

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Oportunní paraziti u pacientů s transplantáty a dalších
imunosuprimovaných pacientů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracovala: Petra Zajíčková
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich Csc.

6. 5. 2010

Abstract

The main objective of this study was to establish the rate of occurrence of opportunistic parasites in patients with bone-marrow transplants. As a result of reduced immunity due to immunosuppressive therapy, these patients are more susceptible to multiple infections, in particular to infections caused by opportunistic parasites.

The parasites were detected using MIFC sedimentation, staining according to Miláček-Vítovec and Calcofluor staining. These methods were used to investigate a total of 100 samples, of which 4 were positive for the presence of microsporidia. The presence of microsporidia in the four samples was confirmed with polymerase chain reaction (PCR). Occurrence of other opportunistic parasites was not confirmed.

Microsporidia were found in 7,4 % of patients with bone-marrow transplants.

This fact was rather surprising as the increasing number of patients with suppressed immunity is associated with increased occurrence of these opportunistic parasites as well.

The results of this research might be used not only as educational material for the undergraduates of the Faculty of Health and Social studies, but also for the public concerned with this issue.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Doc. RNDr. Olegu Ditrichovi Csc. za odbornou pomoc, trpělivost a ochotu, kterou mi věnoval při vzniku této bakalářské práce. Děkuji také celému kolektivu laboratoře lékařské parazitologie PaÚ AVČR v Českých Budějovicích, bez jejich pomoci bych se neobešla. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Fajfrlíkovi z Plzeňské FN Bory, za poskytnutý materiál, bez kterého by tato práce nevznikla.

Prohlášení

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma *Oportunní paraziti u pacientů s transplantáty a dalších imunosuprimovaných jedinců* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích 6. 5. 2010

.....

OBSAH:	5
Úvod	7
1. Současný stav	8
1. 1 Imunitní systém a transplantace	9
1.2 Parazitismus	9
1.2.1 Oportunní parazitismus	9
1.2.2 <i>Cryptosporidium parvum</i>	10
1.2.3 <i>Isospora belli</i>	12
1.2.4 <i>Cyclospora cayetansis</i>	13
1.2.5 <i>Toxoplasma gondii</i>	14
1.2.6 Amoebozoa	16
1.2.7 <i>Giardia intestinalis</i>	17
1.2.8 Mikrosporidie	18
2. Cíl práce a hypotézy	21
2.1 Cíl práce	21
2.2 Hypotézy	21
3. Metodika	22
3.1 Materiál	22
3.2 Metody	24
3.2.1 Makroskopické hodnocení stolice	24
3.2.2 Mikroskopické vyšetření stolice	24
3.2.2.1 Koncentrační sedimentační metoda M.I.F.C	24
3.2.2.2 Barvení oocyst kryptosporidií podle Miláčka a Vítovce	24
3.2.2.3 Barvení spor Calcofluorem	25
3.2.2.4 Izolace DNA	26
3.2.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	28
3.2.2.6 Gelová elektroforéza	30
3.2.2.7 Statistické zpracování	32
4. Výsledky	33
4.1 Makroskopické vyhodnocení výsledků	33

4.2 Mikroskopické vyhodnocení výsledků	33
4.3 Vyhodnocení výsledků mikrosporidií metodou PCR	34
4.3.1 Vyhodnocení sekvencí	36
4.4 Statistické hodnocení	37
5. Diskuse	39
6. Závěry	43
7. Literatura	44
8. Klíčová slova	54

Úvod

Oportunní parazité jsou považováni za patogenní organismy, protože mohou způsobovat závažná onemocnění u osob se sníženou obranyschopností např. u pacientů s AIDS a u příjemců transplantovaných orgánů. Jedinci, kteří mají sníženou obranyschopnost, jsou náchylnější k infekcím.

Prevence a léčba oportunních infekcí je velmi důležitá, kvůli neustále se zvyšujícímu výskytu imunosuprimovaných jedinců.

Tato práce se snaží ukázat na možná rizika vyplývající z nákazy těmito oportunními parazity a na vliv imunosupresivní léčby u pacientů po transplantaci kostní dřeně.

1. Současný stav

1.1 Imunitní systém a transplantace

Hlavním cílem přenosu tkání nebo orgánů (transplantace) je náhrada nefunkční tkáně či orgánu příjemce za zdraví ekvivalent.

Dárce, ze kterého pochází transplantovaný orgán či tkáň (štěp) může vyvolat u příjemce reakci imunitního systému a způsobit tak odhojení (reakci) transplantátu, který je vnímán jako cizí. Imunokompetentní buňky imunodeficientního příjemce mohou ve štěpu reagovat s tkáněmi příjemce a vyvolat tak reakci proti hostiteli (GvH-graft versus host) (Hořejší et Bartůňková, 2005).

Přenos štěpu z dárce na příjemce se může uskutečnit třemi způsoby. Autotransplantací, během které dochází k přenosu tkáně v rámci jednoho jedince, při níž nedochází k indukci odhojovací reakce. Dalším přenosem a zároveň nejčastějším, je přenos z jednoho jedince na druhého, kdy se jedná o tzv. alogenní transplantaci. Zde je však indukována odhojovací reakce v důsledku neshody ve výbavě HLA dárce a příjemce. Poslední možností je přenos z jiného živočišného druhu na člověka - xenotransplantace. Ta se však v klinické praxi využívá výjimečně (Krejsek et Kopecký, 2004).

Hlavním účelem transplantace kmenových buněk je nahradit abnormální nebo nefunkční krevní tvorbu. Tento typ transplantace je však velmi náročný z hlediska imunodeficiency. Hlavní problém představují infekce, které jsou nejčastější příčinou smrti.

Pacienti po transplantaci kostní dřeně jsou citlivější k nejrůznějším typům infekcím, a to především k infekcím vyvolané oportunními mikroorganismy. U posttransplantačního imunodeficitu se můžeme setkat s širokým spektrem infekcí vyvolaných bakteriemi, viry, houbami a parazity. Při buněčném imunodeficitu se můžeme setkat především s cytomegalovirovými, herpetickými a adenovirovými infekcemi. Při dlouhodobé buněčné imunodeficiency se připojují aspergilózy, kandidózy, kryptosporidiózy aj. V případě alogenních transplantací se projevy

imunodeficiencie mohou prohlubovat při akutní reakci štěpu proti hostiteli a její léčbě (Bartůňková et al., 2007).

Orgánové transplantace představují jinou situaci, neboť zde nedochází k nápravě porušené imunity, ale o záměrně navozenou imunosupresi, jež má potlačit reaktivitu jinak zdravého imunitního systému příjemce, aby nedošlo k imunitní reakci proti transplantátu.

Vlivem imunosepresivní léčby jsou projevy imunodeficiencie u orgánových transplantací mnohem výraznější. Imunosupresiva zasahují především T lymfocyty, které potlačují buňkami zprostředkovanou imunitu, což má za následek vznik oportunních infekcí (Bartůňková et al., 2007).

1.2 Parazitizmus

Parazitem je nazýván živočišný organismus, který se po celý život nebo po určité životní období vyskytuje v těle nebo na těle hostitele, který mu poskytuje ochranné podmínky a látky potřebné k výživě a k množení. Paraziti člověka se nacházejí mezi helminty, členovci a protisty (Jíra, 2009).

Protisti a helminti se uplatňují jako endoparazité, kteří nejčastěji osidlují tělní dutiny a tkáně. Členovci se uplatňují jako ektoparazité, kteří nejčastěji parazitují na tělních površích, kde působí jako trapiči člověka nebo přenašeči.

Vzájemné působení parazita a hostitele je velmi složité. Na jejich vzájemném soužití často závisí patogenita parazitů pro hostitele, která je dána vlivem samotného parazita, ale i reakcí organismu hostitele na jeho přítomnost (Bednář et al., 1998).

1.2.1 Oportunní parazitizmus

Oportunní parazité jsou považováni za patogenní organismy, protože mohou způsobovat závažná onemocnění (Franzen et Miller, 2001) u osob se sníženou obranyschopností např. u pacientů s AIDS a u příjemců transplantovaných orgánů (Didier et al., 2000). Jedinci, kteří mají sníženou obranyschopnost, jsou náchylnější k různým infekcím (Wynn et al., 2004). Prevence a léčba oportunních infekcí je velmi důležitá, kvůli neustále se zvyšujícímu výskytu imunosuprimovaných jedinců

(Rotterdam et Tang, 1994). Pacienti s buněčnou imunitní dysfunkcí jsou nejčastěji infikováni řadou virových infekcí, včetně skupin intracelulárních bakterií a plísní. Pacienti s primární poruchou humorální imunity, jsou často infikováni bakteriemi, ale i střevními parazity, jako např. *Giardia lamblia*. Pacienti s fagocytární poruchou jsou obzvláště náchylní k infekcím způsobené G^- bakteriemi a plísněmi. Nejčastější oportunní organismy, které můžeme vidět u imunosuprimovaných jedinců jsou *Pneumocystitis jiroveci*, *Aspergillus*, *Candida*, a cytomegalovirus (Algar et Novelli, 2007), *Cryptosporidium* spec. div., *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* a jiné (Jíra, 2009).

1.2.2 Kryptosporidie

Cryptosporidium parvum, *Cryptosporidium hominis* a další druhy kryptosporidií, jako *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. suis* aj. (Jíra, 2009) patří do rodu *Cryptosporidium*, třídy Apikomplexa (Spano et Crisanti, 2000). Mezi nejvýznamnější druhy kryptosporidií patří *C. parvum* a *C. hominis*.

Cryptosporidium hominis byl považován za lidský genotyp *C. parvum* (Volf et al., 2007). Tento druh je specializovaný na člověka, ale vzácně se může vyskytovat i u jeřábů, telat a opic. Pro člověka je velmi virulentní, s vysokým potenciálem interhumánního přenosu. Tento druh je na našem území vzácný, častěji se vyskytuje v západní Evropě (např. v Británii) nebo v USA. Představuje velké riziko pro imunokompetentní i imunodeficitní jedince (Ditrich, 2005).

Cryptosporidium parvum zahrnuje především tzv. genotyp II (bovinní) a řadu jiných genotypů, které jsou v tomto druhu zařazeny. *Cryptosporidium parvum* je druh s nejširším hostitelským spektrem; infikuje hlodavce, šelmy, zajíce, primáty včetně člověka a jiné. Kvůli snadnému experimentálnímu přenosu je nejlépe prozkoumaný druh a týká se jej většina informací o imunitní odpovědi a biochemických cyklech apod. Vyskytuje se běžně na našem území, je rozšířen v chovech hospodářských zvířat. Převažuje mezi izoláty získanými z člověka, zejména u dětí. Tento druh představuje poměrně velké riziko pro imunokompetentní i imunodeficitní jedince (Ditrich, 2005).

Kryptosporidie jsou obligátní střevní paraziti, kteří nejčastěji napadají trávicí (Carey, 2004), dýchací trakt a ojediněle se mohou vyskytovat i v jiných orgánech (Volf et al., 2007).

Infekce začíná po spolknutí oocysty hostitelem. Každá oocysta obsahuje čtyři pohyblivé sporozoity, které následnou excystací v tenkém střevě (Kuhls, 2000) adherují k mikroklikům enterocytů. Během asexuálního množení neboli merogonii dochází k dělení mnohobuněčného merontu (Volf et al., 2007), ze kterého vzniká meront I. typu s 8 merozoity, kteří po protržení hostitelského enterocytu napadají další střevní buňky, a meront II. typu obsahující pouze 4 merozoity II. generace.

Gametogonie je stádium množení, kdy se vytvářejí nezralé gametocyty, které se následně mění na zralé samičí makrogamonty a samčí mikrogamonty (Myint et Cann, 1984). Sporulace začíná po splynutí samčí a samičí gamety, kdy vzniká zygota, z ní oocysta, v níž se vytváří sporocysta obsahující 4 sporozoity a jedno zbytkové tělísko. Zralá oocysta neobsahuje žádné sporocysty, mikropyle, Stiedovo tělísko ani sporocysty. Oocysty jsou vylučovány ve stolici (Jíra, 2009).

Vývoj kryptosporidií je spojen se slizničními povrchy, takže místní imunitní reakce se váží na slizniční lymfatickou tkáň (MALT-mucosa-associated lymphoid tissue). Vzhledem k jejich výjimečné intarcelulárně-extracytoplazmatické lokalizaci se imunitní odpověď liší od mechanismů jiných intarcelulárních parazitů. Mechanismy ochrany sliznic jsou zprostředkovány lektinem (MBL-mannose binding lectin). Při deficitu tohoto lektinu u osob s HIV+/AIDS vede ke zvýšenému riziku nákazy. U nemocných s HIV+/AIDS klesá počet CD4+ lymfocytů a stoupá tak vnímavost k nákaze (Jíra, 2009).

Střevní infekce se projevuje nekrvavými vodnatými průjmy (Bednář et al., 1994) obvykle bývá doprovázena zvracením, křečemi v podbřišku a malabsorpcí (Graaf et al., 1999). Mezi ohrožené osoby patří jedinci s primárními imunodeficiencemi, s malignitami, nemocní po transplantaci kostní dřeně a solidních orgánů, děti s malnutricí (Jíra, 2009). U imunokompromitovaných pacientů, kteří podstoupili transplantaci solubilních orgánů nebo transplantaci kostní dřeně (Karp et Colebunders, 2006) se riziko nákazy výrazně zvyšuje, pokud dojde k odhojení orgánu vlivem

agresivní léčby (Hicks et al., 2007). U imunodeficitních HIV+ pacientů (Abdo et al., 2003) dochází k trvalému onemocnění, které se podílí na rozvratu elektrolytové rovnováhy, dehydrataci a hubnutí (Bednář et al., 1994). Nejčastěji je postiženo tenké střevo, také hltan, jícen, žaludek a tlusté střevo.

Nákaza se šíří fekálně-orální cestou nebo vdechnutím oocyst. Infekční dávka představuje 10-100 oocyst. Imunodeficitní jedinci mohou denně vyloučit až miliardu oocyst. Za rizikové se považují osoby s dysfunkcemi imunity, hospitalizovaní nemocní, zdravotnický personál, homosexuálové a osoby s HIV+/AIDS, jejichž počet T lymfocytů CD4+ je nižší než $100 \times 10^6/l$. U osob s deficitem T lymfocytů dochází k atrofii mikrokliků, hyperplazii krypt a erozí střevního epitelu (Jíra, 2009). Nákaza indukuje střevní zánětlivou reakci se zvýšeným počtem lymfocytů, makrofágů a plazmocytů (Karp et Colebunders, 2006).

Kryptosporidióza je příčinou průjemového onemocnění po celém světě. Příznaky mohou být mírné až těžké závažnosti (Karp et Colebunders, 2006), závisejí na místě infekce, výživových návycích a na imunitním stavu hostitele (Chalmers et Davies, 2010). Diagnostika je založena na průkazu oocyst ve stolici v sedimentu nebo v nativním preparátu. Za spolehlivou metodu se uvádí PCR, kterou můžeme rozlišovat genotypy kryptosporidií a může být použita jak pro environmentální, tak i pro klinické analýzy (Bednář et al., 1994).

Léčba kryptosporidiózy není dosud přesně známa. U imunosuprimovaných pacientů se nejčastěji využívá paramomycin a azithromycin (Jíra, 2009), s pochybným účinkem.

1.2.3 *Isospora belli*

Isospora belli je jednobuněčný parazit, náležící do čeledi Sarcocystidae, který se vyskytuje pouze u člověka (Myint et Cann, 1984). Merogonická a gametogonická stádia probíhají v buňkách epitelu tenkého střeva (Walther et Topazian, 2009), kde se nacházejí asexuální i sexuální formy (Dillingham et al., 2006), které jsou situovány v parazitoformní vakuole (Velásquez et al., 2001). Ke sporulaci dochází ve vnějším prostředí, ale i ve střevě hostitele. Vnitřní formy se nacházejí v enterocytech lemující

klky tenkého střeva (Jíra, 2009). Ve stolici se vylučují plně vysporulované oocysty, které mají elipsovitý tvar a měří 20-33 μ m (Jírovec et al., 1977). Sporocysta obsahuje 4 sporozoity a zbytkové tělísko. Opakováním merogonického a gametogonického stádia ve střevě se vysvětluje chronický průběh nákazy.

Nákaza je vidět nejčastěji u imunokomprimovaných jedinců (Jíra, 2009). Způsobuje chronické (Velásquez et al., 2001), vodnaté průjmy u pacientů s AIDS, u pacientů po transplantaci (Atambay et al., 2007) a u dětí s malnutricí (Pickering, 1991). Nákaza je spojena se změnami struktury sliznice, se snížením mikroklků a hypertrofií krypt (Serra et al., 2006). U imunokompetentních jedinců se nákaza projevuje bezpříznakově nebo po inkubační době se objevuje gastroenteritida s mírnými průjmy (Jíra, 2009). Tkáňové cysty se nacházejí v lymfatických uzlinách, v játrech a ve slezině (Resende et al., 2009). Nákaza se šíří fekálně-orální cestou nebo kontaminovanou potravou (Jíra, 2009) a vyskytuje u homosexuálů (Kobayashi et al., 1985) nebo u cestovatelů (Walther et al., 2009).

Diagnostika spočívá v nálezů průhledných oocyst, které obsahují dvě sporocysty ve stolici. Oocysty se podle Ziehla-Neelsena barví růžově a fluorescenčním barvením UVITEX 2B se barví světle modře.

K léčbě izosporózy se nejčastěji využívá kotrimoxazol, nebo kombinace pyrimethaminu a sulfadiazinu (Bednář et al., 1994).

1.2.4 *Cyclospora cayetanensis*

Cyclospora cayetanensis je střevní kokcidie (Chacín-Bonilla, 2010) blízké příbuzná rodu *Eimeria*. *Cyclospora cayetanensis* se nachází v enterocytech duodena, jejunu a ve žlučových cestách (Shields et al., 2003). Po spolknutí oocyst dochází k excystaci. Vývojový cyklus je zahájen sporulací oocyst, ze kterých vznikají dvě sporocysty, z nichž každá obsahuje dva sporozoity. Uvolnění sporozoiti napadají enterocyty v tenkém střevě.

Sporulace zahrnuje asexuální i sexuální fázi množení. Endogenní sporulace probíhá v jejunu a je situována v parazitoforní vakuole. Exogenní sporulace probíhá

mimo hostitele (Percival et al., 2004). Oocysty jsou vylučovány neinfekční ve stolici (Dillingham et al., 2006).

Cyclospora cayetanensis je lidský patogen podílející se na onemocnění gastrointestinálního traktu (Alakpa et al., 2002). Klinicky se onemocnění může projevovat asymptomaticky i symptomaticky. Příznaky jsou spojeny se střevními záněty, s patologickými změnami a malabsorpcí. U pacientů s imunitní dysfunkcí dochází k dlouhotrvajícím vodnatým průjům, nevolnosti, břišním křečím a nechutenství (Ortega et al., 1998).

Riziko infekce u příjemce transplantátu zahrnuje dva hlavní faktory. Jedná se o epidemiologickou expozici pacienta a stav imunosuprese (Fishman et Ramos, 2005). Nákaza postihuje děti a dospělé po celém světě. *Cyclospora cayentanensis* byla popsána v Severní, Střední a Jižní Americe, Karibiku, Africe, Bangladéši, Jihovýchodní Asii, Austrálii, Anglii a východní Evropě (Ortega et al., 1998). Šíří se fekálně-orální cestou (Mansfield et al., 2004) prostřednictvím oocyst z kontaminované vody nebo potravy. *Cyclospora cayentanensis* je významnou příčinou cestovatelských průjů.

Prevalence spočívá v omezení šíření oocyst *C. cayentanensis* v životním prostředí a ve zlepšení hygienických návyků (Chacín-Bonilla, 2010).

Diagnostika je založena na mikroskopickém průkazu oocyst ve vyšetřované stolici a na použití vhodné barvicí techniky (Mansfield et al., 2004).

K léčbě cyklosporidie se nejčastěji používá trimethoprimem-sulfamethoxazol (William et Petri, 2003).

1.2.5 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii je unikátní intracelulární parazit (Miller et al., 2009), jehož vývojový cyklus zahrnuje několik forem vývojové řady a je charakterizován střídáním hostitele konečného, jímž je nejčastěji kočka domácí a mezipositelé, které mohou představovat různé druhy obratlovců a savců včetně člověka (Jíra, 2009). Infekční formou je odolná oocysta vytvářející se pouze ve střevě nakažené kočky domácí, která je vylučována ve výkalech. Čerstvě vyloučená oocysta není infekční, dozrává až po několika hodinovém pobytu na vzduchu. Člověk se infikuje požitím zralé oocysty či

pseudocysty v mase mezihostitelů obvykle alimetární cestou nebo přechodem vývojových forem parazita přes placentu. Ve střevě infikovaného jedince se z oocysty aktivně uvolňují sporozoiti o velikosti 2-8 μ m, které pronikají do tkání oka, mozku a svalstva, kde se aktivně množí. Vznikají tkáňové cysty obsahující velké množství cystozoitů. Tkáňové cysty jsou schopné dlouhodobě přežívat v těle hostitele, ale i mimo něj (Bednář et al., 1994). *Toxoplasma gondii* je neobvyklý tím, že jeho šíření nevyžaduje průchodu definitivním hostitelem (Halonen et Weiss, 2009), kde je jeho vývojový cyklus dokončen (Bednář et al., 1994). *Toxoplasma gondii* podněcuje B buňky k sekreci imunoglobulinů třídy IgG, IgM, IgE a dále IgA, který tlumí průnik parazitů sliznicemi. Tato protilátková imunitní odpověď je účinná pouze v akutní fázi infekce, hlavní úlohu v obranných reakcích tvoří T buňky, zejména INF- γ , který aktivuje antitoxoplazmové efektorové mechanismy (Jíra, 2009).

Toxoplazmóza způsobuje závažné komplikace v těhotenství, které mohou vést k malformaci plodu nebo k potratu (Miller et al., 2009). Hlavní rizikové faktory pro toxoplazmózu u těhotných žen jsou nehygienické stravovací návyky, kontakt s kočkami, vyšší věk, rasa, cestování a virulence kmene *T. gondii* (Elsheikha, 2008). U latentních infekcí se toxoplazmóza reaktivuje při ztrátě imunokompetence nebo při imunosupresi nejčastěji jako toxoplazmová encefalitida (Halonen et Eiss, 2009). Toto onemocnění představuje nejčastější postižení CNS komplikace při nákaze HIV+ (Jíra, 2009). Onemocnění se projevuje během několika týdnů a je doprovázeno horečkou, bolestí hlavy, nauzeou, poruchami hybnosti končetin a epileptickými záchvaty (Svoboda, 1996). Asi u 20% nemocných jsou postiženy další orgány nejčastěji plíce a srdce (Jíra, 2009). Nákaza způsobuje závažné komplikace i u pacientů po transplantaci solubilních orgánů, které mohou vést až ke smrti. Infekce u těchto pacientů je doprovázena vysokými horečkami, hemolytickou anemií a pancytopenií (Hébraud et al., 2008).

Nákaza se šíří alimentární a fekálně-orální cestou, případně kapénkovou infekcí, spojivkou, oděrkami a rankami v kůži po manipulaci s infekčním materiálem. *Toxoplasma gondii* je geopolitní parazit vyskytující se po celém světě, převážně ve vlhkých a teplých oblastech.

Prevalence u lidských populací závisí na environmentálních podmínkách, sociálních zvyklostech a na zeměpisné lokalitě (Jíra, 2009).

Diagnostika je založena na přímém mikroskopickém průkazu parazita při bioptickém vyšetření excidovaných uzlin, tkáňových fragmentů, z krve či mozkomíšního moku (Ferreira et al., 2008). Na průkaz protilátek se využívá metoda ELISA nebo imunofluorescenční reakce. Metoda PCR slouží k průkazu parazitární DNA v plodové vodě, krvi, v kostní dřeni i v bioptickém vzorku mozku u imunosuprimovaných nemocných aj. (Jíra, 2009).

K léčbě se nejčastěji doporučuje pyrimethamin, sulfadiazin a spiramycin v kombinaci s jinými chemoterapeutiky nebo antibiotiky (Bednář et al., 1994).

1.2.6 Amoebozoa

V lidském zažívacím traktu žije 8 druhů měňavek, z nichž pouze *Entamoeba histolytica* je pro člověka patogenní (Jírovec et al., 1977).

Vývojový cyklus *E. histolytica* probíhá v tenkém střevě hostitele. Spolknutím oocysty dochází v tenkém střevě k uvolnění čtyřjaderných trofozoitů pohybující se pomocí eruptivních panožek (Bednář et al., 1994). Trofozoiti jsou následně zaneseni potravou do slepého střeva, kde dorůstají do velikosti 10-20 μm a nadále se množí v luminu střeva binárním dělením (Jírovec et al., 1977). Během vývoje se v tlustém střevě mění na zralé čtyřjaderné cysty mající kulovitý nebo vejčitý tvar o velikosti 8-20 μm. Zralé oocysty jsou vylučovány ve výkalech (Jíra, 2009).

Entamoeba histolytica se může vyskytovat v nepatogenní formě minuta osidlující střevní lumen. Tato forma nenapadá tkáň, tvoří cysty a za určitých podmínek se může měnit na formu patogenní magna, která napadá tkáň, ale netvoří cysty (Ryšavý et al., 1989).

Entamoeba histolytica a *Entamoeba dispar* jsou geneticky odlišné, ale úzce související druhy parazitů. Oba kolonizují v lidském střevě, ale jen *E. histolytica* je schopna vyvolat onemocnění (Tannicht, 1998).

Příčinou patogenity je napadení střevní tkáň hostitele. *Entamoeba histolytica* proniká do střevního hlenu a sliznice, kde způsobuje strukturální změny ve sliznici, lýzu

buněk a rozvoj zánětlivé reakce (Bansal et al., 2009). *Entamoeba histolytica* vyvolává proteolytickými enzymy nekrózu epitelových buněk tlustého střeva a její trofozoiti se zpravidla nacházejí na periférii nekrotické léze (Jíra, 2009). Trofozoiti pronikají do krevních a lymfatických cév odkud se šíří do jater, kde vznikají jaterní abscesy (Alli et al., 2010).

Nákaza se šíří fekálně-orální cestou cystami, které kontaminují potravu, pitnou vodu, ale i latentně infikovanými nosiči nebo chronicky nemocnými pacienty (Jíra, 2009). Nákaza se vyskytuje převážně v Indickém subkontinentu, v Africe a oblasti Jižní a Střední Ameriky. V rozvojových zemích do značné míry závisí na kulturních návycích, věku, úrovni hygieny a socioekonomického statusu. Ve vyspělých zemích je infekce většinou způsobena *E. dispar* a je z velké části omezena na určité skupiny: přistěhovalce, homosexuály, pacienty infikovaných virem lidské imunodeficiencie AIDS a institucionalizované populace (Alli et al., 2010). Amébozou se ročně nakazí 50 milionů lidí a 100 000 na toto onemocnění umírá (Bansal et al., 2009). Jako příčina letálního parazitárního onemocnění je v globálním měřítku na třetím místě za malárií a schistosomózou.

Cysty a trofozoiti se vyšetřují mikroskopicky pomocí nativního preparátu z čerstvé stolice nebo pomocí některé koncentrační metody (M.I.F.C). Na průkaz protilátek IgG ve stolici se uplatňuje sérologické vyšetření ELISA (Bednář et al., 1994).

Léčba tohoto onemocnění je relativně obtížná. K léčbě se používá nitroimidazol nebo metronidazol (Jíra, 2009).

1.2.7 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis náleží do kmene Sarcomastigophora, řádu Diplomonadida, rodu *Giardia*. Vyskytuje se u lidí a jiných savců, ptáků a plazů (Percival et al., 2004).

Giardia intestinalis je střevní bičíkovec, který není vybaven mitochondriemi, hydrogenosomy a Golgiho aparátem.

Člověk se infikuje po spolknutí cyst, které po průchodu žaludkem excystují v duodenu tenkého střeva (Volf et al., 2007). Vzniklí trofozoiti mají hruškovitý tvar 10-20 x 6-16µm, 2 jádra, 4 páry bičíků a přísavný disk, jež slouží k přichycení k povrchu

enterocytů v horní části tenkého střeva. V dolních částech tenkého střeva se mění ve čtyřjadernou cystu, odkud odchází ve vyloučené stolici (Bednář et al., 1994).

Onemocnění giardiózou se projevuje gastrointestinálními potížemi, většinou asymptomaticky, které vedou k urputným průjmům, ztrátě váhy a k malabsorpci (Hanevik et al., 2009). Ve stolici se objevuje zvýšené množství hlenu a tuku, bez přítomnosti krve (Bednář et al., 1994). Chronický průběh nemoci se může vyskytovat u immunosuprimovaných jedinců, ale také u pacientů s cystickou fibrózou (Despommier et al., 1994) a u dětí s podvýživou v rozvojových zemích (Sprong et al., 2009). Neléčené průjmového onemocnění, může trvat několik týdnů až měsíců, záleží však intenzitě, exacerbaci a remisi (Despommier et al., 1994).

Střevní giardióza je jedna z nejčastějších parazitóz v rozvinutých zemích. V Asii, Africe a Latinské Americe trpí tímto onemocněním asi 200 milionů osob a každoročně je hlášeno 500 000 nových případů. Vysoká incidence giardiózy je zjišťována u jedinců postižených syndromem imunodeficiency. V USA se u HIV+ osob je nákaza giardiózou často doprovázená měňavkou úplavičnou *E. histolytica* způsobující amébiózu. U osob s HIV+/AIDS v oblasti Los Angeles byla giardióza prokázána v 17,7 % (Jíra, 2009).

Nákaza se šíří fekálně-orální cestou, kontaminovanou potravou, kontaminovanou pitnou vodou (Monis et Thompson, 2003) a pohlavním stykem, zejména mezi homosexuály (Meyer et Radulescu, 1979). Infikovaný člověk může vyloučit až 150-20 000 cyst/g ve stolici denně. Inkubační doba trvá 1-3 týdny, kdy první cysty se objevují ve stolici po 3-4 týdnech po nákaze (Jíra, 2009).

Diagnostika je založena na přímém mikroskopickém průkazu cyst parazita ze stolice v nativním nebo barveném preparátu. Ve formované stolici lze prokázat cysty pomocí koncentrační metody (Bednář et al., 1994).

K léčbě se nejčastěji užívají metronidazol a albendazol (Rossignol, 2003).

1.2.8 Mikrosporidie

Kmen *Microspora* náleží do říše Fungi, zahrnuje 1200 druhů rozdělených do 150 rodů. Mikrosporidie jsou obligátní parazité, kteří mohou infikovat všechny živočišné

skupiny (Haro et al., 2005). U člověka byli dosud zjištěni zástupci 4 čeledí řádu Microsporida (Mathis et al., 2005)

Životní cyklus mikrosporidií probíhá ve dvou fázích merogonie a sporogonie (Mathis et al., 2005). Merogonie je vegetativní fáze, která zahrnuje invazivní zárodek trofozoit a multiplikativní zárodek meront (Jírovec et al., 1977). Meront se nachází v cytoplazmě hostitelské buňky, kde se nadále množí binárním dělením jader procesem mitózy. Cyklus pokračuje sporulací za vzniku sporontu, který se množí binárním dělením ve sporoblasty, následně ve spory nebo v mnohojaderná plazmodia. Infekční sporoplazma je injektována do hostitelské buňky pomocí pólové trubice nacházející se ve spoře mikrosporidií (Mathis et al., 2005) a na konci této pólové trubice se nachází kotevní disk. Ve spoře se dále vyskytuje améboidní zárodek sporoplazma s bobtnajícím tělískem polaroplast. Po proniknutí spory do trávicího traktu hostitele se za pomoci posterosomu injektuje zárodek ze spory do hostitelské epitelové buňky. Mikrosporidie nejsou vybaveny mitochondriemi, peroxisomy ani Golgiho aparátem. V cytoplazmě se nacházejí pouze mitosomy (Jíra, 2009).

Enterocytozoon bieneusi a *Encephalitozoon intestinalis* jsou v současné době nejčastěji se vyskytujícími mikrosporidii způsobující lidské infekce (Walker et al., 2009). U infikovaných osob se nacházejí v duodenu, v tenkém a tlustém střevě, v epitelových buňkách žlučových a dýchacích cest (Jíra, 2009). Jedná se o hlavní původce chronických průjmů u těžce imunokompromitovaných pacientů, především v oblasti lidského imunodeficitu HIV+ (Espersen et al., 2007) u pacientů po transplantaci solubilních orgánů nebo po transplantaci kostní dřeně (Walker et al., 2009) spojené s anorexií, nauzeou a malabsorpcí (Rodgers et Kagnoff, 1987).

Encephalitozoon cuniculi neboli encefalitozoon králičí je považován za zoonotického parazita, který vyvolává nákazu u králíků, u nichž způsobuje enzootickou encefalitidu. Může také vyskytovat u hlodavců, lišek, primátů a ptáků. Diferenciace kmenů vysvětluje epidemiologickou situaci u různých hostitelů v různých částech světa.

U imunokompromitovaných jedinců, zejména HIV+/AIDS je výskyt nákazy znám v souvislosti s cerebrální lézí nacházející se v intrakortikální oblasti nebo granulomatózní hepatitida s nálezem v jaterních buňkách, jež může vést k selhání jater.

Je znám případ odvržení renálního transplantátu vlivem mikrosporidiové nákazy vyvolané *E. cuniculi* (Jíra, 2009).

Dalším druhem, který se může vyskytovat u člověka je *E. hellem*. Morfologicky je velmi podobný *E. cuniculi*. Rozlišení mezi nimi spočívá v antigenní a biochemické analýze (Schwartz et al., 1993). Tento parazit se nejčastěji vyskytuje u prasat a ptáků, ale byl i izolován z pacientů s AIDS postižených keratokonjunktivitidou. U člověka se nákaza vyskytuje v povrchových epiteliích rohovky, epitelu dýchacích cest a v tubulárních buňkách ledvin (Jíra, 2009).

Před nástupem pandemie AIDS, bylo hlášeno pouze několik případů mikrosporidiové infekce. Po identifikaci viru lidské imunodeficiency (HIV) jakožto původce AIDS, bylo následně objeveno několik nových rodů a druhů mikrosporidií, které představují významnou skupinu oportunních parazitů (Mathis et al., 2005).

Laboratorní diagnostika je založena na mikroskopickém vyšetření stolice zpracována některou koncentrační metodou např. sedimentační nebo flotační. Dále se aplikují chemoluminiscenční optická bělidla např. Uvitex 2B, Calcoflour. K sérologickým testům byla aplikována metoda ELISA. Pro identifikaci mikrosporidií je užitečná technika PCR. Dostupné jsou primery pro *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem*. a *E. bienusi*. V kombinaci se Southernovým přenosem umožňuje PCR odlišit jednotlivé druhy *Encephalitozoon* spp. (Jíra, 2009).

K léčbě mikrosporidiózy se v současné době používá albendazol nebo benzimidazol. Tyto léčiva však nemají dostatečný účinek proti všem druhům mikrosporidií (Müller et al., 2008).

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem výzkumu bylo vyšetřit materiál (stolice) pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně na přítomnost oportunních parazitů.

U vybraného materiálu izolovat DNA a pomocí PCR vyšetřit na přítomnost mikroskopidií; pozitivní izolát genotypizovat.

2.2 Hypotézy

H₁: Výskyt oportunních parazitů bude u těchto pacientů vyšší vlivem imunosupresivní léčby.

H₂: Výskyt oportunních parazitů bude srovnatelný s imunokompetentní populací, ale klinické projevy budou výraznější.

3. Metodika

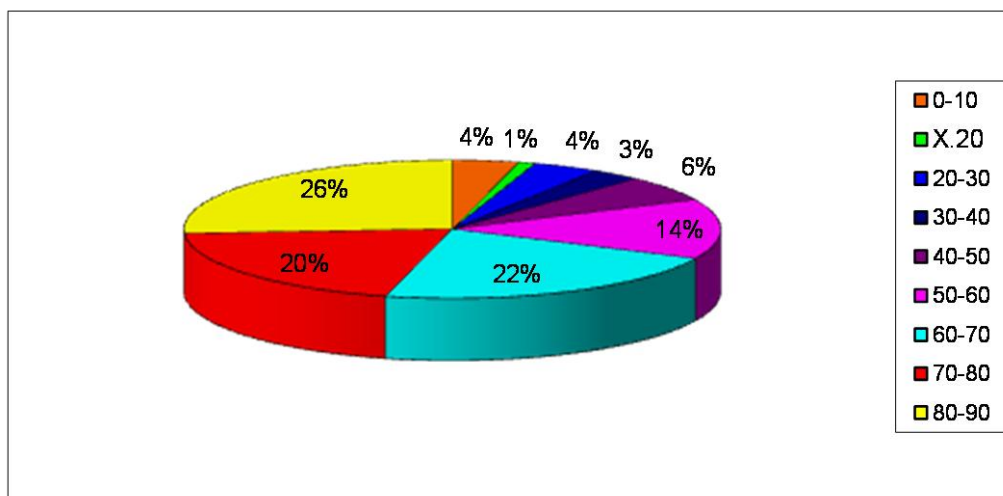
3.1 Materiál

Z hlediska rizika oportunních infekcí šlo o homogenní skupinu pacientů z hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň. Ve všech případech šlo o onkologické pacienty s transplantovanou kostní dření, kteří prošli chemoterapií, a jejich imunitní systém byl dočasně výrazně poškozený. Získané vzorky byly zpracovávány od září 2009 do dubna 2010 v Biologickém centru AV ČR, parazitologický ústav v Českých Budějovicích. Celkem bylo vyšetřeno 100 vzorků stolice. Věk a pohlaví pacientů, od kterých byly vzorky získány, jsou uvedeny v tabulce (tab. 1). Věkové rozmezí pacientů se pohybovalo od 1-90 roku života, z čehož největší procentuální zastoupení bylo ve věkové kategorii 60-70 roku (obr. 2). Zastoupení žen a mužů bylo vyrovnané (obr. 3).

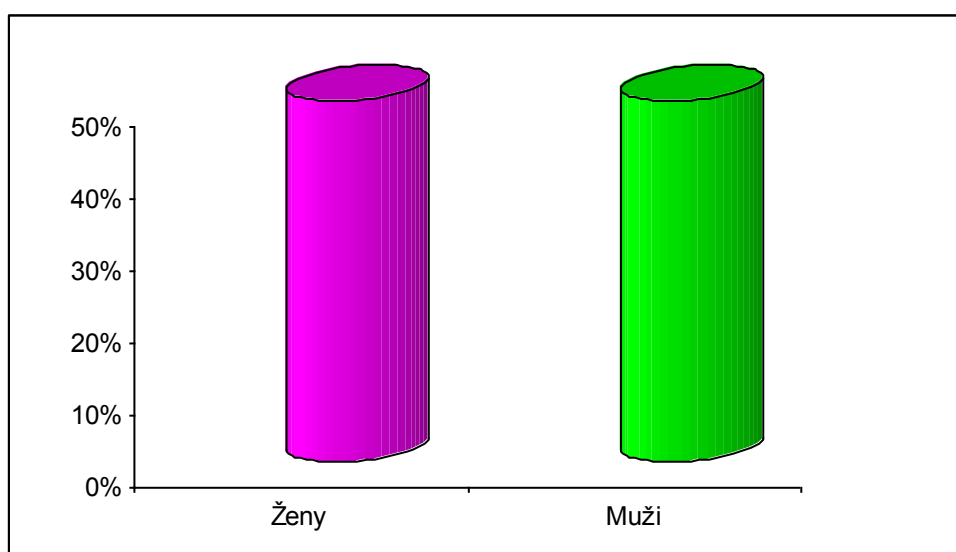
Vzorky byly odebírány do odběrových kelímků a uchovávány v chladicím boxu při 5 °C.

Tab. 1 *Věkové rozmezí pacientů*

Věk	Ženy	Muži	Celkem	Procentuální zastoupení
0-10	0	4	4	4%
10-20	0	1	1	1%
20-30	1	3	4	7%
30-40	0	3	3	3%
40-50	2	4	6	6%
50-60	5	9	14	14%
60-70	13	9	22	22%
70-80	10	10	20	20%
80-90	19	7	26	26%
Celkem	50	50	100	100%



Obr. 1 Procentuální zastoupení pacientů



Obr. 2 Procentuální zastoupení žen a mužů

3.2 Metody

3.2.1 Makroskopické hodnocení stolice:

- 1) Pevnost
 - a) tekutá
 - b) pevná
 - c) formovaná

Makroskopické hodnocení stolice slouží k zjištění přítomnosti článků tasemnic, dospělých rousů apod.

3.2.2 Mikroskopické vyšetření stolice:

3.2.2.1 *Koncentrační sedimentační metoda M.I.F.C*

Roztoky:

1. roztok M.I.F.(H₂O 50 ml; formaldehyd 40 % 5 ml; methiolát sodný 0,1 % 40 ml; glycerin 1 ml)
2. Lugolův roztok (krystalický jód 1g; KI 2g; H₂O 100 ml)

Postup:

Vzorek nativní stolice o velikosti lískového oříšku důkladně rozmíchat v 5 ml roztoku M.I.F.C (methiolát-jód-formaldehyd). Tuto směs přefiltrovat přes gázu a přidat 6 ml vychlazeného etheru. Směs protřepat, nechat ustát a zcentrifugovat při 1500 rpm/2-5 min. Vzniklý prstenec uvolnit a slít supernatant. Sediment prohlížet pod mikroskopem při zvětšení 20-40x. Tato metoda je určena pro průkaz cyst prvoků, je vhodná i pro detekci larev a vajíček helmintů.

3.2.2.2 Barvení oocyst kryptosporidií podle Miláčka a Vítovce

Roztoky:

1. roztok methylvioleti (methylviolet 1,2g ; anilin 2g; fenol 2g; ethanol 60ml; destilovaná voda 140ml)
2. kyselina sírová (1-2 % vodný roztok)
3. tartrazin (1 % tartrazin v 1 % kyselině sírové)

Postup:

1. Rovnoměrně rozetřít vzorek stolice na podložní sklíčko
2. Fixovat methanolem v plameni
3. Barvit roztokem methylvioleti po dobu 30 min
4. Opláchnout ve vodě
5. Diferencovat 2 % kyselinou sírovou
6. Opláchnout ve vodě
7. Dobarvit tartrazinem (1 min)
8. Opláchnout vodou
9. Nechat zaschnout

Zhotovený preparát prohlížet pod mikroskopem olejovou imerzí při zvětšení 100x.

Tato barvicí metoda je vhodná pro průkaz spor kryptosporidií.

3.2.2.3 Barvení spor Calcoflourem

Roztoky:

1. 0,1 % Calcofluor (calcofluor 0,1g; PBS 100 ml; pH 7,2)
2. 0,5 % Evansova modř (Evansovy modře 0,5 g; PBS 100 ml; pH 7,2)

Postup:

1. Rovnoměrně rozetřít vzorek stolice na podložní sklíčko
2. Fixovat methanolem po dobu 3 min
3. Barvit 0,1 % Calcoflourem po dobu 10 min
4. Opláchnout ve vodě
5. Dobarvit 0,5 % roztokem Evansovy modře
6. Opláchnout vodou
7. Nechat zaschnout

Zhotovený preparát prohlížet pod mikroskopem (OLYMPUS IX 70, obr. 3) při vlnové délce 490 nm olejovou imerzí při zvětšení 1000x. Metoda je vhodná pro průkaz mikrosporidií.



Obr. 3 Mikroskop (OLYMPUS IX 70)

3.2.2.4 Izolace DNA

Správná izolace DNA ze spor mikrosporidií je podstatným krokem, protože spory jsou velmi odolné. Pro jejich rozbití byl použit homogenizátor (obr. 4)



Obr. 4 Homogenizátor (Fast Prep 24, M.P. Biomedical, USA)

Materiál: 200-400 mg vzorku stolice

Roztoky:

1. Proteinase K lyofylizát (rozpustit přidáním deionizované vody 1,5 ml)
2. Elution Buffer D

Postup:

1. Odebranou stolicí vložit do Safe-Lock-Tube, přidat skleněné kuličky, napipetovat 1,2 ml Lysis Buffer P a rozbít 2 minuty při maximální rychlosti užitím homogenizátoru
2. Inkubovat 10 min/95 °C v termostatu
3. Centrifugovat 1 minutu/14 000 rpm.
4. Veškerý supernatant přenést do InviAdsorb-Tube a vortexovat 15 sekund
5. Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě
6. Centrifugovat 3 min/14 000 rpm.
7. Supernatant přepipetovat do čistých ependorfech
8. Centrifugovat 3 min/14 000 rpm.
9. Do čistých ependorfech napipetovat 25 µl Proteinase K a přidat 400 µl supernatantu a vortexovat 15 sekund
10. Inkubovat 10 min/70°C
11. Připipetovat 400 µl Binding Buffer P a vortexovat 15 sekund
12. Veškerý objem přepipetovat do Spin Filter + Tube
(žlutá kolona s ependorkou)
13. Inkubovat při laboratorní teplotě 1 minutu
14. Centrifugovat 1 min/14 000rpm.
15. Odpad vylít z ependorfech, napipetovat 500 µl Wash I. a centrifugovat 1 min/14 000 rpm.
16. Odpad vylít z ependorfech, napipetovat 800 µl Wash II. a centrifugovat 1 min/14 000 rpm.
17. Odpad opět vylít a centrifugovat 3 min/14 000 rpm.
18. Na kolonu dát čistou ependorku, napipetovat 200 µl předehřátého Elution Buffer D
19. Inkubovat 3 min při laboratorní teplotě
20. Centrifugovat 1 min/8 000 rpm.
Získanou DNA uchovat při -20°C.

3.2.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Celkový objem reakční směsi pro každou PCR byl 25 μ l. Reakční směs pro každou reakci je znázorněná v tabulce (tab. 2). Součástí každé PCR byla pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrolu jsem použita vyizolovanou DNA z kultury *E. intestinalis* a z pozitivního vzorku *E. bienersi* (Tab. 3 a Tab. 4).

Použité roztoky:

1. Deoxyribonukleosid trifosfát ($dNTP_3$)
2. Taq DNA polymeráza
3. $MgCl_2$
4. deionizovaná voda
5. Primery (*Enterocytozoon bienersi*; *Encephalitozoon* spp.)

Tab. 2 Reakční směs pro PCR (pro 1 reakci)

Roztoky	Objem [μ l]
Deionizovaná voda	13,87
Pufr	2,5
$MgCl_2$	1,5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
$dNTP_3$	0,5
Taq polymeráza	0,63
Templátová DNA	5
Celkem	25

Tab. 3 Primery pro *Enterocytozoon bieneusi*

Primery	Sekvence
<i>Primární PCR</i>	
MSP-1 (15-mer)	TGA ATG (G, T) GT CCC TGT
MSP-2B (16-mer)	GTT CAT TCG CAC TAC T
<i>Sekundární PCR</i>	
MSP-3 (24-mer)	GGA ATT CAC ACC GCC CGT C (A, G) (C, T) TAT
MSP-4B (26-mer)	CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG

Tab. 4 Primery pro *Encephalitozoon* spp.

Primery	Sekvence
<i>Primární PCR</i>	
MSP-1 (15-mer)	TGA ATG (G, T) GT CCC TGT
MSP-2A (15-mer)	TCA CTC GCC GCT ACT
<i>Sekundární PCR</i>	
MSP-3 (24-mer)	GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A, G) (C, T) TAT
MSP-4A (27-mer)	CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C, T) (A, C)A A(A, G) G GGT

Amplifikační program na termocykleru (Little Genius, BIOER, obr. 5) pro primery MSP byl následující:

1. počáteční denaturace 95 °C, 3 min
2. denaturace při 94 °C, 45 s
3. nasedání primerů při 55 °C, 45 s
4. syntéza nového řetězce při 72 °C, 1 min
5. dosyntetizování nového řetězce při 72 °C, 10 min

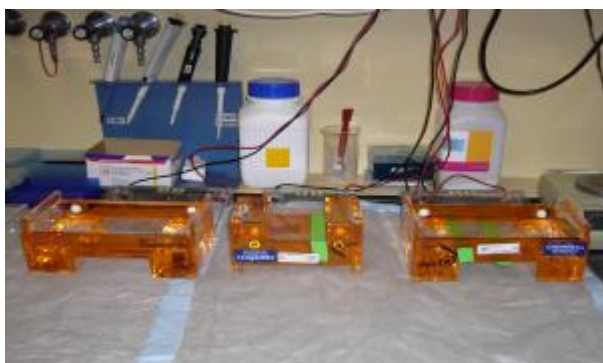
Celkem proběhlo 40 cyklů.



Obr. 5 Termocycler (*Little Genius, BIOER*)

3.2.2.6 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda, při níž dochází k rozdělení DNA fragmentů v agaróze podle molekulových hmotností působením elektrického pole (Obr.6) Pomocí této metody jsem ověřovala délku DNA fragmentů.



Obr. 6 Vana na elektroforézu

Použité roztoky:

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

Postup:

1. 1 % agarózu smíchat s 1x TAE pufrem, rozpustit v mikrovlnné troubě a zchladit pod tekoucí vodou
2. Přidat ethidium bromid tak, aby výsledná koncentrace byla 0,5 µg/ml
3. Připravený gel nalít do formy, vložit hřeben na vytvoření jamek a nechat ztuhnout
4. Do jamek napipetovat 25µl produktu PCR a při napětí 70 V nechat separovat potřebnou dobu pro vytvoření fragmentů DNA
5. Rozdělené fragmenty vizualizovat pod UV transiluminátorem při vlnové délce 302 nm

Fragmenty DNA byly zaslány na sekvenaci a do Laboratoře genomiky BC AVČR. Fylogenetická analýza byla provedena v Biologickém centru AV ČR v Českých Budějovicích, kde byl následně určen genotyp mikrosporidií

3.2.2.7 Statistické zpracování

Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Fisherova exaktního testu.

Výpočet pravděpodobnosti asociační tabulky popisuje následující vztah:

$$P = \binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c} / \binom{n}{a+c}$$

$p < 0,05$; pravděpodobnost daného jevu je pro danou kontingenční tabulku velmi nízká.

4. Výsledky

4.1 *Makroskopické vyhodnocení výsledků*

Makroskopicky bylo vyšetřeno všech 100 vzorků stolice, z čehož nejčastěji se vyskytovala stolice tekutá (60 %) méně formovaná (29 %) a v poslední řadě stolice pevná (11 %).

4.2. *Mikroskopické vyhodnocení výsledků*

Mikroskopicky bylo vyšetřeno 100 vzorků stolice pomocí diagnostických metod M.I.F.C., barvení Miláčka-Vítovce a barvení Calcofluoru. Vyhodnocení vzorků stolice je znázorňuje v tabulce (Tab. 5).

Tab. 5 *Mikroskopické vyhodnocení vzorků stolice*

Vzhled				
stolice	M.I.F.C	Miláček-Vítovec	Calcofluor	PCR
Tekutá	0	0	4	4
Formovaná	0	0	0	0
Pevná	0	0	0	0
Celkem	0	0	4	4

Výsledky vyšetření stolice koncentrační sedimentační metodou (M.I.F.C.)

Mikroskopické hodnocení vzorků stolice metodou M.I.F.C. neprokázala přítomnost žádného z parazitů.

Výsledky vyšetření stolice barvením dle Miláčka a Vítovce

Mikroskopické hodnocení vzorků stolice barvením dle Miláčka a Vítovce neprokázala přítomnost spor kryptosporidií.

Výsledky vyšetření stolice barvením Calcofluorem

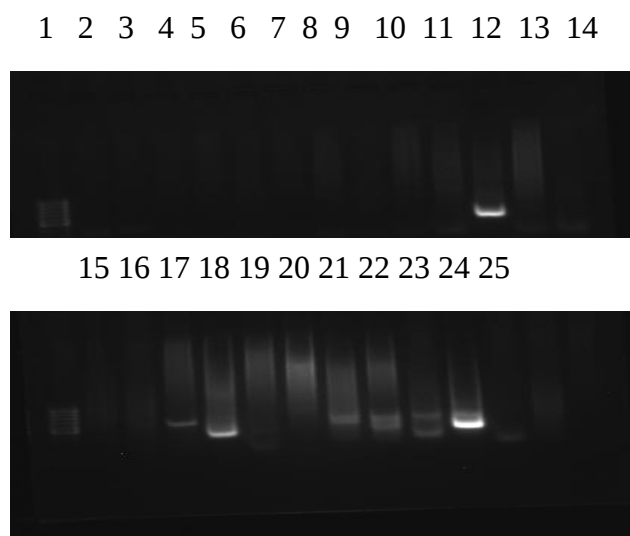
Při mikroskopické hodnocení stolice barvením Calcofluorem byla u 4 ze 100 vzorků stolice zjištěna přítomnost mikrosporidií. Pro potvrzení přítomnosti těchto parazitů byla provedena diagnostika pomocí PCR. Pozitivní nález mikrosporidií barvených Calcofluorem je znázorněn na obr. 7.



Obr. 7 *Fluorescence mikrosporidií barvených Calcofluorem*

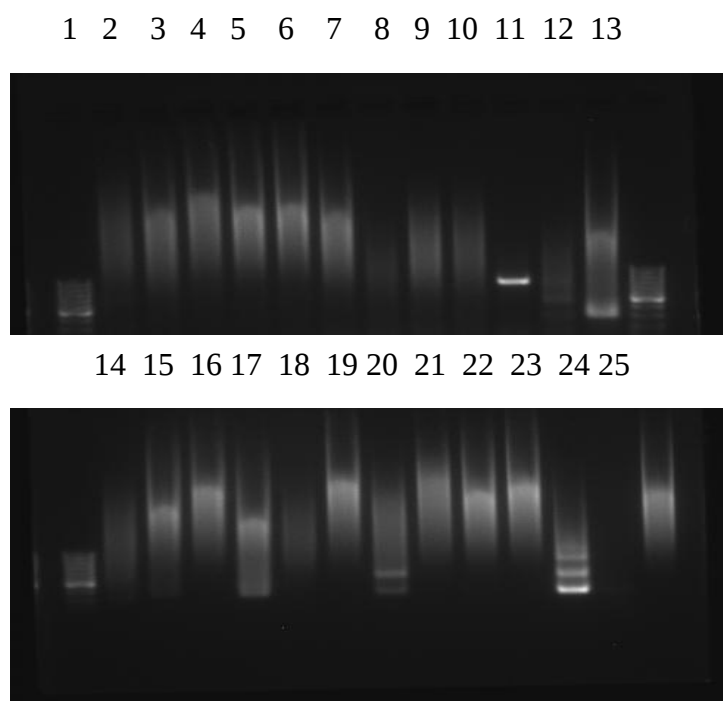
4.3 Vyhodnocení výsledků mikrosporidií metodou PCR

Pomocí PCR bylo vyšetřeno 54 vzorků stolice. Celkem byly získány 4 produkty PCR *Encephalitozoon* spp. Mikroskopicky vyhodnocené vzorky barvením Calcofluorem prokázaly shodu jen u 2 vzorků stolice. K falešně pozitivním výsledkům mohlo dojít patrně záměnou mikrosporidií za kvasinky, které ve světelném mikroskopu jsou mezi sebou těžko rozeznatelné. U 50 vzorků stolice nebyla prokázána přítomnost mikrosporidií. Elektroforéza produktů PCR je znázorněna na obrázcích 8, 9 a 10.



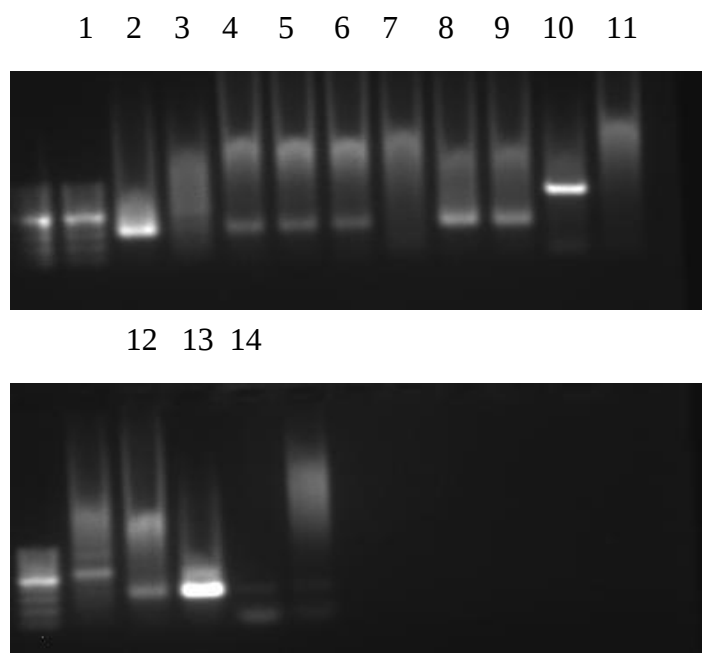
Obr. 8 *Elektroforéza produktů PCR*

(1: 100BP DNA ladder, 12: vzorek č. 11, 18: vzorek č. 17, 24: pozitivní kontrola *Encephalitozoon intestinalis*, 25: negativní kontrola)



Obr. 9 *Elektroforéza produktů PCR*

(1: 100BP DNA ladder, 11: vzorek č. 35, 24: pozitivní kontrola *Encephalitozoon intestinalis*, 25: negativní kontrola)



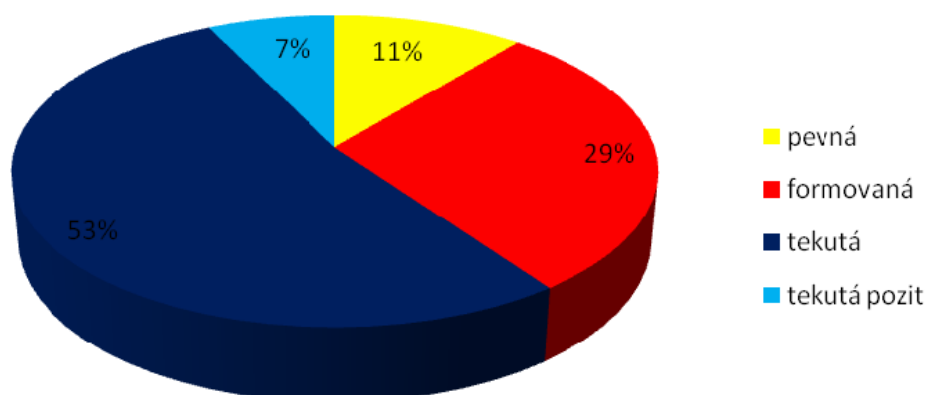
Obr. 10 *Elektroforéza produktů PCR*

(1: 100BP DNA ladder, 2: vzorek č. 46, 13: pozitivní kontrola *Encephalitozoon intestinalis*, 14: negativní kontrola)

4.3.1. Vyhodnocení sekvencí

Analyzované fragmenty DNA pozitivních produktů byly po sekvenování vyhodnoceny ve spolupráci s pracovníky BC AVČR jako druh *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I., což je druh mikrosporidií přenosný ze zvířete na člověka.

Encephalitozoon cuniculi genotyp I. byl prokázán u 3 žen a 1 muže v různých věkových kategoriích. Pozitivní nálezy mikrosporidií byly detekovány v tekuté stolici. Procentuální zastoupení mikrosporidií je znázorněno v grafu (Obr. 11).



Obr. 11 Výskyt mikrosporidií dle pevnosti stolice

4.4 Statistické hodnocení

Hodnocení nálezu mikrosporidií podle věkové kategorie a pohlaví. Hodnocení nálezu mikrosporidií je znázorněné v tabulce (Tab. 6)

Tab. 6 Hodnocení pozitivních produktů podle věku a pohlaví

Vě	Ženy	Muži	Pozitivní nález mikrosporidií
0-10	0	1	0
10-20	0	1	0
20-30	0	2	0
30-40	1	1	0
40-50	1	2	Žena
50-60	1	7	0
60-70	8	4	Žena/Muž
70-80	4	3	0
80-90	13	5	Žena
Celkem	28	26	4

Celková prevalence u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně byla 7,4 %. Mikrosporidie se vyskytovaly v různých věkových skupinách nezávisle na pohlaví. Tyto rozdíly však nebyly statisticky významné ($p < 0,05$).

Hodnocení klinických projevů u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně. Hodnocení klinických projevů je znázorněno v tabulce (Tab. 7)

Tab. 7 *Hodnocení klinických projevů*

Hodnocení	Tekutá	Formovaná/Pevná	Celkem
pozitivní	4	0	4
negativní	56	40	96
Celkem	60	40	100

Mikrosporidie se vyskytovaly pouze v tekuté stolici. Klinické projevy u této skupiny pacientů byly vyšší patrně poškozením střevní mikroflóry. Klinické projevy však nebyly statisticky významné ($p < 0,05$)

5. Diskuze

Cílem mé bakalářské práce bylo zjistit frekvenci výskytu oportunních parazitů u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně. Jedinců s imunodeficiencí, ať už primární či získanou, stále přibývá. Tito jedinci jsou náchylnější k různým infekcím, a to zejména k infekcím vyvolaným oportunními parazity (Kesson et Kakakios, 2007). Oportunní infekce jsou příčinou nemoci a úmrtnosti u lidí s oslabenou imunitou po celém světě, v rozvojových i vyspělých zemích (Pozio et al., 2005).

Mikroskopické vyšetření koncentračně sedimentační metodou M.I.F.C. nebyla prokázána přítomnost larev a vajíček parazitů a ani barvením Miláček-Vítovec nebyla prokázána přítomnost oocyst kryptosporidií. Nepřítomnost těchto parazitů není překvapivá, jelikož pacienti po alogenní transplantaci kostní dřeně podléhají přísným hygienickým podmínkám a jak víme, k přenosu těchto parazitů dochází převážně kontaminovanou potravou nebo kontaminovanou pitnou vodou. Avšak výskyt kryptosporidiózy ve světě roste. Např. v Austrálii prevalence přesáhla od roku 2004 8,8 % (Hu et al., 2009). Tato skutečnost však může být vysvětlována i zlepšující se diagnostikou.

Mikroskopické vyšetření Calcofluorem ukázalo pozitivní nález u 4 % pacientů po alogenní transplantaci. Pro přesnější určení byla použita metoda PCR, pomocí níž bylo vyšetřeno 54 pacientů. Barvení Calcofluorem se ukázalo jako málo citlivá a málo specifická metoda, protože nálezy byly potvrzeny metodou PCR pouze u dvou pacientů. Tyto rozdíly byly způsobeny pravděpodobně záměnou mikrosporidií za kvasinky, které jsou ve světelném mikroskopu mezi sebou téměř nerozeznatelné. Pomocí PCR jsme detekovaly 4 pozitivní vzorky stolice, ve které byly přítomné mikrosporidie. Tuto metodu lze považovat za spolehlivější a přesnější pro detekci a identifikaci jednotlivých druhů mikrosporidií (Ombrouck et al., 1997). Ukazuje se, že screeningové vyšetření pomocí calcofluoru bude vhodné z vyšetřovacích postupů vyřadit, protože molekulární diagnostika se stále zlevňuje.

Celková prevalence zjištěná pomocí metody PCR byla 7,4 %. Tento výsledek je srovnatelný s výskytem mikrosporidií u starých lidí: 11 % (Černá, 2010). Tyto prevalence nedosahují hodnot zjištěných u průměrné populace - 30 % a už vůbec ne v populaci uživatelů drog -100 % (Bucharová, 2008). Také prevalence získaná vyšetřováním velkého souboru stolic zaslaných k parazitologickému vyšetření byla vysoká – 44,8% (Pelikánová, 2009), v tomto případě však šlo o soubor pacientů trpících střevními potížemi a získané hodnoty lze těžko srovnávat se soubory depistážními. Ukazuje se, že výskyt mikrosporidií se v jednotlivých skupinách liší a že prevalence zřejmě nezávisí na imunitním stavu, ale mnohem pravděpodobněji na způsobu života a dodržování hygienických podmínek. V našem souboru pacientů s transplantovanou kostní dření bylo dodržování hygienických podmínek velmi přísné a pacienti byli pokud možno izolováni od možných zdrojů infekce. Prevalence mikrosporidií u nich byla nejnižší ze všech vyšetřovaných skupin osob. Hypotéza H_1 musí být tedy zamítnuta.

Dosud neexistují údaje o možných geografických rozdílech ve výskytu mikrosporidií v lidské populaci; výsledky lze srovnávat pouze s ojedinělými studiemi prováděnými podobnými metodami.

Např. v Etiopii celková prevalence činila 7,6 % a autoři usuzují, že sociální a ekonomické podmínky mohou ovlivňovat celkový výskyt spór mikrosporidií v lidské populaci (Endeshaw et al., 2006). Podobných výsledků bylo dosaženo např. ve Venezuele, kde celková prevalence byla 8,6 % (Chacin-Bonilla et al., 2006).

Pozitivní produkty PCR byly následně zaslány na sekvenaci, díky které jsme mohli určit přesný druh mikrosporidií a jejich genotyp. Nejčastějšími druhy mikrosporidií, které se vyskytují u imunosuprimovaných jedinců např. u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně a způsobují u nich infekce, jsou *E. intestinalis*, *E. hellem*, *E. cuniculi* a *E. bienuesi* (Walker et al., 2006).

V našem souboru byl nalezen jediný z nich: *E. cuniculi*, a to genotyp, u kterého můžeme předpokládat zoonotický původ.

Druh *E. cuniculi* se vyskytuje především u zvířat např. králíků, potkanů, lišek, krys a může být příčinou mikrosporidiózy i u lidí, především u imunosuprimovaných pacientů, kteří jsou náchylnější k infekci vlivem jejich snížené buněčné imunitní odpovědi. Např. v Mexiku bylo hlášeno 10 pacientů infikovaných *E. cuniculi*, z čehož devět pacientů bylo po transplantaci orgánu a jeden pacient po transplantaci kostní dřeně (Gamboa-Dominguez et al., 2003). Dále např. v USA byly hlášeny dva případy plicní infekce u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně. V tomto případě šlo o druh *E. cuniculi*, který pocházel z „psího kmene“ (Orenstein et al., 2005). V Tunisku bylo vyšetřeno 86 imunokompromitovaných pacientů, z nichž 35 trpělo hemolytickou malignitou. Prevalence u těchto pacientů byla 8,6 % (Teachey et al., 2009).

Nejvíce pozitivních vzorků bylo nalezeno ve věkové kategorii 60-70 let. Rozbor výsledků podle věkových kategorií neodhalil závislost výskytu mikrosporidií na věku ($p < 0,05$). Všechny 4 pozitivní nálezy mikrosporidií získané pomocí PCR byly detekovány v tekuté stolici, což by mohlo korespondovat se skutečností, že infekce vyvolané těmito parazity způsobují gastrointestinální potíže doprovázené vodnatými průjmy u imunosuprimovaných pacientů. Hypotéza H_2 tedy nebyla vyvrácena, ale její platnost je však třeba ověřit na větším souboru a též srovnat s podobnými studiemi. Např. v Malajsii byla zjištěna přítomnost mikrosporidií u imunosuprimovaných pacientů, u nichž byla infekce doprovázena gastrointestinálními potížemi spolu s vodnatými průjmy v 74 % případů (Norhayati et al., 2008). Střevní mikrosporidiózy patří k nejčastější příčině průjmů u imunokompromitovaných jedinců. Většina z nich je však popsána u pacientů HIV/AIDS a jen několik případů je popsána v souvislosti s imunosupresivní terapií (Teachey et al., 2004).

Naše výsledky potvrzují, že mikrosporidie se vyskytují u imunosuprimovaných jedinců nezávisle na věku a pohlaví. I když je u těchto pacientů výskyt mikrosporidií nižší než v jiných skupinách, jsou vlivem snížené imunity více ohroženi a hrozí jim, že

asymptomatická infekce se změní v symptomatickou – život ohrožující. Proto je velmi důležitá prevence a včasný záchyt parazitů u těchto pacientů. Pokud se k pozitivnímu nálezu spor *Encephalitozoon* spp. přidají i klinické příznaky, bylo by nejvhodnější zahájit léčbu albendazolem, který působí jako účinné antiparazitikum na všechny lidské mikrosporidie kromě *Enterocytozoon bieneusi*. Proto je důležité nejen mikrosporidie včas diagnostikovat, ale determinovat i druh. Včasné zahájení léčby ještě před diseminací do všech orgánů může být život zachraňující.

6. Závěry:

- I. Vyšetření stolice metodou PCR byla zjištěna celková prevalence 7,4 %. Mikrosporidie byly detekovány v tekuté stolici.
- II. Mikrosporidie u vyšetřených pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně byly identifikovány jako druh *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I.
- III. Získané výsledky jsou poněkud překvapivé, ukázalo se, že výskyt oportunních parazitů u pacientů po transplantaci kostní dřeně, je menší než se očekávalo v porovnání s jinými, zejména imunokompetentními jedinci. Nízká prevalence u těchto pacientů je zřejmě způsobena přísnými hygienickými předpisy, které musí být u pacientů po transplantaci kostní dřeně přísně dodržovány.
- IV. Výskyt těchto oportunních parazitů nelze podceňovat. U pacientů po transplantaci kostní dřeně, kteří jsou být infikováni mikrosporidiemi hrozí symptomatická nebo dokonce generalizovaná infekce. Proto je u nich velmi důležitý včasný záchyt parazitů a zvážení cílené terapie

7. Literarura:

1. Abdo A., Klassen J., Urbanski S., Raber E., Swain M.G., (2003): Reversible sclerosing cholangitis secondary to cryptosporidiosis in a renal transplant patient. *J Hepatol* 38: 688-691
2. Algar V., Novelli V., (2007): Infections in the immunocompromised host. *Paediatrics Child Health* 17:132-136
3. Ali I.K.M., C. Graham Clark C.G., Petri W.A., (2009): Molecular Epidemiology of Amebiasis. *Infect Genet Evol* 8: 698–707
4. Alakpa G., Fagbenro-Beyioku A.F., Clarke S.C., (2002): *Cyclospora cayetanensis* in stools submitted to hospitals in Lagos, Nigeria. *Int J Infect Dis* 6: 314-317
5. Atambay M., Bayraktar M.R., Kayabas U., Yilmaz S., Bayindir Y., (2007): A rare diarrheic parasite in a liver transplants patients: *Isospora belli*. *Trans Proc* 39: 1693-1695
6. Bansal D., Ave P., Kerneis S., Frileux P., Boché O., Baglin C.A., Dubost G., Leguern A.J., Prevost M.C., Bracha R., Mirelman D., Guillén N., Labruyère E., (2009): An ex-vivo Human Intestinal Model to Study *Entamoeba histolytica* Pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e551
7. Bartůňková J., Šedivá A., Janda A., Imunodeficiency. 2. přepracované a doplněné vydání, Praha: Grada, 2007. 254 p.
8. Bednář M., Souček A., Vávra J., Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie, Praha: Triton s.r.o., 1994. 226 p.

9. Bucharová E., (2009): Střevní paraziti u uživatelů drog. *Bakalářská práce*. Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
10. Carey C. M., Trevors J.T., Lee H., (2004): Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Wat Res* 38: 818-862
11. Chacin – Bonilla L., Panunzio A.P., Monsalce-Castillo F.M., Parra-Cepada I.E., Martinez R., (2006): Microsporidiosis and its contribution to diarrhea in a group of human immunodeficiency virus-infected patients from Zulia state. *Am J Trop Med Hyg* 74: 482-486
12. Despommier D.D., Gwadz W.R., Hotez P.J., Parasitic diseases. Third Edition., 1994. 333 p.
13. Didier E. S., Snowden K. F., Shadduck J. A., (1998): Biology of Microsporidian Species Infecting Mammals. *Adv Parasitol* 40: 283-320
14. Dillingham R., Pape J.W., Herwaldt B.L., Guerrant T R.L., (2006): *Cyclospora*, *Isospora*, and *Sarcocystic* Infection.. *Trop Infect Dis* 89: 1015-1023
15. Ditrich O., (2005): *Kryptosporidie a mikrosporidie jako původci infekcí*. *Habilitační práce*. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
16. Ebrahimzadeh A., Bottone J.E., (1996): Persistent diarrhea caused by *Isospora belli*: Therapeutic response to pyrimethamine and sulfadiazine. *Microbiol Infect Dis* 26: 87-89
17. Elsheikha H.M., (2008): Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. *Public Health* 122: 335-353

18. Endeshaw T., Kebede A., Verwei J., Zewide A., Tsige K., Abraham Y., Wolday D., Woldemichael T., Messele T., Polderman A.M., Petros B., (2006): Intestinal microsporidiosis in diarrheal patients infected with human immunodeficiency virus-1 in Addis Ababa. *Ethiopia Jpn J Infect Dis* 59: 306-310
19. Espern A., Morio F., Miegerville M., Illa H., Abdoulaye M., Meyssonier V., Adehossi E., Lejeune A., Cam D.P, Besse B., Gay-Andrieu F., (2007): Molecular Study of Microsporidiosis Due to *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* among Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients from Two Geographical Areas. *J Clin Microbiol* 45: 2999–3002
20. Farthing M.J.G., (1993): Pathogenesis of giardiasis. *Trans Royal Soc of Trop Med Hyg* 87: 17-21
21. Ferreira I.M.R., Vidal J.E., Costa-Silva R.A., Meira C.S., Hiramoto R.M., Oliveira A.C.P., Pereira-Chiocolab V.L., (2008): *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol* 118: 221-227
22. Fishman J.A., Ramos E., (2005): Infection in renal transplant recipients. *Chron Kidney Dis, Dialysis Trans* 37: 681-697
23. Franzen C., Miller A., (2001): Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microb Inf* 3: 389-400
24. Gilbert R., Tan H.K., Cliffe S., Guy E., Stanford M., (2006): Symptomatic toxoplasma infection due to congenital and postnatally acquired infection. *Arch Dis Child* 91: 495–498

25. Pelikánová M., (2009): Mikrosporidiové infekce lidí. *Bakalářská práce*. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
26. Percival S., Chalmers R., Embrey M., Paul Hunter, Sellwood J., Wyn-Jones P., (2004): *Cryptosporidium* spp. *Microbiol Water Dis* 18: 237-265
27. Gamboa-Dominguez A., De Anda J., Donis J., Ruiz-Maza F., Visvesvara G.S., Diliz H., (2003): Disseminated *Encephalitizoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Clin Transplant* 75: 898-1900
28. Goldberg E.J., (2007): Parasitic Colitides. *Clin Colon Rectal Surg* 20: 38–46
29. Graaf de C.D., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora M.L., Abbassi H., Peeters E.J., (1999): A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol* 29: 1269-1287
30. Halonen S.K., M. Weiss L.M., (2009): *Toxoplasma gondii* Presentations at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists. *Eukaryot Cell* 8: 437–440
31. Hanevik K., Dizdar V., Langeland N., Hausken T., (2009): Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterol* 9: 27
32. Haro M., Izquierdo F., Henriques-Gil N., Andrés I., Alonso F., Fenoy S., Águila D.C., (2005): First Detection and Genotyping of Human-Associated Microsporidia in Pigeons from Urban Parks. *Appl Environ Microbiol* 71: 3153–3157

33. Hébraud B., Kamar N., Borde J.S., Bessières M.H., Galinier M., Rostaing L., (2008): Unusual presentation of primary toxoplasmosis infection in a kidney-transplant patient complicated by an acute left-ventricular failure. *NDT Plus* 1: 429–432
34. Hicks C.B., Gay C., Ferrari G., (2007): Acute HIV infection: the impact of anti-retroviral treatment on cellular immune responses. *Clin Exp Immunol* 149: 211–216
35. Hoar B.R., Paul R.R., Siembieda J., Pereira M.G.C., Atwill E.R., (2009): *Giardia duodenalis* in feedlot cattle from the central and western United States. *BMC Vet Res* 5: 37
36. Hořejší V., Bartůňková J., Základy imunologie. 3. vydání, Praha: Triton s.r.o., 2005. 300 p.
37. Hu W., Mengersen K., Tong S., (2009): Spatial Analysis of Notified Cryptosporidiosis Infections in Brisbane, Australia. *Annals Epidemiol* 19: 900-907
38. Hunter P.R., Thompson R.C.A., (2005): The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International J Parasitol* 35: 1181-1190
39. Chalmers R.M., Davies A.P., (2010): Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol* 124: 138-146
40. Chacín-Bonilla L., (2010): Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic areas. *Acta Tropica* [Epub ahead of print]
41. Kuhls T.L., (2000): Cryptosporidiosis during childhood. *Sem Ped Inf Dis* 11: 213-219

42. Jíra J., Lékařská protozoologie Protozoální nemoci, Praha: Galén, 2009. 567 p.
43. Jírovec O. et. al., Parasitologie pro lékaře. 3. přepracované a rozšířené vydání, Praha: Avicenum, 1977. 798 p.
44. Karp C.L., Colebunders R., (2006): Approach to the Patient with HIV and Coinfecting Tropical Infectious Diseases. *Trop Inf Dis* 4: 1642-1684
45. Kesson A.M., Kakakios A., (2007): Immunocompromised children: conditions and infectious agents. *Paediatric Resp Rev* 8: 231-239
46. Kobayashi M.L., Kort P.M., Berlin W.G.O., Bruckner A.D., (1985): *Isospora* infection in a homosexual man. *Diagnostic Microbiol Inf Dis* 3: 363-366
47. Krejsek J., Kopecký O., Klinická imunologie. 1. vydání, Pardubice: nukleus HK, 2004. 968 p.
48. Lauwaet T., Davids B.J., Reiner D.S., Gillin F.D., (2009): Encystation of *Giardia lamblia*: A model for other parasites. *Curr Opin Microbiol* 10: 554-559
49. López-Soto F., León-Sicairos N., Reyes-López M., Serrano-Luna J., Ordaz-Pichardo C., Piña-Vázquez C., Ortiz-Estrada G., Garza de la M., (2009): Use and endocytosis of iron-containing proteins by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infection. Gen Ev* 9: 1038-1050
50. Mansfield S.L., Alvin A. Gajadhar A.A., (2004): *Cyclospora cayetanensis*, a food and waterborne coccidian parasite. *Vet Parasitol* 126: 73-90

51. Mathis A., Weber R., Deplazes P., (2005): Zoonotic Potential of the Microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 18: 423–445
52. Miller C.M., Boulter N.R., Ikin R.J., Smith N.C., (2009): The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 39: 23-39
53. Meyer E.A., Radulescu S., (1979): *Giardia* and Giardiasis. *Adv Parasitol* 17: 1-47
54. Monis P.T., Thompson R.C.A., (2003): *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction?. *Inf Gen Ev* 3: 233-244
55. Mortimer L., Chadee K., (2010): The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* [Epub ahead of print]
56. Myint S., Cann A., Molecular and Cell biology of opportunistic infections in AIDS, London: Chapman et Hall, 1984. 283 p.
57. Norhayati M., Azlin M., Hesham Al-Mekhlafi M., Anisah N., Nor Aini U., Fatmah M.S., Rozlida A.R., (2008): A preliminary study on the prevalence of intestinal microsporidiosis in patients with and without gastrointestinal symptoms in Malaysia. *Transact Royal Soc Trop Med Hyg* 102: 1274-1278
58. Ombrouck C., Ciceron L., Biligui S., Brown S., Marechal P., Gool T., Datry A., Danis M., Desportes-Livage I., (1997): Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 35: 652-655

59. Ortega Y.R., Sterling CH.R., Gilman H.R., (1998): *Cyclospora cayetanensis*. *Adv Parasitol* 40: 399-418
60. Percival S., Chalmers R., Embrey M., Hunter P., Sellwood J., Wyn-Jones P., (2004): *Cyclospora cayetanensis*. *Microbiol Water Dis* 19: 267-284
61. Percival S., Chalmers R., Embrey M., Hunter P., Sellwood J., Wyn-Jones P., (2004): *Giardia duodenalis*. *Microbiol Water Dis* 21: 299-318
62. Pickering K.L., (1991): Therapy for acute infectious diarrhea in children. *J Pediatrics* 118: S118-S128
63. Pozio E., Maria Angeles Gomez Morales M.A.G., (2005): The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitol* 21: 58-63
64. Resende V.D., Lages-Silva E., Assis C.D., Prata A., Oliveira-Silva M.B., (2009): Experimental infection of murine and human macrophages with *Cystoisospora belli*. *Acta Tropica* 111: 177-180
65. Rodgers D.V., Kagnoff F.M., (1987): Gastrointestinal Manifestations of the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *West J Med* 146: 57-67
66. Ryšavý B., Černá Ž., Chalupský J., Országh I., Vojtek J., Základy parazitologie. 1.vydání, 1989: Státní pedagogické nakladatelství. 215 p.
67. Rossignol J.F., (2003): *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment options and prospects for new drug. *Exp Parasitol* 124: 45-53
68. Shields M.J., Olson H.B., (2003): *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitoc coccidian. *Int J Parasitol* 33: 371-391

69. Rotterdam H., Tang T., (1994): Gastrointestinal disease in the immunocompromised patient. *Human Patol* 25: 1123-1140

70. Salát J., Jelínek J., Chmelař J., Kopecký J., (2008): Efficacy of Gamma Interferon and Specific Antibody for Treatment of Microsporidiosis Caused by *Encephalitozoon cuniculi* in SCID Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2169–2174

71. Serra S., Jani A.P., (2006): An approach to duodenal biopsies. *J Clin Pathol* 59: 1133–1150

72. Spano F., Crisanti A., (2000): *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *Int J Parasitol* 30: 553-565

73. Sprong H., Cacciò S.M., Giessen J.W.B., partners., (2009): Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e558

74. Svoboda J., *Imunologie v klinické praxi*. 1. výtisk, Praha: Marvil, 1996. 427 p.

75. Tannicht E., (1998): *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 92: 593-596

76. Teachey D.T., Russo P., Orenstein J.M., Didier E.S., Bowers C., Bunin N., (2004): Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 33: 299-302

77. Velásquez N.J., Carnevale S., Mariano M., Kuo H.L., Caballero A., Chertcoff A., Ibáñez C., Bozzini P.J., (2001): Isosporosis and unizuite tissue cysts in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Human Pathol* 32: 500-505

78. Volf P., Horák P., et al., Paraziti a jejich biologie, Praha: Triton s.r.o., 2007. 318 p.

79. Walker M., Kublin G.J., Zunt R.J, (2009): Parasitic Central Nervous System Infections in Immunocompromised Hosts: Malaria, Microsporidiosis, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis. *Clin Infect Dis* 42: 115–125

80. Walther Z., Topazian D.M., (2009): *Isospora* cholangiopathy: case study histologic characterization and molecular confirmation. *Human Pathol* 40: 1342-1346

81. William A., Petri Jr.W.A., (2003): Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol* 19: 523-526

82. Werneck-Silva A.L., Prado I.B., (2009): Role of upper endoscopy in diagnosing opportunistic infections in human immunodeficiency virus-infected patients. *World J Gastroenterol* 15: 1050–1056

83. Wynn W.S., Elhassan T. B., Gonzalez H.M., (2004): Infections of the hand in the immunocompromised host. *J Amer Soc for Surgery of Hand* 4:121-127

8. Klíčová slova

Imunitní systém

Oportunní parazité

Mikrosporidie

Transplantace kostní dřeně