaků, mezi které se řadí počet závitů pólové trubice, morfologie, tvar a velikost spor, znaky vývojového životního cyklu a vztah mezi hostitelem a parazitem. Pomocí molekulárních fylogenetických dat, např. sekvenace genů kódujících malou rRNA podjednotku, vzniká komplexní soubor dat, který umožňuje přiřadit mikrosporidie k přesnému rodu a také rozlišit úroveň druhu na základě morfologických podobností (Szumowski at Troemel 2015, Han et al. 2021).

1.1.2 Morfologie a vývojový cyklus

Nejcharakterističtším znakem mikrosporidií je stádium spory, pomocí níž jsou mikrosporidie odlišovány od ostatních organismů. Vzhledem k odolnosti spory vůči vnějšímu prostředí je toto stádium tím jediným, kdy může mikrosporidie přežít mimo hostitelskou buňku. Tvar spory se může lišit v závislosti na druhu mikrosporidie, obvykle je tvar však hruškovitý nebo oválný. Velikost spor se pohybuje v rozmezí od 1 do 12 μm , některé jehlovité spory mohou dosahovat délky až 20 μm . Spory mohou být jednojaderné, např. rod *Encephalitozoon* spp. má jádro jednoduché, rod *Nosema* spp. má dvě jádra nazývané diplokaryon. Stěna spor se skládá ze tří vrstev: elektronově husté proteinové exospory, elektronově prosvítající endospory (složené převážně z chitinu a glykoproteinů) a vnitřní plazmatické membrány. Mezi tři obecné znaky výtrusů se řadí: výtrusný plášť, výtrusnice a invazní aparát (Han at Weiss 2017).

Typickým znakem všech mikrosporidií je pólová trubice, která je připojena k vnitřní straně předního konce spor kotevním diskem. Délka pólové trubice se může pohybovat v rozmezí od 50 do 500 μm a její průměr může být 0,1 – 0,2 μm . Pólová trubice je stočena

kolem sporoplazmy ve 4 až 30 závitů. Počet závitů je podmíněn druhem mikrosporidií. Během vytlačování pólové trubice dochází k prasknutí předního kotevního disku spory.

Stěna spory obklopuje sporoplazmu, pólovou trubici, lamelární polaroplast, drsné endoplazmatické retikulum a volné ribosomy. Při průchodu spor vhodným a specifickým prostředím, např. gastrointestinálním traktem hostitele, dochází k jejich aktivaci, během níž se pólová trubice převrací naruby a následně slouží pro průchod sporoplazmy a jádra do cytoplazmy hostitelské buňky. I v případě, pokud jsou spory mikrosporidií zfagocytovány makrofágy, může dojít k vystřelení pólové trubice a následnému proražení fagocytární vakuoly, čímž se do cytoplazmy dané nebo sousední hostitelské buňky uvolní infekční sporoplazma. Lokace sporoplazmy je stanovena délkou pólové trubice a jejím nasměrováním. Dosud není znám přesný mechanismus interakce pólové trubice s membránou hostitelské buňky. Po vstupu sporoplazmy do hostitelské buňky začíná reprodukční cyklus, který vede k produkci zralých spor (Han et al. 2021).

Pomocí nově získaných informací o genomech mikrosporidií se některé výzkumy zaměřily na jedinečné a specifické proteiny těchto organismů, aby bylo objasněno, jakým způsobem mikrosporidie interagují se svými hostiteli. Jedná se především o proteiny stěny spor a proteiny pólové trubice. Některé studie naznačují významnou roli těchto proteinů při vstupu do hostitelské buňky. Předpokládá se např., že proteiny stěny spor mohou napomáhat k přilnutí spor k hostitelské buňce a tím zvyšovat úspěšnost infekce (Szumowski at Troemel 2015).

Reprodukční cyklus mikrosporidií

Veškeré vývojové fáze kromě spory mikrosporidií probíhají výhradně intracelulárně, jelikož mikrosporidie nemají žádná metabolicky aktivní stádia mimo hostitelskou buňku.

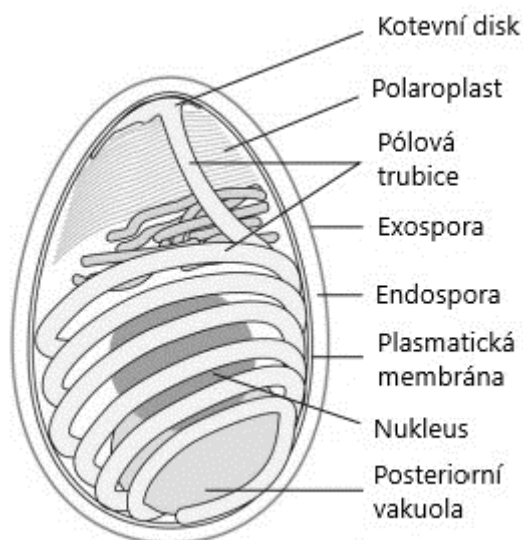
Životní cyklus mikrosporidií zahrnuje tři fáze:

- 1) Infekční fáze – zahrnuje uvolnění spor do prostředí, přenos spor a jejich stimulaci potřebnou k vystřelení pólové trubice a injikaci obsahu infekčních spor do hostitelské buňky.
- 2) Merogonie – proliferativní vegetativní fáze, při které se mikrosporidie intracelulárně množí.
- 3) Intracelulární sporogonie – během ní dochází ke vzniku nových infekčních spor.

Za vhodných podmínek prostředí dochází k aktivaci spory a sporoplazma je injikována dutou pólovou trubicí do hostitelské buňky, což je podnětem proliferativního merogonického stádia. Během merogonie - první fáze cyklu - se sporoplazma vyvine v meronty, které se následně množí binárním nebo vícenásobným dělením v závislosti na druhu mikrosporidie. Následuje vývoj mikrosporidií, a to buď přímo v cytoplasmě hostitelské buňky (u většiny druhů), v parazitoformní vakuole v cytoplasmě hostitelské buňky (rod *Encephalitozoon* spp.), nebo i v jejím jádře (např. *Nucleospora* spp., *Enterospora* spp.) (Freeman at Sommerville 2009, Han et al. 2021).

Vývoj mikrosporidií uvnitř hostitelských buněk probíhá ve dvou odlišných fázích – fázi merogoniální nebo sporogoniální. V merogoniální fázi dochází k vysokému nárůstu počtu mikrosporidií v důsledku jejich množení. Na konci této fáze se na vnější straně merozoitové plazmatické membrány vytvoří elektrodensní obal, čímž dochází k přechodu z merogonie na sporogonii. V této fázi vznikají ze sporontů sporoblasty, z nichž se tvoří zralé spory. Ve fázi sporogonie se u většiny druhů mikrosporidií z hustého materiálu na plazmatické membráně vytvoří prvotní exosporová vrstva. Ve sporoplasmě sporoblastu se vytvoří také pólová trubice a Golgiho aparát. Po vzniku zralých spor v hostitelské buňce dojde k prasknutí buňky, zralé spory se uvolní do prostředí. V důsledku kombinace merogonie a sporogonie vzniká velké množství spor, tím je tvořen základ obrovského reprodukčního potenciálu mikrosporidií (Han et al. 2021).

Obrázek 1: Spora mikrosporidie (Franzen 2008, upraveno)



1.1.3 Mechanismy přenosu infekce

Primárním místem vstupu infekce je především gastrointestinální trakt, z něj však spory mohou pomocí následných infekcí dalších hostitelských buněk procházet přes střevní stěnu do krevního řečiště a dále do vnitřních orgánů hostitele. Různé druhy mikrosporidií se liší tkáňovým tropismem a konečná lokalizace infekce zahrnuje játra, plíce, mozek, ledviny nebo mohou při systémové infekci být napadeny všechny orgány (Didier et al. 1994).

Z dosud popsaných infekcí nakažených jedinců vyplývá, že většina infekcí je přenesena na člověka vodou, potravinami nebo antropozoonoticky. Mezi další cesty přenosu nákazy na člověka se řadí vdechování kontaminovaných aerosolů, fekálně-orální kontaminace, kontaminace otevřených ran nebo přenos z matky na plod (Kotková et al. 2018, Han et Weiss 2017, Han et al 2021).

Zoonotický přenos je nejpravděpodobnější příčinou mikrosporidiální infekce u lidí. Mikrosporidie infikující člověka byly nalezeny u divokých zvířat, hospodářských zvířat i domácích mazlíčků. Druhy *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon* spp. byly objeveny u širokého spektra savčích hostitelů včetně psů, koček, králíků, prasat, skotu, koz a oslů. Přímé důkazy o zoonotického přenosu byly zaznamenány např. u dvouletého dítěte, jež bylo infikováno mikrosporidiemi *E. bieneusi* po vystavení se nakaženým morčatům, nebo u dítěte, které bylo infikováno *E. cuniculi* v důsledku expozice nakaženému vrhu štěňat. Rizikovým pro děti nebo starší osoby může být také přenos mikrosporidií mezi lidmi a ptáky, např. prostřednictvím městských parků či hnízdišť. Za významný zdroj nákazy ve městech byli označeni městští holubi, kteří mohou být mediátory nákazy *E. intestinalis* nebo *E. hellem* (Han et al 2021).

Vzhledem k výskytu spor ve vodě i v potravě je požití spor uvolněných do prostředí dalším pravděpodobným způsobem přenosu mikrosporidií na člověka. Ke kontaminaci užitkové či pitné vody dochází při uvolnění výkalů nebo moči infikovaných zvířat do vodních zdrojů (Moss et Snyder 2017). Výskyt mikrosporidií v potravě je ovlivněn jejím zpracováním a rozsahu tepelné úpravy, jako hlavní zdroj je označováno syrové či nedostatečně tepelně upravené maso, nemyté ovoce a zelenina a nedostatečně pasterované mléko (Shahrul Anuar et al. 2013, Kváč et al 2016). K infekci skrze potraviny může také dojít při zavlažování nebo omytí zeleniny či ovoce již kontaminovanou vodou. Tento způsob přenosu byl nejčastěji zaznamenán u mikrosporidie *Enterocytozoon bieneusi* (Weber et al 1994, Han et al 2021).

Možný přenos mikrosporidiální infekce na člověka je také pomocí vdechnutí kontaminovaného aerosolu. V takovém případě bývají spory nalézány ve sputu pacientů, dále v bronchiální epiteliální tkáni, nosním výtoku a nosní epiteliální tkáni. V průběhu rozsáhlé infekce močových cest je zvýšená možnost také pohlavního přenosu infekce. Experimentální studie u zvířat také naznačují eventualitu transplacentárního přenosu mikrosporidií z matky na potomka. U lidí však zatím nebyly zaznamenány žádné vrozené mikrosporidiální infekce (Weber et al 1994).

1.1.4 Druhy lidských mikrosporidií

U lidí byly dosud identifikovány tyto rody mikrosporidií: *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Anncaliia*, *Vittaforma*, *Brachiola*, *Microsporidium*, *Pleistophora* a *Trachipleistophora* (Han et Weiss 2017).

1.1.4.1 *Encephalitozoon* spp.

Jedním z nejrozšířenějších rodů mikrosporidií, infikujících člověka, je rod *Encephalitozoon*. Doposud jsou známy tři druhy mikrosporidií tohoto rodu, jmenovitě se jedná o *E. cuniculi*, *E. hellem* a *E. intestinalis* (Aseeja et al 2021). Z důvodu dobré kultivace tkáňových kultur jsou mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* hojně využívány ve výzkumných laboratořích (Brdíčková 2019).

1.1.4.2 *Encephalitozoon cuniculi*

Mikrosporidie *E. cuniculi* byla poprvé diagnostikována u králíků v roce 1922 a popsána o rok později (Levaditi et al. 1923). Následně byla objevena také u různých savců, hlodavců, masožravců, ptáků, primátů i lidí. *Encephalitozoon cuniculi* infikuje makrofágy, epiteliální buňky, vaskulární endoteliální buňky, buňky ledvinných tubulů i další typy buněk. Vyskytují se také v tkáních, především v ledvinách a mozku (Weber et al 1994).

Encephalitozoon cuniculi způsobuje na rozdíl od jiných druhů mikrosporidií diseminované infekce postihující téměř veškeré orgánové systémy. Klinické příznaky mikrosporidie se však nemusí projevit vůbec nebo se mohou postupně zhoršovat a působit vážná onemocnění v závislosti na imunokompetentním stavu pacienta. Diseminované infekce jinými druhy mikrosporidií bývají hlášeny především v kazuistikách (Franzen et al. 2001).

Analýzou ITS oblasti ribozomálních genů byly doposud rozlišeny čtyři různé genotypy *E. cuniculi*: genotyp I („králíčí kmen“) vyskytující se převážně u králíků, genotyp II („myší kmen“) vyskytující se u hlodavců, koček a lišek, genotyp III („psí kmen“) způsobující mortalitu lumíků, psů a opic a genotyp IV („lidský kmen“) detekovaný u lidí, ale také psů a koček. Lidská mikrosporidióza bývá zapříčiněna všemi známými genotypy *E. cuniculi*, avšak genotyp III bývá u lidí detekován pouze výjimečně. Infekce způsobené mikrosporidii *E. cuniculi* bývají s největší pravděpodobností způsobené zoonotickým přenosem (Hinney et al. 2016).

Bylo prokázáno, že spory mikrosporidií mohou ve vodě přežívat po dlouhou dobu. Ve studii Koudela et al. (1999) bylo zjištěno, že spory *Encephalitozoon cuniculi* mohou zůstat životaschopné a infekční i po době dvou let při jejich suspenzi ve vodě za teploty 4 °C, ale také po jejich zmrazení na teplotu -24 °C po dobu 24 hodin. Žádná výrazná ztráta infekčnosti nenastala ani po zmrazení spor na -70 °C po dobu 8 hodin. Neinfekčními se spory staly teprve po jejich zahřívání na 60 °C a 70 °C po dobu 5 minut. Z tohoto výzkumu vyplývá, že pouze zahřátí na nejméně 60 °C může tyto spory učinit neinfekčními. Na suchu mohou spory *E. cuniculi* zůstat životaschopné 4 týdny při teplotě 22 °C. (Weiss 2001).

1.1.5 Projevy infekce

Projevy infekcí způsobených mikrosporidii mohou záviset na infikujícím druhu, způsobu infekce, věku a imunologickém stavu (Weber et al. 1994).

Popisy mikrosporidiových infekcí existují téměř v každém orgánovém systému a mohou způsobovat onemocnění jako encefalitidu, sinusitidu, myositidu a cholecystitidu. Mikrosporidióza představuje závažný problém u imunodeficitních hostitelů, jako jsou pacienti s pokročilou infekcí nemoci AIDS, pacienti užívající imunosupresivní léky, jako jsou pacienti po transplantaci orgánů, nebo ti, jenž přijímají imunomodulační protilátky (např. tumor-nekrotizující faktor alfa). U imunokompetentních jedinců jsou mikrosporidiové infekce převážně chronické a asymptomatické, u imunodeficitních jedinců může být infekce letální. Imunita proti infekci je závislá na interferonu-gama a interleukinu-12, ke zprostředkování imunity dochází pomocí cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů (Han et Weiss 2017).

Infekce se nejčastěji vyskytují u HIV pozitivních pacientů, kteří trpí silnou imunodeficiencí, a jejichž počet CD4⁺ T-lymfocytů je nižší než 100 buněk/ μ l krve (Han et Weiss 2021).

Mikrosporidie zpravidla způsobují těžké průjmy s někdy i více než 10 stolicemi za den. V souvislosti s tím u pacientů dochází k úbytku tělesné hmotnosti, malabsorpci tuku, D-xylózy a vitamínu B12. Průjmy mohou přetrvávat až několik měsíců (Kotler et Orenstein, 1999).

Druhým nejčastějším projevem mikrosporidiózy je oční infekce. U většiny pacientů se dostaví oboustranná konjunktivitida a také tečkovitá epiteliální keratitida. Keratokonjunktivitida může být asymptomatická nebo středně závažná, v ojedinělých případech může vést k vředům na rohovce (Friedberg et Ritterband 1999).

Běžným projevem nákazy může být dále sinusitida, při níž pacienti trpí rýmou a v případě chronické sinusitidy může v nosu dojít ke vzniku polypů (Kotler et Orenstein, 1999).

Méně častým případem nákazy bývá infekce plic. Infekce dolních cest dýchacích může být asymptomatická nebo spojena s bronchitidou, vzácně s pneumonií nebo respiračním selháním (převážně u HIV pozitivních pacientů) (Kotler et Orenstein, 1999).

U pacientů s diseminovanou infekcí mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* se projevuje také infekce vylučovacího ústrojí (především opět u HIV pozitivních pacientů). Infekce může být asymptomatická nebo se může projevit mikrohematurií, cystitidou, pyelonefritidou s dysurií a hematurií, v nejzávažnějších případech může vést k renálnímu selhání. *Pleistophora* a *Trachipleistophora* spp. byly popsány jako původci myositidy u několika imunokomprimovaných pacientů, kteří trpěli svalovou horečkou a svalovou slabostí (Franzen et Müller 2001).

Diseminovaná infekce mikrosporidií *Encephalitozoon* způsobila v několika zaznamenaných případech také mozkovou infekci. Pacienti trpěli cerebrálními příznaky (bolest hlavy, zvracení a spastické křeče) (Franzen et Müller 2001). V posledních letech bývají mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* stále častěji spojovány s obvyklými infekcemi u imunokompetentních jedinců, jako např. encefalitida a meningitida. Kombinace latentní mikrosporidiózy s jinými závažnými onemocněními však může představovat život ohrožující stav (Brdíčková 2019).

1.1.6 Metody detekce

Diagnostika nákazy mikrosporidii u lidí se v posledních letech velmi zlepšila a dnes máme k dispozici několik citlivých metod pro detekci mikrosporidiiózy. Řadí se k nim transmisní elektronová mikroskopie, světelná mikroskopie, imunofluorescenční testy protilátek s monoklonálními protilátkami, sérologické testy (CIA, IFA, ELISA, CIE a Western blot – k detekci IgG a IgM protilátek proti mikrosporidiím) a v neposlední řadě také molekulární techniky (např. hybridizační testy a PCR), jež slouží pro detekci, druhovou diferenciaci a fylogenetickou analýzu mikrosporidií. Pro studium cest přenosu mikrosporidií a imunitních reakcí nákazy jsou nezbytné zvířecí modely (např. imunodeficitní SCID myši), především z důvodu produkce monoklonálních a polyklonálních protilátek. Pro diagnostické účely je kultivace mikrosporidií na zvířecích modelech nevhodná, neboť tato technika je dostupná pouze v několika výzkumných laboratořích a je časově náročná (Franzen et Müller 1999, Franzen et Müller 2001).

1.1.7 Léčba mikrosporidiiózy

Ze studie Costa et al. 2000, kde byly hodnoceny léky pro léčbu mikrosporidiálních infekcí u různých hostitelů, bylo zjištěno, že u pacientů s nemocí AIDS byla velmi účinná léčba antiretrovirovou terapií, jež zvyšuje účinnost kontroly a eradikace mikrosporidiiózy pomocí obnovení funkcí imunitního systému pacienta. Proti širokému spektru mikrosporidií je účinný albendazol, který se váže na β -tubulin, bohužel však není účinný při infekcích způsobených *E. bienersi* nebo *V. corneae*, neboť tubulinové geny těchto mikrosporidií mají aminokyselinové zbytky, které jsou vůči albendazolu rezistentní. Mnohé další druhy mikrosporidií včetně *E. bienersi* reagují na fumagillin nebo na syntetické analogy fumagilinu (např. TNP-470). Fumagilin cyklohexylamin ve fyziologickém roztoku léčí oční infekce. V případě diseminovaných infekcí mikrosporidiiemi *Trachipleistophora* nebo *Anncaliia* je vhodné užití Itrakonazolu kombinovaným s albendazolem. (Han a Weiss 2017).

2 Cíle práce

- 1) Zpracovat literární rešerši o tématu.
- 2) Pomocí molekulárních metod vyšetřit vzorky mozkomíšních moků na přítomnost mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*.
- 3) Kvantifikovat množství spor v pozitivních vzorcích pomocí qPCR.
- 4) Vyvodit závěry ze získaných dat v souvislosti s epidemiologií mikrosporidióz.

3 Materiál a metody

3.1 Mozkomíšní moky

Vzorky mozkomíšních moků byly pro tuto bakalářskou práci poskytnuty Fakultní nemocnicí Bulovka, oddělením klinické mikrobiologie. Mozkomíšní moky poskytnuté pro tuto práci byly nemocnicí uchovávány ve zmraženém stavu po dobu několika měsíců po odběru k případné verifikační diagnostice, jedná se tedy o vzorky retrospektivní. Data o pacientech nejsou z důvodu GDPR uvedena. Pro výzkumné účely této bakalářské práce byly nemocnicí poskytnuty pouze údaje o roku narození a pohlaví pacientů.

3.2 Koncentrace mozkomíšních moků – centrifugace

Zmražené vzorky mozkomíšních moků se nechaly za laboratorní teploty rozehrát, veškerý obsah zkumavek byl následně přepipetován do sterilních laboratorních mikrozkušavek se šroubovacím uzávěrem o objemu 2 ml. Vzorky byly poté stočeny po dobu 5 minut v centrifuze při 14000 *g*. Po centrifugaci byl ze zkumavek mikropipetou odebrán supernatant a z takto připravených vzorků proběhla následná izolace DNA mozkomíšního moku.

3.3 Izolace DNA z mozkomíšního moku

Izolace DNA z mozkomíšního moku byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

Pracovní postup:

- 1) Do 2,0 ml mikrozkušavky na šroubovací uzávěr se sedimentem z mozkomíšních moků byly přidány skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm a 5 zirkonových kuliček o velikosti 2 mm, poté bylo připipetováno 200 μ l ATL pufru a obsah zkumavky byl zvortexován.
- 2) Vzorky byly homogenizovány v beadbeateru (MP Fast Prep®-24 Instrument) po dobu 1 minuty při maximální rychlosti (5,5 m/s).
- 3) Mikrozkušavky byly zvortexovány, následně bylo ke vzorkům připipetováno 20 μ l proteinázy K a poté probíhala po dobu 1 hodiny při teplotě 56 °C inkubace vzorků v termobloku za pravidelného míchání zkumavek v intervalech 10 minut.
- 4) Po inkubaci bylo ke vzorkům připipetováno 200 μ l AL pufru, obsah byl zvortexován.

- 5) Ke vzorkům bylo připipetováno 200 μ l 96 % EtOH, obsah byl opět zvortexován a centrifugován po dobu 45 s při 14000 *g*.
- 6) Veškerý supernatant byl přepipetován na Mini spin kolonu, centrifugován po dobu 3 minut při 14000 *g* a odpad ze sběrné zkumavky byl odebrán.
- 7) Na kolonu bylo připipetováno 500 μ l AW1 pufru, proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 14000 *g*, odpad ze sběrné zkumavky byl odebrán.
- 8) Dále bylo na kolonu připipetováno 500 μ l AW2 pufru, proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 14000 *g*, odpad ze sběrné zkumavky byl opět odebrán.
- 9) Za účelem odstranění zbytku AW2 pufru z DNA byly zkumavky opět centrifugovány po dobu 1 minuty při 14000 *g*.
- 10) Sběrná zkumavka byla vyjmuta.
- 11) Kolona byla vložena do nové mikrozskumavky o objemu 1,5 ml, na membránu kolony bylo napipetováno 200 μ l AE pufru, mikrozskumavka byla inkubována 1 minutu za laboratorní teploty a poté centrifugována 1 minutu při 14000 *g*.
- 12) Získaná DNA byla skladována v mrazničce při -20 °C.

3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Souhrn použitých chemikálií pro PCR reakci:

- Taq purple DNA polymeráza (1 U/ μ l, Top-Bio)
- 10 $\times$ koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (15 mM MgCl₂, Top-Bio)
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP's, 10 mM roztok, Top-Bio)
- PCR H₂O (Top-Bio)
- MgCl₂ (25 mM, Top-Bio)
- BSA (10 mg/ml, Sigma)
- Primery (10 μ M, Generi Biotech)

Pro metodu nested PCR byly využity dva páry primerů (vnější a vnitřní) (Tabulka 1), pomocí nichž byly amplifikovány pouze sekvence mikrosporidiální DNA. Amplifikována byla celá sekvence ITS včetně částí sekvencí malé (SSU) a velké (LSU) ribozomální podjednotky (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996).

Celkový objem reakční směsi (Tabulka 2) byl 50,00 µl pro každou PCR a veškeré sady reakcí zahrnovaly pozitivní a negativní kontrolu. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA *E. cuniculi* genotyp III, vyizolovaná z tkáňové kultury Vero E6, která je dlouhodobě kultivována *in vitro* v Laboratoři veterinární a medicínské protistologie BC AV ČR.

Tabulka 1: Nukleotidové sekvence specifických primerů *Encephalitozoon* spp.

Primární (vnější) primery (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996)

INT580F	5' - TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT - 3'
INT580R	5' - TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG - 3'

Sekundární (vnitřní) primery (navrženy v LVMP)

MSP-6A	5'- ATG CTT AAG TCM AAG GGG T - 3'
MSP-5A	5' - GTC GCT ATC TAA GAT GAC GC- 3'

Tabulka 2: Reakční směs pro nested PCR – *Encephalitozoon* spp. (1 reakce)

Reagencie	Zásobní roztoky	Primární reakce	Sekundární reakce
deionizovaná H ₂ O	–	35,10 µl	35,10 µl
MgCl ₂	25 mM	1,00 µl	1,00 µl
pufr	10×	5,00 µl	5,00 µl
dNTP's	10 mM	1,50 µl	1,50 µl
forward primer	10 µM	1,50 µl	1,50 µl
reverse primer	10 µM	1,50 µl	1,50 µl
BSA	10 mg/1ml	2,00 µl	2,00 µl
Taq	5 U/µl	0,40 µl	0,40 µl
DNA/PCR produkt	–	2,00 µl	2,00 µl
Celkový objem		50,00 µl	50,00 µl

Amplifikační program PCR reakce v termocycleru zahrnoval využití techniky „horkého startu“, kdy počáteční denaturace probíhala 3 minuty při teplotě 94 °C, následovalo 35 cyklů, při nichž byla DNA za teploty 94 °C po dobu 45 sekund denaturována, poté proběhlo nasednutí primerů za specifické teploty 55 °C pro primární a 57 °C pro sekundární reakci a to po dobu 45 sekund, následovala extenze při 72 °C po dobu 60 sekund a dosyntetizování řetězce za teploty 72 °C po dobu 10 minut.

3.5 Gelová elektroforéza

Pomocí gelové elektroforézy byla zjišťována velikost DNA fragmentů. Agarózový gel, jež byl 1%, obsahoval 0,00002 % ethidium-bromidu v 1 ml gelu.

Souhrn použitých chemikálií pro gelovou elektroforézu:

- 1× TAE pufr (24,2% vodný roztok Tris báze, 5,7% vodný roztok ledové kyseliny octové, 10% vodný roztok 0,5 M EDTA, pH 8,00)
- Agaróza (Biotech)
- Roztok ethidium bromidu v deionizované vodě o koncentraci 10 mg/ml (Sigma–Aldrich)
- 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc.)

Pracovní postup:

- 1) V Erlenmeyerově baňce byla smíchána agaróza s 1× TAE pufrem, roztok byl zahříván v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění.
- 2) Erlenmeyerova baňka s gelem byla pod tekoucí studenou vodou ochlazená na teplotu cca 60 °C.
- 3) Do baňky byl přidán roztok ethidium bromidu.
- 4) Agarózový gel byl nalit do nosiče, do kterého byly přidány hřebeny a gel byl ponechán ztuhnout.
- 5) Ze ztuhlého gelu byly vyjmuty hřebeny a připravený gel byl vložen do elektroforetické vany s 1% TAE pufrem tak, aby vytvořené jamky směřovaly ke katodě.
- 6) Do první jamky v gelu bylo napipetováno 6 µl ladderu a do dalších jamek 20 µl sekundárního PCR produktu, do posledních tří jamek gelu byly vždy napipetovány 2 pozitivní kontroly a jedna negativní kontrola.
- 7) Elektroforéza probíhala při 110 V, dokud nedošlo k separaci všech fragmentů.
- 8) Výsledky elektroforézy byly zhodnoceny po prosvícení gelu pomocí transiluminátoru.

3.6 Extrakce DNA z gelu

Izolace DNA z agarózového gelu byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich).

Pracovní postup:

- 1) Z agarózového gelu byl čistým skalpelem vyříznut DNA fragment, který byl následně vložen do čisté mikrozkušavky.
- 2) Do mikrozkušavky s fragmentem gelu bylo připipetováno 500 μ l Gel Solubilization Solution.
- 3) Gel s roztokem byl inkubován v termobloku při 50 °C po dobu 10 minut za pravidelného míchání zkumavek v intervalech 2-3 minut do úplného rozpuštění gelu.
- 4) Dále byla v termobloku při 65 °C inkubována voda na eluci.
- 5) Mezitím bylo na Mini spin kolonu napipetováno 500 μ l Column Preparation Solution, kolona byla následně centrifugována při 14000 *g* po dobu 1 minuty.
- 6) Po rozpuštění inkubovaného gelu bylo do mikrozkušavky připipetováno 150 μ l isopropanolu a obsah zkumavky byl řádně promíchán.
- 7) Veškerý objem vzorku byl přepipetován na kolonu a centrifugován při 14000 *g* po dobu 1 minuty, odpad ze sběrné zkumavky byl odebrán.
- 8) Na kolonu bylo připipetováno 700 μ l Wash Solution G, proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 14000 *g*, odpad ze sběrné zkumavky byl opět odebrán.
- 9) Za účelem odstranění zbytků roztoků byla kolona v centrifuze stočena na prázdko opět po dobu 1 minuty při 14000 *g*, poté byla zkumavka v centrifuze otočena o 180° a znovu centrifugována po dobu 3 minut při 14000 *g*.
- 10) Sběrná zkumavka byla vyjmuta a kolona byla vložena do nové mikrozkušavky.
- 11) Pomocí napipetování 30 μ l PCR vody předehřáté na 65 °C na střed kolony byla provedena eluce.
- 12) Vzorek byl 1 minutu inkubován a poté byl na 1 minutu zcentrifugován při 14000 *g*.

3.7 Sekvenace

S pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů v komerčních firmách (SeqMe, Dobříš, Česká republika; nebo Eurofins, Praha, Česká republika) bylo provedeno sekvenování sekundárních produktů PCR.

Výsledné sekvence byly spojeny pomocí programu ChromasPro (Technelysium, Pty Ltd, Jižní Brisbane, Austrálie), dále zpracovány v programu BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences) a porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank.

3.8 Kvantitativní Real-Time PCR (qRT PCR)

Počet spor *E. cuniculi* v získaných vzorcích mozkomíšních moků byl stanoven pomocí kvantitativní Real-Time PCR za využití specifických primerů (Tabulka 3), které amplifikují část genu kódující malou podjednotku rRNA *Encephalitozoon* spp., a specifické TaqMan próby (268 bp; Wolk et al. 2002). V Tabulce 4 jsou uvedeny reagenty a jejich objemy pro jednu reakční směs qRT PCR. Reakce probíhala na přístroji Light cycler 480 (Roche). Monitorování a vyhodnocení reakce bylo provedeno pomocí programu Light cycler 480 Software Release 1.5.0 SP4 (Roche).

Pro vyhodnocení výsledků byla sestavena kalibrační křivka, která byla vytvořena na základě známého počtu spor (10^3 - 10^8) z předem vyizolované DNA mikrosporidie rodu *E. cuniculi* genotyp II (Mynářová 2015).

Amplifikační program pro Real-Time PCR byl složen z počáteční denaturace při 95 °C po dobu 3 minut, dále amplifikace složené ze 45 cyklů (zahrnujících denaturaci při 95 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při teplotě 60 °C po dobu 10 s a extenzi při 72 °C po dobu 16 s), závěrečné extenze v rozmezí teplot 55-85 °C trvající 16 s rychlostí 20 °C/s a chlazení 40 °C po dobu 30 s (Wolk et al. 2002).

Tabulka 3: Nukleotidové sekvence specifických primerů a prób:

Encephalitozoon spp. (Wolk et al. 2002)

Forward primer	5' - GTC CGT TAT GCC CTG AGA - 3'
Reverse primer	5' - ACA GCA GCC ATG TTA CGA CT - 3'
Próba	5'-red 640-TGG ACG AAG ATT GGA AGG TCT GAG TC -phosphate-3'

Tabulka 4: Reakční směs pro Real-Time PCR (1 reakce)

Reagencie	Objem
Deionizovaná H ₂ O (Top-Bio)	5,0 µl
Próba (10 µM) (Generi Biotech)	0,5 µl
FastStart Universal Probe Master 2× (Roche)	12,5 µl
Forward primer (10 µM) (Generi Biotech)	1,0 µl
Reverse primer (10 µM) (Generi Biotech)	1,0 µl
DNA	5,0 µl
Celkový objem	25,0 µl

Každá série vzorků určených k analýze DNA pomocí metody Real-Time PCR zahrnovala negativní kontrolu. Jako standardy byly použity vzorky *E. cuniculi* o koncentraci $1,0 \times 10^6$. Vzorky byly testovány v triplikátech. Pro výpočet koncentrace spor na 1 ml mozkomíšního moku byla použita automaticky odečítaná hodnota CT (threshold cycle).

4 Výsledky

Vzorky byly odebrány 211 pacientům ve věkovém rozmezí od 2 do 81 let. Celkem 115 odebraných vzorků patřilo mužům, jejich věkové rozhraní se pohybovalo od 4 do 81 let, zbylých 96 vzorků patřilo ženám, jejichž věkové rozhraní bylo mezi 2 až 80 lety (Tabulka 5).

Tabulka 5: Charakteristika vyšetřované skupiny

Pohlaví	Počet pacientů	Věk (roky)	Medián (roky)
♂	115	4–81	34,0
♀	96	2–80	33,5
Celkem	211	2–81	34,0

Z celkového množství vzorků bylo 6 pozitivních. Jeden pozitivní vzorek patřil muži a pět ženám. Koncentrace spor ve vzorcích se pohybovala v rozmezí od 3 do 50 spor na 1 ml vzorku. Věk infikovaných jedinců se pohyboval od 13 do 75 let. Čtyři ze šesti pozitivních vzorků byly úspěšně osekvenovány, detekován byl *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II. Bohužel u dvou vzorků se nepodařilo i přes pozitivní výsledek q-PCR naamplifikovat produkt konvenční PCR. Výsledky jsou zaznamenány v Tabulce 6.

Tabulka 6: Výskyt mikrosporidií rodu *Encephalitozoon cuniculi* ve vyšetřovaných vzorcích mozkomíšních moků

Pohlaví	Počet pacientů	Počet pozitivních (qPCR)	Koncentrace (spor/ml)	Věk (roky)	Genotypizace
♂	115	1	$3,0 \times 10^0$	63	<i>E. cuniculi</i> II
			$5,7 \times 10^0$	13	<i>E. cuniculi</i> II
			$10,0 \times 10^0$	32	-
♀	96	5	$1,1 \times 10^1$	45	<i>E. cuniculi</i> II
			$5,1 \times 10^1$	48	<i>E. cuniculi</i> II
			$3,0 \times 10^0$	75	-
Celkem	211	6			

5 Diskuze

Mikrosporidie jsou jednobuněční, všudypřítomní paraziti přežívající mimo hostitelskou buňku ve stádiu spory. Mikrosporidie infikují široké spektrum hostitelů, mimo jiné i člověka. K nákaze těmito organismy dochází především ze zdrojů kontaminované vody (užitkové i pitné), z potravin (ať už tepelně zpracovaných či nikoliv) nebo pomocí kontaminovaného aerosolu. U lidí je nejlépe popsáným druhem těchto organismů *Encephalitozoon cuniculi*, který infikuje rozsáhlé spektrum obratlovců i bezobratlých (Sak et al. 2022, Han et al. 2021)

Přestože jsou mikrosporidie malí intracelulární paraziti, jsou schopni i přes jejich velikost způsobit rozsáhlé infekce během několika dnů. Dosud není znám přesný mechanismus, jakým se mikrosporidie dostávají během akutních infekcí ke svým cílovým tkáním. Diseminovaná mikrosporidióza byla zaznamenána např. v kloubech pacientů, kteří podstoupili operaci kloubní náhrady. Touto otázkou se zabývala studie Kicia et al. (2018), při níž bylo na přítomnost *Encephalitozoon* spp. vyšetřeno 53 imunokompetentních pacientů, z nichž 23 bylo po revizi a 30 po primární endoprotéze kyčelního kloubu. Vyšetřována byla periprotetická tkáň, močové sedimenty a stolice pacientů. Klinické příznaky mikrosporidiózy se neprojevovaly u žádného z nich. Pozitivní periprotetickou tkáň na přítomnost mikrosporidie *Encephalitozoon* mělo 10 pacientů, z nichž 9 bylo po revizi a 1 po primární endoprotéze kyčelního kloubu. Vzorky stolice a moči mělo pozitivních 8 pacientů, 7 pozitivních vzorků pocházelo z moči a 1 ze stolice. Z výsledků této studie vyplývá, že latentní mikrosporidióza by mohla způsobovat osteolýzu periprotetické tkáně, jež následně vede ke ztrátě stability implantátu. Odhalení příčiny infekce tkáně v okolí ortopedického implantátu a včasná léčba je velkou výzvou pro lékaře vzhledem k možnému výskytu chronického zánětu v těle pacienta a tím zvyšujícímu se riziku morbiditu, ale také vzhledem k tomu, že díky stále častějším operacím kloubních implantátů se v blízké budoucnosti očekává významný nárůst výskytu infekcí v těchto oblastech.

Objasněním mechanismu dosažení zánětlivých ložisek se zabývala studie Sak et al. (2022), ve které byly testovány souvislosti indukce zánětu u experimentálně infikovaných imunokompetentních BALB/c a imunodeficitních SCID myší. U imunokompetentních i imunodeficitních SCID myší byla zjištěna pozitivní souvislost mezi indukcí zánětu a nárůstem počtu mikrosporidií v místech probíhajícího zánětu. Z výsledků tohoto experimentu vyplývá, že buňky imunitního systému, spojené s prozánětlivými imunitními

reakcemi, mohou přes celé tělo směrem k ohnisku zánětu jako nosiče transportovat mikrosporidie. Přítomnost mikrosporidií v místech zánětu byla potvrzena na základě jejich výskytu v zanícených tkáních. Souvislost mezi prozánětlivými imunitními reakcemi a rozvojem mikrosporidie v místech probíhajících zánětů je podstatné objasnit pro následné vhodné terapeutické metody zvolené při léčbě pacientů s akutní mikrosporidiální infekcí.

Přestože mikrosporidie je vzhledem k publikacím o této problematice detekována především u imunodeficitních pacientů (nejčastěji u HIV pozitivních), nemusí to znamenat, že zdraví jedinci nejsou těmito patogeny také ohroženi. Ve studii Sak et al. (2011a) byla potvrzena přítomnost latentní mikrosporidiové infekce téměř u všech zdravých testovaných jedinců. Testovány byly vzorky stolice, moči a krevního séra od patnácti zdravých lidí ve věku 22–56 let po dobu tří měsíců. Vzorky byly testovány pomocí metody IFA na přítomnost specifických antimikrosporidiových protilátek. U čtrnácti jedinců byly tyto protilátky zaznamenány. Nejčastěji byly detekovány mikrosporidie *Encephalitozoon* spp. a *Enterocytozoon bieneusi*. Tyto výsledky poukazují na skutečnost, že i zdánlivě zdraví jedinci mohou být infikováni mikrosporidii, byť nevykazují žádné klinické příznaky. Na základě tohoto výzkumu můžeme říci, že s rostoucím věkem lidí roste i riziko výskytu nákazy. Rovněž zde vyvstává otázka, zda by infekce v případě poklesu imunity a následné reaktivace latentní mikrosporidie mohla vést ke zhoršení zdravotního stavu, který by jedince mohl ohrozit na životě (Sak et al. 2011a,b, Ditrich et al. 2011).

V této studii byl prokázán výskyt mikrosporidií u 3 % testovaných vzorků mozkomíšního moku od 211 pacientů nemocnice Bulovka. Ačkoliv je počet infikovaných jedinců zdánlivě nízký, nejedná se o malou či zanedbatelnou četnost výskytu onemocnění. Pozitivní výsledky přítomnosti mikrosporidií u 6 jedinců poukazují na zvyšující se prevalenci latentní mikrosporidie s věkem pacientů, což je ve shodě s výsledky Sak et al. 2011a. Také je důležité brát v potaz, že na mikrosporidie byli testováni pouze pacienti jedné nemocnice a do výzkumu byly použity pouze vzorky mozkomíšního moku. V případě, že by testování vzorků na mikrosporidie bylo např. z moči či stolice od pacientů s urologickými či gastrointestinálními problémy, mohli bychom očekávat daleko vyšší výskyt pozitivních výsledků. Nicméně přítomnost mikrosporidií v mozkomíšních mociích pacientů představuje potenciálně závažný stav, my bohužel na základě neposkytnutých anamnéz pacientů nemůžeme vyvozovat žádné souvislosti s klinickým stavem pacientů a důvody odběru vzorků mozkomíšních moků zůstávají neobjasněné. Lze ale předpokládat, že by v některých případech mohla existovat souvislost mezi potížemi pacientů a přítomností mikrosporidií

v moku, podobně jako tomu bylo ve studii Ditrich et al. (2011)., kde byl zaznamenán případ pacienta po infarktu myokardu s hemiparézou a diabetem mellitus 2. typu, který pacientovi způsoboval částečnou imunosupresi. Po vyšetření mozkomíšního moku, které vyloučilo bakteriální či virový původ nákazy, byla zjištěna přítomnost mikrosporidií a lokalizována abscesová dutina v pravém frontálním laloku. Vyšetření extrahovaného hnisu z abscesu odhalilo přítomnost mikrosporidií rodu *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I, přestože pacient netrpěl žádnými klinickými příznaky mikrosporidiální infekce.

Hlavním cílem této práce je rozšířit povědomí o latentní mikrosporidii především v lékařské komunitě. Zdánlivě nízká četnost výskytu tohoto onemocnění je způsobena pouze nízkým počtem vyšetřovaných pacientů s nespecifickými a obtížně diagnostikovatelnými příznaky infekcí. U imunokompetentních jedinců je pomocí již zmíněné sérologie (Sak et al. 2011a) prokázán také vysoký výskyt latentní mikrosporidie, avšak nezpůsobující žádné klinické projevy, i proto u zdravých jedinců zůstává tato infekce neodhalena. Důležitým závěrem vyplívajícím z celého výzkumu je, že zvyšující se prevalence mikrosporidiových infekcí by nemusela mít vážné klinické dopady na infikované jedince, případně by byl jejich zdravotní stav výrazně zlepšen, pokud by byli pacienti na mikrosporidii testováni preventivně a byli by zavčasu léčeni příslušnými medikamenty.

6 Závěry

Tato práce se zabývala diseminovanou latentní mikrosporidiózou jako původcem skrytých infekcí způsobující řadu závažných onemocnění s nespecifickými příznaky. Při nevčasné léčbě mohou být tato onemocnění smrtelná.

Na latentní mikrosporidiovou infekci bylo pozitivních 6 vzorků mozkomíšních moků pacientů z celkového počtu 211. Přítomnost mikrosporidiální DNA ve vzorcích mozkomíšních moků byla tedy potvrzena u 3 % pacientů, což rozhodně není zanedbatelné množství, poukazuje to na nedostatečnost rutinních vyšetření a mělo by nám to být výstrahou.

7 Seznam použité literatury

Aseeja, P., Shaikh, Y., Bajpai, A., Sirsikar, P., & Kalra, K. (2021). Advancement in our understanding of immune response against *Encephalitozoon* infection. *Parasite Immunology*. 43: e12828.

Brdíčková, K. (2019). Role zánětu v aktivaci latentní mikrosporidiózy způsobené *Encephalitozoon cuniculi* u imunokompetentních a imunodeficitních myší. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta. 60 pp.

Didier, E. S., Varner, P. W., Didier, P. J., Aldras, A. M., Millichamp, N. J., Murphey-Corb, M., Bohm, R., & Shadduck, J. A. (1994). Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol (Praha)*. 41: 1-11.

Ditrich, O., Chrdle, A., Sak, B., Chmelík, V., Kubále, J., Dyková, I., & Kváč, M. (2011). *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2769–2771.

Franzen, C., & Müller, A. (1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 243-285.

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.

Freeman, M. A., & Sommerville, C. (2009). *Desmozoon lepeophtherii* n. gen., n. sp., (Microsporidia: *Enterocytozoonidae*) infecting the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: *Caligidae*). *Parasites & Vectors*. 2: 58-58.

Friedberg, D. N., & Ritterband, D. C. (1999). Ocular microsporidiosis, in: Wittner M., Weiss L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 293–314.

Fries, I. (1993). *Nosema apis*—a parasite in the honey bee colony. *Bee World*. 74: 5–19.

Germot, A., Philippe, H., & Le Guyader, H. (1996). Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 14614–14617.

Han, B., Pan, G., & Weiss, L. M. (2021). Microsporidiosis in humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 34: e0001020.

Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiol Spectrum*. 5: 97–113.

Hinney, B., Sak, B., Joachim, A., & Kváč, M. (2016). More than a rabbit's tale – *Encephalitozoon* spp. in wild mammals and birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 5: 76–87.

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.

Kent, M. L., Elliot, D. G., Groff, J. M., & Hedrick, R. P. (1989). *Loma salmonae* (protozoa: microspora) infections in seawater reared coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*. 80: 211–222.

Kicia, M., Kopacz, Z., Kváč, M., Sak, B., Sokulska, M., Cebulski, K., Hendrich, A. B., & Pozowski, A. (2018). Disseminated infection of *Encephalitozoon cuniculi* associated with osteolysis of hip periprosthetic tissue. *Clinical Infectious Diseases*. 67: 1228–1234.

Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Květoňová, D., & Kváč, M. (2018). Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model. *Experimental Parasitology*. 193: 51-57.

Kotler, D. P., & Orenstein, J. M. (1999). Clinical syndromes associated with microsporidiosis, in: Wittner M., Weiss L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 258–292.

Koudela, B., Kučerová, S., & Hudcovic, T. (1999). Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitol (Praha)*. 46: 171-174.

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.

Levaditi, C., Nicolau, S., & Schoen, R. (1923). L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *C. R. Soc. Biol. (Paris)*. 89: 984-986.

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 myši. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta. 111 pp.

Moss, J. A., & Snyder, R. A. (2017). Biofilms for monitoring presence of microsporidia in environmental water. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 64: 533-538.

Nägeli, K. W. (1857). Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot Z*. 15: 760-761.

Overstreet, R. M. (1973). Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts. *Aquaculture*. 2: 105–140.

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

Sak, B., Holubová, N., Květoňová, D., Hlásková, L., Tinavská, J., Kicia, M., Zajaczkowska, Ž., & Kváč, M. (2022). Comparison of the concentration of *Encephalitozoon cuniculi* genotypes I and III in inflammatory foci under experimental conditions. *Journal of Inflammation Research*. 15: 2721-2730.

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

Shahrul Anuar, T., M Al-Mekhlafi, H., Md Salleh, F., & Moktar, N. (2013). New insights of Microsporidial infection among asymptomatic aboriginal population in Malaysia. *PLoS One*. 8: e71870.

Szumowski, S. C., & Troemel, E. R. (2015). Microsporidia–host interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 26: 10–16.

Vossbrinck, C. R., Maddox, J. V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B. A., & Woese, C. R. (1987). Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*. 326: 411-414.

Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A., & Owen, R. L. (1994). Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 7: 426–461.

Weiss, L. M. (2001). Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Tropica*. 78: 89-102.

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.