

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Výskyt mikrosporidií u hematologických a onkologických pacientů

Bakalářská práce

Autor práce: Veronika Dorazilová

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich CSc.

Datum odevzdání: 3. 5. 2013

Abstrakt

Mikrosporidie jsou intracelulární parazité patřící do říše hub. Existuje asi 1200 druhů mikrosporidií rozdělených do 150 rodů, pro člověka je nejvýznamnějších 14 druhů. Nejčastěji způsobuje infekce u člověka druh *Enterocytozoon bieneusi*, dále *Encephalitozoon intestinalis*. Mikrosporidie napadají kromě člověka téměř všechny živočišné druhy, od ptáků až po hmyz.

Infekčním stádiem mikrosporidie je spora, což je oválný útvar umožňující infikování hostitele. Spora obsahuje tzv. pólové vlákno, které je vnějšími podmínkami vymršťováno do cytoplazmy hostitele a uvolňuje se obsah zvaný sporoplasma. Poté následuje vývoj mikrosporidie v hostiteli, který probíhá dvěma fázemi vývoje – merogonií, při níž dochází k dělení plasmodia na meronty až do zaplnění buňky, a sporogonií, kdy se jednotlivé buňky osamostatňují a prochází jednotlivými stádii vývoje až do vzniku spory.

Mikrosporidiózou se člověk může nakazit fekálně orálním přenosem, a to požitím kontaminované vody či špatně tepelně upraveného masa. Tento druh přenosu se nazývá horizontální. Druhým typem přenosu, který nebyl u lidí popsán, je vertikální (transplacentární přenos). Dále může být významný také zoonotický přenos. Člověk se může nakazit mikrosporidiózou od nejrůznějších druhů živočichů, kteří byli infikováni jednotlivými druhy mikrosporidií.

Ohroženou skupinou jsou především pacienti se získanou primární imunodeficiencí, dále mohou být nakaženy děti, starší osoby, pacienti po transplantaci či cestovatelé. Mikrosporidie způsobují oportunní infekce, pro něž je charakteristické, že doprovázejí jiná primární onemocnění, například AIDS, virové či bakteriální onemocnění a mnoho dalších. Mezi nejčastější klinické projevy patří průjem, dalšími příznaky mohou být i oční, plicní či svalové potíže. Mikrosporidie mohou také napadat ledviny či slezinu a vyvolat poté zánětlivou reakci.

Cílem mé práce bylo zjistit přítomnost či nepřítomnost čtyř druhů mikrosporidií, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuniculi* a *Enterocytozoon bieneusi*, ve vzorcích stolice hematologických a onkologických pacientů a výsledky porovnat s již získanými výsledky.

Celkem jsem nasbírala 45 vzorků stolice v období leden 2012 – leden 2013. Vzorky byly odebírány do nesterilních uzavíratelných nádobek a zpracovány v laboratořích parazitologii v AV ČR v Českých Budějovicích.

Následně jsem všechny vzorky zpracovala metodou barvení Calcofluor white a preparáty pozorovala pod mikroskopem Olympus IX 70. Hledala jsem oválné jasné modrobílé zářící spory mikrosporidií. Bylo nutné je odlišit od kvasinek.

Další metodou zpracování byla molekulární diagnostika. Všech 45 vzorků jsem vyizolovala pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA kit (INVITEK). Principem izolace bylo rozbití spor a získání čisté DNA vhodné k dalšímu zpracování. Následně jsem provedla polymerázovou řetězovou reakci, což je metoda využívající rychlého zmnožení DNA založena na principu replikace nukleových kyselin. PCR probíhala v termocyklerech (BIO RAD, BIOER) po dobu dvou hodin. Amplifikace probíhala v opakujících se cyklech, složených ze tří základních kroků – denaturace, hybridizace a elongace.

Následujícím krokem byla gelová elektroforéza. Dochází při ní k rozdělení DNA na jednotlivé fragmenty. Dělení probíhá na základě rozdílných molekulových hmotností za současného působení elektrického pole. Výsledek elektroforézy byl zobrazován pomocí transluminátoru, který byl propojen s počítačem. Podle délky fragmentů bylo určeno, zda se jedná o přítomnost jednoho ze čtyř výše uvedených druhů mikrosporidií ve vzorku.

Jelikož se potvrdila přítomnost mikrosporidií, dalším krokem byla extrakce DNA z gelu. Vyizolovaná čistá DNA byla poté zaslána na sekvenaci. Celkem bylo na sekvenaci zasláno 9 fragmentů DNA. Posledním krokem byla analýza prováděná v biologickém centru AV ČR v Českých Budějovicích, která určila, o jaký genotyp se jedná.

Byla potvrzena přítomnost druhu *Encephalitozoon cuniculi*, genotyp II u jednoho hematologického pacienta. Dále byla potvrzena přítomnost druhu *Enteocytosoon bienersi*, genotyp D u dvou hematologických pacientů a u šesti onkologických pacientů.

Abstract

Microsporidia are intracellular parasites belonging to the Fungi kingdom. There are about 1200 species of microsporidia in 150 genera, 14 species of microsporidia are the most important for human. *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* are the most common microsporidian, that cause infections in humans. Microsporidia attack almost all animal species include humans, from insects to birds.

Infectious stages of microsporidia are spores. They are oval shape and serve for host infection. Spore contains the polar tube, which is ejecting into cytoplasm of the host cell. The process is triggered by external conditions and release the content called sporoplasma into host cell. The development of microsporidia in the host follow, which includes two phases of development - merogony, which involves division of the plasmodium on meronts and sporogony, when individual cells become independent and after variol stages of development finishes by the spore formation.

Microsporidiosis can be transmitted by fecal oral transmission: ingestion of contaminated water or poorly cooked meat. This type of transmission is called horizontal. The second type of transmission is vertical transmission (transplacental), which wasn't been described in humans. Zoonotic transmission can be important, too. A person can be infected by microsporidiosis from various species of animals that were infected with different species of microsporidia.

Patients with acquired primary immunodeficiency are the group at risk. Children, senior patients, travelers or patients after transplantation can be infected, too.

Microsporidia cause opportunistic infections for which is characteristic that accompany other primary diseases, such as AIDS, other viral or bacterial diseases and so on. The most common clinical manifestations include diarrhea, other symptoms are eye, lung or muscle problems. Microsporidia can also attack the kidneys or spleen and cause an inflammatory reaction.

The aim of this work was determine the presence or absence four species of microsporidia, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon nbieneusi* in faecal samples of hematology and oncology patients and compare the results with the results already described.

I collected 45 stool samples during the period January 2012 - January 2013. Samples were collected in non-sterile cap bottles and processed in parasitological laboratory in AS CR in České Budějovice.

Then I stained all samples by the Calcofluor white and examined with the microscope Olmypus IX70. I was looking for oval bright blue-white spores of microsporidia. It was necessary to distinguished from yeasts.

Another method was molecular diagnostics. I isolated DNA from all 45 samples using a commercial kit PSP Spin Stool DNA kit (INVITEK). During isolation spores were desintegrated and DNA suitable for further processing obtained. Then I performed polymerase chain reaction, a method using a rapid multiplication of DNA based on the principle of replication of nucleic acids. PCR was performed in thermocycler (BIO RAD, BIOER) for two hours. Amplification was carried out in 35 repetitive cycles of three basic steps - denaturation, hybridization and elongation.

Gel electrophoresis was next step, that causes the distribution of the DNA fragments. Separation was performed on basic of different molecular weights for the current to an electric field. There result was shown by electrophoresis transluminator, which was connected with a computer. According to the fragment length was determined whether one of the four above-mentioned species of microsporidia is present in the sample.

DNA extraction from gel was next step, if presence of microsporidia was confirmed. Then the purified DNA was send to sequencing to Korea and sequences were evaluated. Total nine DNA fragments were send to sequencing.

Next analyses was last step. This was carried in out in the biological center of AS CR in České Budějovice. Phylogenetic analyses determined type of genotype.

Presence of the species *Encephalitozoon cuniculi*, genotype II in one hematologic patient was confirmed. Also, presence of the species *Enterocytozoon bieneusi*, genotype D in two hematologic patients and six hematologic patients was confirmed.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce a i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáváním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V českých Budějovicích dne 3. 5. 2013

.....

Poděkování

Mé poděkování patří panu Doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za cenné rady a trpělivost při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Bohumilu Sakovi, RNDr. Ph. D. a celému kolektivu laboratoře parazitologie AV ČR za vstřícnost a profesionální přístup při mém výzkumu v laboratoři. V neposlední řadě mé velké poděkování patří laboratoři mykologie Nemocnice České Budějovice a hemato - onkologickému oddělení Fakultní nemocnice Plzeň – Lochotín, konkrétně paní MUDr. Kateřině Steinerové, za poskytnutý materiál, bez nichž by tato práce nevznikla.

Obsah

Úvod.....	10
1. Současný stav	11
1.1. Parazitismus.....	11
1.1.1. Oportunní parazité.....	11
1.2. Mikrosporidie	12
1.3. Stavba a struktura	13
1.4. Životní cyklus	14
1.5. Přenos a zdroje onemocnění	14
1.6. Onemocnění.....	15
1.7. Imunitní odpověď	16
1.8. Léčba	16
1.9. Druhy mikrosporidií napadající člověka	16
1.9.1. Enterocytozoon bienersi	16
1.9.2. Encephalitozoon intestinalis	17
1.9.3. Encephalitozoon hellem.....	17
1.9.4. Encephalitozoon cuniculi.....	17
1.10. Metody detekce mikrosporidií	18
1.10.1. Mikroskopické metody	18
1.10.1.1. Barvení	18
1.10.1.2. Elektronová mikroskopie.....	18
1.10.1.3. Transmisní elektronová mikroskopie	18
1.10.2. Histochemické metody	19
1.10.3. Serologické metody	19
1.10.4. Molekulární diagnostika	19
2. Cíle práce a hypotézy	20
2.1. Cíle práce.....	20
2.2. Hypotézy.....	20
3. Metodika.....	21

3.1.	<i>Charakteristika sledovaného souboru</i>	21
3.2.	<i>Odběr vzorků</i>	23
3.3.	<i>Metody zpracování</i>	23
3.3.1.	<i>Mikroskopické vyšetření</i>	23
3.3.1.1.	Barvení CalcofluoremWhite.....	23
3.4.1.	<i>Molekulární diagnostika</i>	24
3.4.1.1.	Izolace DNA.....	24
3.4.1.2.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	27
3.4.1.3.	Gelová elektroforéza.....	30
3.4.1.4.	Extrakce DNA z gelu.....	31
4.	Výsledky.....	33
4.1.	<i>Calcofluor white</i>	33
4.2.	<i>Polymerázová řetězová reakce</i>	33
4.2.1.	<i>Vyhodnocení sekvenace a další analýzy</i>	33
5.	Diskuze.....	37
6.	Závěr.....	40
7.	Literatura.....	41
8.	Klíčová slova.....	46
9.	Přílohy.....	47

Úvod

Mikrosporidie řadíme do říše hub. Jsou to obligátně intracelulární, oportunní parazité, kteří způsobují infekce téměř všech živočišných druhů. Velmi často napadají jedince, u nichž selhal imunitní systém. Jedná se nejčastěji o pacienty nakaženými AIDS, ale mikrosporidiová infekce může také například postihnout pacienty s nádorovými chorobami.

Cílem mé práce bylo prozkoumat reprezentativní vzorky stolice od určité skupiny pacientů a zjistit přítomnost či nepřítomnost čtyř druhů mikrosporidií, a to *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuniculi* a *Enterocytozoon bieneusi*.

1. Současný stav

1.1. Parazitismus

Parazitismus můžeme chápat jako vztah mezi dvěma organismy, přičemž jeden z organismů (parazit) žije na úkor druhého organismu (hostitele) (Ryšavý, 1988). Parazit odebírá hostiteli živiny, čímž mu škodí a může ho i zabít. Během svého života napadá parazit pouze jednoho hostitele, čímž se liší od predátorů (Horák, 2007).

Parazity můžeme rozdělit do různých skupin podle jejich typických vlastností. Podle velikosti dělíme parazity na mikroparazity (viry, prvoci, bakterie), jejichž rozmnožování probíhá uvnitř hostitele a na makroparazity (členovci, helminti), kteří se v hostiteli pouze vyvíjí, ale jejich rozmnožování probíhá mimo něj.

Dále dělíme parazity podle cílového hostitele. Některé druhy mikrosporidií napadají zvířata a lidi, některé infikují pouze rostliny. Podle lokalizace dělíme parazity na ektoparazity a endoparazity. Mezi ektoparazity patří ti parazité, kteří se vyskytují na površích těla či orgánů hostitele. Mezi tento typ patří například vši. Endoparazité naopak parazitují uvnitř orgánů a tkání hostitele. Takto parazitují například tasemnice a další helminti, ale také mikrosporidie (Kořínková, 2006).

1.9.3. Oportunní parazité

Za oportunní parazity můžeme považovat ty, jenž způsobují vážné choroby u těch osob, co mají sníženou obranyschopnost, jako jsou např. pacienti po transplantacích, s nádorovými onemocněními či se syndromem AIDS (Didier, 2000).

Nejčastěji způsobují oportunní infekce toxoplasmy, mikrosporidie či kryptosporidie. Tito parazité nejsou za normálních podmínek patogenní, ale u imunosupresivních jedinců mohou způsobit onemocnění (Canning et Holister, 1987).

Téměř 80 % pacientů trpících AIDS zemře v důsledku nakažení oportunními infekcemi. Oportunní infekce se u těchto pacientů vyskytnou v pozdějších stádiích AIDS, kdy je hladina lymfocytů CD4+ , které jsou zodpovědné za specifickou imunitní odpověď, velmi nízká (Kasper, 1998).

Byl proveden výzkum v severní Africe ve státě Egypt, kdy bylo odebráno 200 vzorků stolice od imunosupresivních dětí a 250 vzorků od imunokompetentních dětí, hospitalizovaných v lůžkových a ambulantních klinikách.

Vzorky byly vyšetřeny pomocí koncentrační metody, dále obarveny dvěma odlišnými barvicími technikami, a to dle Giemsy a upravenou barvicí technikou dle Ziehl-Nelsona (Abdel-Hafeez, 2012).

U 94 % imunosupresivních dětí byla nalezena parazitární infekce, z toho nejčastěji se u nich vyskytovaly druhy *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica* a *Giardia lamblia*.

U imunokompetentních dětí byla parazitární infekce nalezena z 60% a nejčastěji nalézaným druhem byly *Entamoeba histolytica* a *Giardia lamblia* (Abdel-Hafeez, 2012).

1.2. Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou jednobuněční intracelulární parazité, původně zařazení mezi protozoa (Horák, 2007). Na základě molekulárních analýz byly reklasifikovány do říše hub. Mikrosporidie se vyskytují ve vodních a živočišných zdrojích. Mohou být příčinou infekčních chorob u pacientů po transplantaci orgánů, u dětí, cestovatelů či u pacientů se syndromem AIDS. Mikrosporidie napadají téměř všechny živočišné kmeny, nejčastěji však korýše a hmyz. Dále mohou infikovat ryby, ptáky a také savce včetně člověka (Anane, 2010).

Doposud bylo popsáno přibližně 1200 druhů mikrosporidií, které byly následně rozděleny do 150 rodů (Horák, 2007). V současné době je známo přibližně 14 druhů mikrosporidií, které infikují člověka, z nichž nejčastěji způsobuje lidské infekce *Encephalitozoon intestinalis* a *Enterocytozoon bieneusi*.

Mikrosporidie mohou napadat všechny tkáně a orgány organismu, nejčastěji však gastrointestinální trakt. Dále mohou infikovat játra, ledviny, plíce či slinivku, kde se poté může rozvinout také zánětlivá reakce (Anane, 2010).

1.3. Stavba a struktura

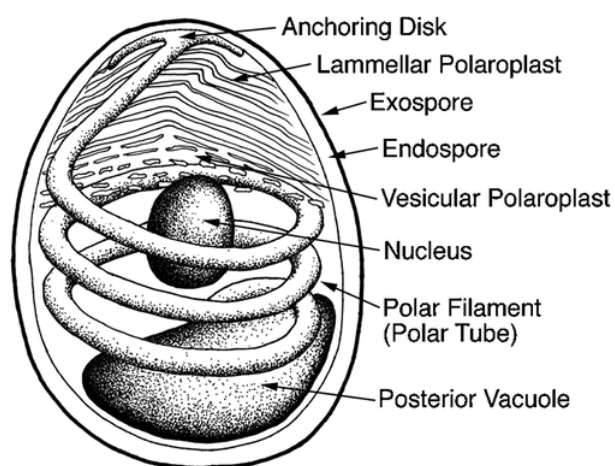
Infekčním stádiem mikrosporidií je spora. Spora je velká přibližně $1,0 - 3,0 \mu\text{m}$ x $1,5 - 4,0 \mu\text{m}$. Nejčastěji má oválný tvar, mohou se však vyskytovat i tvary hruškovité či kulovité. Spora je relativně odolná vůči vnějšímu prostředí. Má silnou stěnu složenou z několika vrstev – z proteinové exospory, chitinové endospory a vnitřní plazmatické membrány (Horák, 2007).

Uvnitř spory nalezneme cytoplazmu s jádrem. Jádro se může vyskytnout ve dvou podobách a to jako jedno jádro (monokaryon), které nalezneme například u druhů *Encephalitozoon* nebo *Enterocytozoon*, nebo může cytoplazma spory obsahovat dvě jádra (diplokaryon), které nalezneme u druhů *Brachiola* či *Nosema* (Didier, 2004).

Další důležitou součástí spory je vystřelovací aparát, který je složen ze tří částí. K vnitřní straně stěny spory je zakotvené pólové vlákno, což je desítky až stovky μm dlouhá dutá trubice, zasahující do poloviny délky spory. Druhou částí vystřelovacího aparátu je polaroplast, který se tvoří navrstvením těsně přiložených membránových lamel, obklopujících pólové vlákno. Poslední část tvoří vakuola, kterou nalezneme v zadní části spory. Vakuola má schopnost bobtnat.

Spora je aktivována vnějšími podmínkami, přičemž je vymrštěno pólové vlákno a do cytoplazmy hostitelské buňky se vytlačí se obsah zvaný sporoplasma (Horák, 2007).

Obr. 1 Stavba spory



Zdroj: Ryšavý, 1988

1.4. Životní cyklus

Microsporidie mohou přežít pouze uvnitř jiné žijící buňky.

Poté, co je sporoplasma přenesena do cytoplazmy hostitelské buňky, prochází mikrosporidie dvěma fázemi vývoje (Horák, 2007).

První, vegetativní fázi je merogonie. Při merogonii dochází k růstu sporoplasmy v plasmodium. Plasmodium se poté dělí binárním dělením na dceřinné buňky, tzv. meronty. Meronti jsou několik μm velké buňky mikrosporidií a mají jednoduchou strukturu. Obsahují pozůstatky mitochondrií a velmi primitivní Golgiho aparát. K dělení plasmodia na meronty dochází tak dlouho, až je buňka zcela zaplněna meronty. Poté se na povrchu mikrosporidií začne vytvářet elektrodenzní stěna.

Nyní začíná druhá fáze vývoje, sporogonie. Jednotlivé buňky se osamostatňují a vznikají tak sporoblasty. Posledním stadiem sporulace je spora, která vzniká z každé buňky parazita. V této chvíli je již hostitelská buňka poškozována (Horák, 2007).

Spory mohou být také vytvářeny ve dvou generacích. První generace spor šíří infekci v hostiteli, naopak druhá generace šíří infekci do vnějšího prostředí. Je to způsobenou tloušťkou buněčné stěny mikrosporidie. První generace mikrosporidií má buněčnou stěnu tenčí, druhá generace naopak silnější (Vávra et Larson, 1999).

1.5. Přenos a zdroje onemocnění

Existuje několik způsobů přenosu mikrosporidií. Vertikální neboli také transplacentární přenos z matky na dítě nebyl u lidí zaznamenán. Tento druh přenosu byl popsán u hlodavců (Horák, 2007).

Horizontální přenos je umožněn fekálně orální cestou, požitím kontaminované vody či vdechnutím kontaminovaného vzduchu. Rizikové je také nitrožilní užívání drog či pohlavní styk u homosexuálů (Mota et al, 2000).

Mikrosporidíózou se člověk může nakazit po požití vody, která je kontaminována výkaly nakažených zvířat. Jelikož spory mikrosporidií jsou odolné, dokáží ve vodě přežít. Zvýšené riziko nákazy mikrosporidií je také v rekreačních bazénech či ve vířivkách (Didier, 2004). Dalším zdrojem mikrosporidií je nedostatečně tepelně upravené hovězí a rybí maso.

Dále se člověk může nakazit mikrosporidiózou od infikovaných zvířat. Existuje poměrně široké spektrum živočichů, kteří mohou být infikováni jednotlivými druhy mikrosporidií a u nich může dojít k přenosu na člověka, viz tabulka 1. Byl hlášen případ, kdy se projevila mikrosporidióza u dítěte po styku se štěňaty, která byla infikována druhem *Encephalitozoon cuniculi* (McInnes a Stewart, 1998).

Tab. 1 Výskyt jednotlivých druhů mikrosporidií u různých živočichů

Druh mikrosporidie	Živočich
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Králík
	Liška
	Koza
	Hlodavci
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Pes
	Prase
	Skot
	Koza
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Šelmy
	Skot
	Prase
	Drůběž

Zdroj: Didier, 2004

1.6. Onemocnění

Mikrosporidie nejčastěji napadají jedince s oslabeným imunitním systémem, ale infekce mohou způsobit i u zdravých jedinců. Průběh infekcí způsobených mikrosporidii závisí na imunitním stavu hostitele.

Zlepšením diagnostiky bylo zjištěno, že mikrosporidióza se může kromě osob s infekcí HIV vyskytovat i dětí, pacientů po transplantaci orgánů i u starších osob (Didier, 2006).

Nejčastějšími příznaky mikrosporidiózy jsou průjemy, dále mohou být postiženy ledviny, plíce.

1.7. Imunitní odpověď

Při obraně organismu proti mikrosporidiovým infekcím se uplatňuje humorální imunitní odpověď. Důležitou roli zde hrají cytotoxické T lymfocyty (CD8+). Produkují cytokiny, které se díky svým cytotoxickým účinkům uplatňují při prozánětlivé reakci. U infekcí způsobených mikrosporidií *Encephalitozoon* se uplatňují prozánětlivé cytokiny jako je například tumor nekrotizující faktor (TNF), interferon gamma (INF) a interleukin 12 (IL-12) (Anane, 2010).

1.8. Léčba

K léčbě mikrosporidiózy se využívají nejvíce léčiva albendazolsulfoxid a fumagilin.

Albendazolsulfoxid patří do skupiny benzimidazolů a má antimykotické účinky. Je účinný proti mikrosporidii *Encephalitozoon* (Kotler a Orenstein, 1999).

Fumagilin je antibiotikum, které se používá při léčbě keratokonjunktivitidy způsobené rodem *Encephalitozoon*. Nežádoucími účinky však byli neutropenie a trombocytopenie u některých pacientů.

Na snížení výskytu mikrosporidiových infekcí se také podílí vysoce aktivní retroviární terapie (HAART), která se využívá k léčbě pacientů nakažených AIDS, kteří často trpí právě mikrosporidiovými infekcemi (Conteas et al, 2000).

1.9. Druhy mikrosporidií napadající člověka

1.9.1. *Enterocytozoon bieneusi*

Enterocytozoon bieneusi je nejčastější mikrosporidie, která způsobuje infekce u člověka. Napadá enterocyty, které se nacházejí v klcích tenkého střeva. Infekce je doprovázena hyperplazií krypt, zvýšením počtu intraepiteliálních lymfocytů (Shaddock, 1993).

Běžnými klinickými příznaky, které jsou spojené s infekcemi způsobenými mikrosporidií *Enterocytozoon bieneusi* u osob trpících AIDS, jsou přetrvávající průjem, bolesti břicha či hubnutí (Kotler a Orrenstein, 1998). Existují však i případy, kdy může *Enterocytozoon bieneusi* napadnout dýchací ústrojí a způsobit infekce plic.

Přítomnost *Enterocytozoonu bieneusi* byla také zjištěna v přírodních zdrojích, jako je povrchová voda, ale i divoká či domestikovaná zvířata. To vyvolalo obavy z přenosu na člověka (Thellier, 2008).

1.9.2. *Encephalitozoon intestinalis*

Druhou nejčastější mikrosporidií, kterou lze detekovat u lidí, je *Encephalitozoon intestinalis*. Poprvé byla identifikována v roce 1993 v materiálu od pacientů nakažených syndromem AIDS. *Encephalitozoon intestinalis* se může dále vyskytovat u lidí trpících cestovatelskými průjmy či enteritidami, významní jsou také pacienti po transplantacích (Annane et Attouchi, 2010).

Encephalitozoon intestinalis je také častou příčinou ulcerace tenkého střeva, dále akutních i chronických zánětů střeva. Může se šířit do celého těla, kde pak způsobuje záněty orgánů a tkání, které infikoval, jako je například slinivka či ledviny. Dále může způsobovat oční infekce (Didier, 1998).

1.9.3. *Encephalitozoon hellem*

Encephalitozoon hellem je třetím nejčastějším druhem mikrosporidií, který se vyskytuje u lidí. Kromě člověka může napadat také různé živočichy, nejčastěji ptáky, u nichž může způsobit střevní potíže (Snowden, 2000).

Encephalitozoon hellem způsobuje onemocnění zvláště u osob trpících AIDS. Způsobuje především různé infekce očí, například spojivek, dále také dýchacích cest (Schwartz, 1993).

1.9.4. *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi neboli králičí byl nalezen u králíků, dále může infikovat také šelmy, hlodavce, koně ale také člověka. Největší výskyt *E. cuniculi* byl zaznamenán u pacientů s chorobami ledvin a neurologickými obtížemi. U člověka způsobuje především záněty, např. nefritidu, pankreatitidu či rhinosinutidu, které byly nalezeny u pacientů s AIDS (Franzen, 1996).

Člověk se může infikovat *E. cuniculi* po styku se zvířetem, přenos z člověka na člověka zatím nebyl prokázán (Didier, 1995).

1.10. Metody detekce mikrosporidií

Diagnóza mikrosporidiózy je založena na přítomnosti spor v biologických vzorcích. Nejčastěji se používá nativní vzorek stolice, spory ale můžeme nacházet i v moči, mozkomíšním moku či ve sputu (Didier, 2005).

1.10.1. Mikroskopické metody

Mezi nejdůležitější metody detekce mikrosporidií patří mikroskopie, která nám umožňuje pozorovat například spory.

1.10.1.1. Barvení

Vzhledem k malé velikosti spor nemohou být mikrosporidie identifikovány v čerstvých vzorcích stolice bez zvláštního barvení. Nejkonkrétnější a nejvíce používaná metoda barvení používána k identifikaci spor mikrosporidií je Weberovo trichromatické barvení (Bryan, 1994). Spory se pod mikroskopem jeví jako vejčitá tělíška, pozadí je zbarveno modře nebo zeleně (Franzen, 1999).

1.10.1.2. Elektronová mikroskopie

Použit můžeme také elektronovou mikroskopii. Lze ji uplatnit pro tkáňové biopsie, biologické tekutiny (moč, mozkomíšní mok,...), dále můžeme použít vzorky stolice (Franzen, 1994). U vzorků stolice a biologických tekutin je diferenciací obtížná, protože většina proliferační fáze chybí, tyto typy vzorků obsahují pouze spory (Dei-cas, 1994). Pro materiál z tkáňové biopsie je výhodná elektronová mikroskopie z toho důvodu, že umožňuje detekci různých fází vývoje parazita. Citlivost této metody je však omezena z důvodu malého množství materiálu.

1.10.1.3. Transmisní elektronová mikroskopie

Mikrosporidie můžeme dále pozorovat pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Tato technika není běžně používána v rozsáhlých diagnostických studiích, protože je u ní vyžadován vysoký stupeň odborných znalostí, je nákladná a relativně necitlivá (Franzen, 1999).

1.10.2. Histochemické metody

Pro diagnostiku mikrosporidií v moči a stolici jsou využívány také histochemické metody. Používají se fluorescenční barviva jako např. CalcofluorWhite, který váže polysacharidy celulózy a chitinu nacházející se ve stěně spor mikrosporidií. Jsou poměrně citlivé a časově nenáročné. Pod fluorescenčním mikroskopem v rozsahu 350 – 440 nm bíle září. Kvasinky také obsahují chitin a vážou na sebe fluorescenční barviva což někdy vede k falešně pozitivním výsledkům pro diagnostiku mikrosporidie (Fedorko, 1996).

1.10.3. Serologické metody

Pro detekci mikrosporidií v krvi jsou v menší míře využívány také serologické metody, například imunochemické barvení protilátek či ELISA. Nejčastěji byla serologickými testy prováděnými na laboratorních zvířatech detekována mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi*, tytéž testy byly také použity pro detekci *Encephalitozoon cuniculi* u lidí (Singh, 1982).

1.10.4. Molekulární diagnostika

Při detekci mikrosporidií je často využívána PCR (polymerázová řetězová reakce). PCR se používá pro druhově a genotypově specifickou detekci mikrosporidií (Fedorko, 1996). PCR umožňuje selektivní amplifikaci z DNA nebo RNA. Je vybrán fragment z komplexního genomu enzymatickou amplifikací in vitro. DNA je denaturována zahříváním, poté se teplota sníží, specifické oligonukleotidové primery se kříží na jejich komplementární sekvence na protilehlých stranách. Šablona DNA pak postupuje v obou orientacích z primerů enzymatickou katalýzou s Taq (původně izolovaný z bakterie *Aquaticus thermus*) a výsledkem jsou dvouřetězcové produkty. Tato syntéza se opakuje (obvykle) více než v 30-35 cyklech v automatizovaném termocykleru, a může trvat až několik hodin. Během každého cyklu je šablona replikována na dvojnásobek, takže po skončení dostaneme miliony kopií původní šablony, které jsou k dispozici pro další manipulaci nebo analýzy (Felleisen, 1996).

2. Cíle práce a hypotézy

2.1. Cíle

- 1) Sepsat literární rešerši o tématu
- 2) Shromáždit vzorky stolice hematologických a onkologických pacientů
- 3) Vzorky vyšetřit pomocí PCR na přítomnost mikrosporidií.
- 4) Výsledky dát do souvislosti s dalšími informacemi o pacientech.
- 5) Porovnat výsledky s dosud publikovanými výsledky.

2.2. Hypotézy

H1 = Léčba cytostatiky využívaná u pacientů s nádorovým onemocněním má zároveň antimikrosporidiové účinky.

3. Metodika

3.1. Charakteristika sledovaného souboru

Sledovanou skupinou byli hematologičtí pacienti (děti) a onkologičtí pacienti ve věku od 2 do 77 let. Celkem mi bylo poskytnuto 45 vzorků stolic, přičemž 20 vzorků (44,4 %) od hematologických pacientů mi poskytla mykologická laboratoř z Nemocnice České Budějovice a.s. a 25 vzorků (55,5%) od onkologických pacientů mi bylo poskytnuto onkologickým oddělením fakultní nemocnice Plzeň – Lochotín.

Tab. 1 Procentuální zastoupení pacientů dle pohlaví a daného onemocnění

	Pacient	
Pohlaví	Hematologický	Onkologický
žena	45%	36%
muž	55%	64%
Celkem	100%	100%

Tab. 2 Procentuální zastoupení pacientů dle věku

	Pacienti	
Věk	Hematologičtí	Onkologičtí
1 - 15	90%	0%
16 - 30	10%	8%
31 - 50	0%	16%
51 - 70	0%	52%
71 - 90	0%	24%
celkem	100%	100%

Tab. 3 Procentuální zastoupení pacientů dle diagnózy

a) Hematologičtí pacienti

	Zastoupení pacientů v %	Diagnóza
	50	D 696
	30	C 910
	10	C 911
	10	C 719
Celkem	100	

Diagnóza

D 696....trombocytopenie NS

C 911....chronická lymfatická leukemie

C 910....akutní lymfoblastická leukemie

C 719....zhoubný novotvar NS

Zdroj: Mezinárodní statistická klasifikace nemocí

b) Onkologičtí pacienti

	Zastoupení pacientů v %	Diagnóza
	44	C 911
	28	C 920
	8	C 900
	8	C 820
	8	C 838
	4	C 830
Celkem	100	

Diagnóza

C 911.....chronická lymfatická leukemie

C 920.....myeloidní leukemie

C 900.....mnohočetný myelom

C 820.....folikulární lymfom

C 838.....non-folikulární lymfom

C 830.....non-Hodkinský B-lymfom

Zdroj: Mezinárodní statistická klasifikace nemocí

3.2. Odběr vzorků

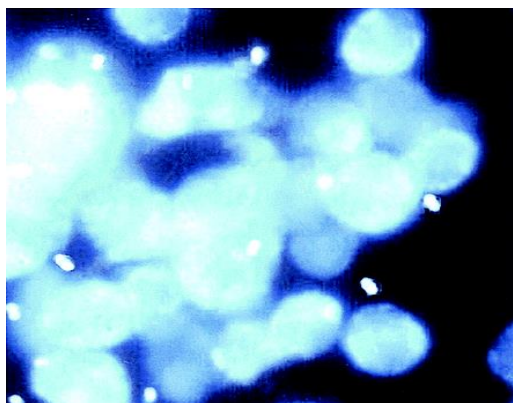
Nativní vzorky stolice určené k výzkumu byly odebírány do nesterilních uzavíratelných nádobek a transportovány do laboratoře, ve které byl výzkum prováděn, v přenosném chladicím boxu. Pokud vzorek stolice nebyl zpracován v den odběru, byl uchováván v chladu při teplotě 5 °C. Doba mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním nebyla delší než 7 dní. Jsem si vědoma možného ovlivnění výsledků vyšetření způsobeného právě dobou zpracování vzorků.

3.3. Metody zpracování

3.3.1. Mikroskopické vyšetření

Pomocí mikroskopické metody barvení Calcofluorem jsem hledala v mikroskopu spory mikrosporidií oválného tvaru, které svítí jasně modrobíle (Obr. 1)

Obr. 1 Spory mikrosporidií obarvené Calcofluorem white



Zdroj: Lynne S. Garcia

3.3.1.1. Barvení Calcofluorem White

Použité chemikálie

- 1) 1 % Calcofluor White (0,1 g, 100 ml PSB)
- 2) 0,5 % Evansova modř (0,05 g, 100 ml PSB)

Pracovní postup

- 1) Vzorek stolice rozetřeme na podložní sklo a necháme zaschnout.
- 2) Fixujeme preparáty methanolem, necháme zaschnout 2 minuty.
- 3) Barvíme 1 % calcofluorem po dobu 10 minut.
- 4) Preparáty opatrně opláchneme pod tekoucí vodou.
- 5) Dobarvíme 0,5 % Evansovou modří po dobu 30 sekund.
- 6) Opět opatrně opláchneme pod tekoucí vodou a necháme zaschnout.

Preparáty prohlížíme pod fluorescenčním mikroskopem OLYMPUS IX 70 (Obr. 2) za použití olejové imerze při vlnové délce 490 nm.

Obr. 2 Mikroskop OLYMPUS IX 70



Zdroj: Dorazilová foto

3.4.1. Molekulární diagnostika

3.4.1.1. Izolace DNA

Izolace DNA ze vzorků stolice byla prováděna pomocí komerčního kitu PSP Spin Stool DNA Kit (INVITEK) (Obr. 3)

Pracovní postup:

- 1) Odebereme 200 – 400 mg stolice (velikost hrachu).
- 2) Vzorek stolice přeneseme do Safe-Lock-Tube, přidáme pár skleněných kuliček, 2-3 zirkonové kuličky a připipetujeme 900 µl LysisBuffer P.
- 3) Vortexujeme a poté rozbíjíme 1 minutu ve Fast Prep 24 (z důvodu rozbití spor).
- 4) Vzorky inkubujeme v termobloku 10 minut při 95 °C.
- 5) Centrifugujeme 1 minutu při 13 400 ot/min.
- 6) Supernatant přepipetujeme do InviAdsorb-Tube (ependorfka s uhlím), 15 s vortexujeme.
- 7) Centrifugujeme 3 minuty při 13 400 ot/min.
- 8) Supernatant přepipetujeme do čistých ependorfek a opět centrifugujeme 3 minuty při 13 400 ot/min.
- 9) Vezmeme si nové ependorfky, napipetujeme do nich 25 µl Proteinase K a připipetujeme 400 µl supernatantu, vortexujeme 5 sekund.
- 10) Inkubujeme v termobloku 10 minut při 70 °C.
- 11) Připipetujeme 400 µl Binding Buffer P a opět vortexujeme.
- 12) Následně veškerý objem přepipetujeme do Spin Filter + Tube (Ependorfka s kolonou), centrifugujeme 1 minutu při 13 400 ot/min
- 13) Odpad z ependorfky vylijeme a připipetujeme 500 µl roztoku Wash I.
- 14) Centrifugujeme 1 minutu při 13 400 ot/min.
- 15) Odpad opět vylijeme a připipetujeme 800 µl Wash II.
- 16) Opět centrifugujeme 1 minutu při 13 400 ot/min.
- 17) Odpad vylijeme a centrifugujeme 3 minuty při 13 400 ot/min.
- 18) Ependorfku vyhodíme, na kolonu nasadíme čistou ependorfku, napipetujeme 200 µl předeřátého ElutionBuffer D a centrifugujeme 1 minutu při 8 500 ot/min.
- 19) Kolonu vyhodíme a řádně popsané ependorfky s vyizolovanou DNA uchováváme v mrazáku při -20°C.

Obr. 3 Komerční kit PSP Spin Stool DNA Kit (INVITEK)



Obr. 4 Homogenizátor (FastPrep-24, M. P. Biomedicals)



Obr. 5 Vortex Centrifuga na mikrozskumavky



Zdroj: Dorazilová foto

3.4.1.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí metody PCR lze snadno a rychle dosáhnout zmnožení úseků DNA. Výsledkem je velké množství kopií původní sekvence DNA.

Pro tento výzkum byly provedeny dvě sady PCR, z nich každá obsahovala různé primery. První sadou se prokazovala přítomnost *Enterocytozoonu bieneusi* a druhou sadou *Encephalitozoon* spp. Nezbytnou součástí byla pozitivní a negativní kontrola.

Celkový objem reakční směsi činil pro každou sadu PCR 25 µl, přičemž u primární fáze PCR tvořil 20 µl Master Mix (Tab.1) a zbylých 5 µl DNA a u druhé fáze PCR, která již neobsahovala přídavek BSA, tvořil Master Mix 23 µl (Tab. 2) a DNA zbylé 2 µl.

Tab. 1 Master Mix pro primární PCR

Roztok	Objem (µl)
Destilovaná H ₂ O	12,87
Pufr	2,5
D'NTP ₃	0,5
MgCl ₂	1,5
primer forward	0,5
primer reverse	0,5
BSA (pouze u 1.sady PCR)	1
Taq polymeráza	0,63
Součet	20

Tab. 2 Master Mix pro sekundární PCR

Roztok	Objem (μ l)
Destilovaná H ₂ O	16,87
Pufr	2,5
D ⁺ NTP ₃	0,5
MgCl ₂	1,5
primer forward	0,5
primer reverse	0,5
BSA (pouze u 1.sady PCR)	
Taq polymeráza	0,63
součet	23

Tab. 3 Primery pro *Enterocytozoon bieneusi*

Primery	Sekvence
Primární PCR	
EBITS 3	GGT CAT AGG GAT GAA GAG
EBITS 4	TTC GAG TTC TTT CGC GCT C

Primery	Sekvence
Sekundární PCR	
EBITS 1	GCT CTG AAT ATC TAT GGT T
EBITS 2,4	ATC GCC GAC GGA TCC AAG TG

Tab. 3 Primery pro *Encephalitozoon* spp.

Primery	Sekvence
Primární PCR	
INT 580 F	TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT
INT 580 R	TTT CAC TCG VVG CTA CTC AG

Primery	Sekvence
Sekundární PCR	
MSP 3	GGA ATT CAC ACC GCC CGT CVY TAT
MSP 4 A	CCA AGC TTA TGC TTA AGT YMA ARG GGT

Primární fáze PCR pro druh *Enterocytozoon bieneusi* se prováděl v termocycleru T100 Thermal Cycler (BIO RAD). PCR trvala 2 hodiny. Nasedání primerů probíhalo při 57°C. Sekundární fáze pro tento druh probíhala v termocycleru LifePro Thermal Cycler (BIOER) a trvala taktéž 2 hodiny. Nasedání primerů probíhalo při 55°C.

Amplifikační program zahrnoval následující kroky:

1. Denaturace při 94°C/ 3 minuty
2. Denaturace při 94°C/45 sekund
3. Nasedání primerů při 57°C/45 sekund
4. Syntéza nového řetězce při 72°C/1 minuta
5. Dokončení syntézy řetězce při 72°C/7 minut

Cyklus zahrnující krok 1. - 2. probíhal 35x.

Primární fáze PCR pro druh *Encephalitozoon bieneusi* se prováděl v termocycleru LifePro Thermo Cycler (BIOER). Sekundární fáze probíhala taktéž v termocycleru LifePro Thermal Cycler (BIOER). Nasedání primerů probíhalo v obou fázích při 55°C. PCR trvala stejně jako u druhu *Enterocytozoon bieneusi* 2 hodiny.

Amplifikační program zahrnoval následující kroky:

1. Denaturace při 94°C/3minuty
2. Denaturace při 94°C/45 sekund
3. Nasedání primerů při 55°C/45 sekund
4. Syntéza nového řetězce při 72°C/1 minuta
5. Dokončení syntézy řetězce při 72°C/7 minut

Cyklus zahrnující kroky 1. - 2. Probíhal 35x.

Obr. 1 Thermocycler LifePro Thermal Cycler (BIOER) a T100 Thermal Cycler (BIO RAD)



Zdroj: Dorazilová foto

3.4.1.3. Gelová elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, která využívá rozdílné pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli. Na tomto základě jsme schopni pomocí elektroforézy izolovat molekuly.

Gelovou elektroforézou byla zkoumána délka amplifikované DNA.

Použité chemikálie:

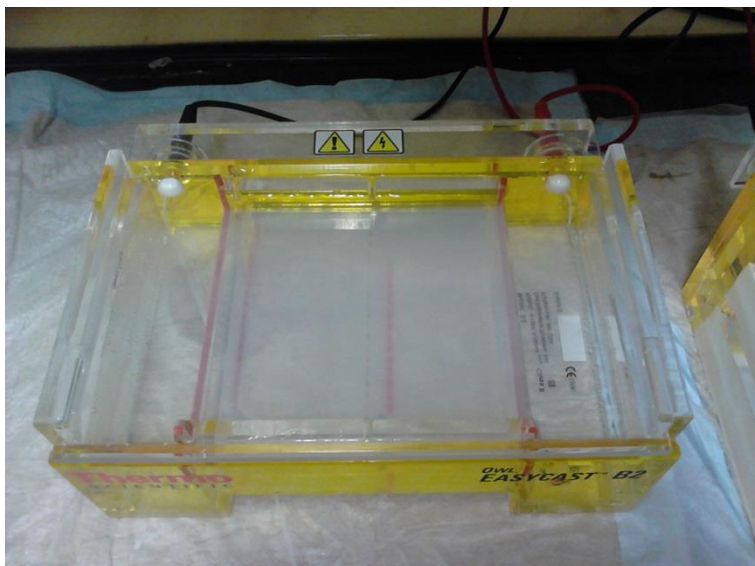
- a) TAE pufr
- b) Agaróza
- c) Ethidium bromid (EtBr)
- d) 100 bp DNA ladder

Pracovní postup:

1. Erlenovu baňku se směsí agarózy a TAE pufru (v poměru 1:100) zahřejeme v mikrovlnce, dokud roztok nezačne probublávat.
2. Baňku zchladíme pod tekoucí studenou vodou.
3. Připijeme přibližně 1 μ l EtBr a dobře promícháme.
4. Směs opatrně vylijeme do připravené vaničky s hřebenem tak, aby se netvořily bubliny.

5. Gel necháme přibližně 10 minut tuhnout.
6. Poté gel vložíme do elektroforetické vany starty vlevo u záporné elektrody.
7. Opatrně vyndáme hřeben a do vzniklých jamek pipetujeme vzorky v následujícím pořadí:
 - a) 1.jamka – ladder
 - b) 2.jamka – vzorek
 - c)
 - d) poslední start – negativní kontrola
8. Elektroforéza byla prováděna při 95 V, přibližně $\frac{3}{4}$ hodiny.
9. Vizualizace rozdělené DNA byla v transluminátoru.

Obr. 1 Gelová elektroforéza



Zdroj: Dorazilová foto

3.4.1.4. *Extrakce DNA z gelu*

V případě nálezu pozitivních vzorků při elektroforéze následuje extrakce DNA z gelu.

Použité chemikálie:

- a) QG pufr
- b) PE pufr
- c) PCR voda

Pracovní postup:

1. Čistým skalpelem vyřízneme pozitivní fragment DNA z gelu a přemístíme do připravené eppendorfky.
2. Připipetujeme 400 μ l QG pufru.
3. Inkubujeme v termobloku 10 minut při 50°C a každé 2 minuty promícháváme.
4. Veškerý objem z eppendorfky přepipetujeme na kolonu a centrifugujeme 1 minutu/13 400 ot/min.
5. Odpad ze sběrné zkumavky vylijeme a zkumavku opět nasadíme na kolonu.
6. Připipetujeme 500 μ l QG pufru a opět centrifugujeme 1 minutu/13 400 ot.
7. Opět vylijeme odpad ze sběrné zkumavky a zkumavku opět nasadíme na kolonu.
8. Dále připipetujeme 750 μ l PE pufru na kolonu, inkubujeme 2-5 minut a centrifugujeme 1 minutu/13 400 ot/min.
9. Odpad ze sběrné zkumavky vylijeme a s kolonou centrifugujeme opět 1 minutu/13 400 ot/min.
10. Na kolonu dáme novou eppendorfku a provedeme eluci napipetováním 30 μ l PCR vody.
11. Inkubujeme 1 minutu a poté centrifugujeme 1 minutu/13 400 ot/min.

Vyextrahovanou DNA uchováváme v ledničce. Posledním krokem je sekvenace, která nám určí, o jaký genotyp se jedná. Sekvenace probíhala v Korei.

4. Výsledky

4.1. Calcofluor white

Touto metodou jsem se v mikroskopu snažila zachytit spory mikrosporidií, pro něž je charakteristický oválný tvar a měly by zářit jasně modrobíle. Bylo nutné je odlišit od kvasinek.

Ze všech 45 vzorků jsem neprokázala přítomnost spor ani u jednoho vzorku.

4.2. Polymerázová řetězová reakce

Metodou PCR jsem vyšetřila všech 45 vzorků stolice. Z celkového množství bylo na sekvenaci zasláno 9 fragmentů DNA. Dále byla provedena analýza v biologickém centru AV ČR České Budějovice, která určila, o jaký konkrétní genotyp se jedná.

4.2.1. Vyhodnocení sekvenace a další analýzy

Sekvenací a fylogenetickou analýzou byla u 6 onkologických pacientů potvrzena přítomnost druhu *Enterocytozoon bieneusi*, konkrétně *E. bieneusi* genotyp D. U dvou hematologických pacientů byl nalezen také druh *Enterocytozoon bieneusi*, genotyp D a u jednoho hematologického pacienta byla nalezena přítomnost druhu *Encephalitozoon cuniculi*, konkrétně *E. cuniculi* genotyp II (Tab. 1 a Tab. 2)

Tab. 1 Výsledky sekvenace a fylogenetické analýzy – hematologičtí pacienti

pacient	věk	pohlaví	diagnóza	Vyhodnocení fylogen.analýzy
1	4	M	C 910	<i>Encephalitozoon cuniculi</i> - genotyp II
2	17	Ž	C 910	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> - genotyp D
3	2	Ž	D 696	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> - genotyp D

Tab. 2 Výsledky sekvenace a fylogenetické analýzy – onkologičtí pacienti

pacient	věk	pohlaví	diagnóza	Vyhodnocení fylogen.analýzy
1	73	M	C 900	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> - genotyp D
2	75	Ž	C 820	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> - genotyp D
3	70	M	C 920	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> - genotyp D
4	59	Ž	C 830	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> - genotyp D
5	63	M	C 820	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> - genotyp D
6	77	M	C 920	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> - genotyp D

Tab. 3 Zastoupení hematologických pacientů dle pohlaví a přítomnosti/nepřítomnosti druhu *Encephalitozoon cuniculi*

		<i>Encephalitozoon cuniculi</i>		celkem
		poz	neg	
pohlaví	žena	0	9	9
	muž	1	10	11
celkem		1	19	20
pohlaví	žena	0%	45%	45%
	muž	5%	50%	55%
celkem		5%	95%	100%

Tab. 4 Zastoupení hematologických pacientů dle pohlaví a přítomnosti/nepřítomnosti druhu *Enterocytozoon bieneusi*

		<i>Enterocytozoon bieneusi</i>		celkem
		poz	neg	
pohlaví	žena	1	8	9
	muž	1	10	11
celkem		2	18	20
pohlaví	žena	5%	40%	45%
	muž	5%	50%	55%
celkem		10%	90%	100%

Tab. 3 a tab. 4 nám ukazují, že pohlaví nemá vliv na výskyt mikrosporidií.

Tab. 5 Přítomnost/nepřítomnost druhu *Encephalitozoon cuniculi* a *Enterocytozoon bieneusi* u hematologických pacientů dle jednotlivých diagnóz

diagnóza	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>		celkem	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>		celkem
	poz	neg		poz	neg	
D 696	0	10	10	1	9	10
C 910	1	5	6	1	5	6
C 911	0	2	2	0	2	2
C 719	0	2	2	0	2	2
celkem	1	19	20	2	18	20

Tab. 6 Směrodatná odchylka a t-test

věk	poz	neg
průměr	12,5	8,4
sm.odchylka	2,9	5,9
t-test	0.250705926	

Výpočet směrodatné odchylky a t-testu dokazuje, že se dané hodnoty od sebe příliš neliší.

Tab. 7 Zastoupení onkologických pacientů dle pohlaví a přítomnosti/nepřítomnosti druhu *Enterocytozoon bieneusi*

		<i>Enterocytozoon bieneusi</i>		celkem
		poz	Neg	
pohlaví	žena	2	7	9
	muž	4	12	16
celkem		6	19	25
pohlaví	žena	22%	78%	100%
	muž	25%	75%	100%
celkem		24%	76%	100%

Tab. 6 nám ukazuje, že pohlaví nemá vliv na výskyt mikrosporidií.

Tab. 8 Přítomnost/nepřítomnost druhu *Enterocytozoon bieneusi* u onkologických pacientů dle jednotlivých diagnóz

diagnóza	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>		Celkem
	poz	neg	
C 820	2	0	2
C 830	1	0	1
C 838	0	2	2
C 900	1	1	2
C 911	0	11	11
C 920	2	5	7
celkem	6	19	25

Tab. 9 Směrodatná odchylka a t-test

věk	poz	neg
průměr	53,6	69,5
sm.odchylka	14,0	7,1
t-test	0.00702	

Výpočet směrodatné odchylky a t-testu dokazuje, že se dané hodnoty se od sebe příliš neliší.

Tab. 10

pacienti	léčba				
	indukční chemoterapie "7+3"	"priming"HD-CPA+G- CSF	HAM	HiDAC	CTD
poz	2	1	2	1	0
neg	3	4	7	3	2

Pozn.: HAM = vysokodávkovaný cytosin-arabinosid a mitoxantron

CTD = cyklofosfamid, thalidomid, dexametazon

Z tabulky je patrné, že nejvíce pacientů (9) bylo léčeno léčbou HAM, z toho u dvou pacientů se potvrdila přítomnost mikrosporidií.

5. Diskuze

Cílem mé bakalářské práce bylo zjistit výskyt čtyř druhů mikrosporidií (*Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem*, *Enterocytozoon bieneusi*) ve vzorcích stolice hematologických a onkologických pacientů.

Vzorky jsem zpracovávala metodou barvení Calcofluorem white, následně jsem preparáty pozorovala pod mikroskopem Olympus IX 70 a hledala spory mikrosporidií. Mikroskopické metody jsou relativně necitlivé, proto se nepotvrdila přítomnost mikrosporidií a byla proto provedena další, citlivější analýza.

Další vyšetřovací metodou byla polymerázová řetězová reakce. Devět fragmentů DNA bylo zasláno na sekvenaci, dále byla prováděna analýza, která potvrdila přítomnost dvou druhů mikrosporidií. Druh *Encephalitozoon cuniculi* byl nalezen u jednoho pacienta s hematologickým onemocněním, konkrétně s akutní lymfoblastickou leukémií. Jednalo se o genotyp II.

Encephalitozoon cuniculi je mikrosporidie vyskytující se převážně u králíků, dále ji můžeme nalézt u hlodavců či šelem. Pro *E. cuniculi* je typický zoonotický přenos (Didier 1995). Lze tedy předpokládat, že daný pacient se mohl nakazit po styku s králíky či jinými savci.

Dále byl nalezen u dvou hematologických a šesti onkologických pacientů druh *Enterocytozoon bieneusi*, konkrétně genotyp D. *E. bieneusi* je nejčastějším druhem mikrosporidií, který můžeme nalézt u člověka (Shadduck, 1993).

Smetanová ve své bakalářské práci zjišťovala výskyt mikrosporidií ve vzorcích stolice získaných od dětí. V žádném z těchto vzorků se mikrosporidie nevyskytovaly. Jako možný důvod absence mikrosporidií Smetanová relativně malý počet vzorků (Smetanová, 2011).

Výsledky výzkumu bakalářské práce Pelikánové, která pomocí PCR zjistila nejvyšší výskyt mikrosporidií u pacientů starších 50 let, by mohly být v souladu s mými výsledky (Pelikánová, 2009).

Také výsledky výzkumu Křivánkové, která zpracovávala vzorky získané od alkoholiků, dokazují jistou podobnost s mými výsledky. Křivánková potvrdila

přítomnost druhu *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I u jednoho pacienta (Křivánková, 2011).

Černá ve své bakalářské práci uvedla, že byl metodou PCR potvrzen výskyt mikrosporidií u pěti vzorků, konkrétně u třech vzorků se jednalo o druh *Enterocytozoon bieneusi* a u dvou vzorků o *Encephalitozoon cuniculi* (Černá, 2010).

V laboratoři veterinární a lékařské parazitologie parazitologického ústavu AV ČR byla prováděna studie, jejíž cílem bylo zjistit, zda se mikrosporidiové infekce vyskytují u zdánlivě zdravých osob. Výzkumu se zúčastnilo 15 HIV negativních osob ve věku od 22 do 56 let. Odebraný materiál (sérum, stolice, moč) byl vyšetřován nepřímým imunofluorescenčním testem, dále mikroskopickou technikou za použití Calcofluoru white a v neposlední řadě byla použita molekulární diagnostika pro stanovení druhu mikrosporidií. U třinácti zkoumaných osob byla nalezena bezpříznaková infekce způsobená *Encephalitozoon* spp. a u sedmi osob se potvrdila přítomnost druhu *Enterocytozoon bieneusi*. Výsledky této studie vedou k závěru, že výskyt mikrosporidií u zdravých jedinců je vyšší, než se původně myslelo (Sak a kolektiv, 2011).

Další výzkum měl za cíl zjistit prevalenci mikrosporidií *Encephalitozoon* spp a *Enterocytozoon bieneusi*. Byl vyšetřen materiál celkem od 382 osob ve věku od 1 do 84 let žijících na území České Republiky. Použitými metodami byla koprologie a molekulární metody. Mikrosporidiová infekce byla nalezena u 136 osob, přičemž nejvyšší výskyt mikrosporidií byl zaznamenán u lidí starších 50 ti let. Tímto výzkumem se potvrdila domněnka, že expozice mikrosporidií je běžná u imunokompetentních osob (Sak a kolektiv, 2011).

V téže laboratoři byla provedena studie na 319 pacientech z Polska trpících onkologickým onemocněním. Ani u jednoho z těchto pacientů nebyla potvrzena přítomnost mikrosporidií. Ve výzkumu mé bakalářské práce jsem se snažila vyvrátit hypotézu, že cytostatika používaná k léčbě polských onkologických pacientů mají zároveň antimikrosporidiové účinky (Ditrich, ústní sdělení).

Na základě mého výzkumu jsem dospěla k závěru, že hematologičtí i onkologičtí pacienti, u nichž se potvrdila přítomnost mikrosporidií, mají poškozený imunitní systém vlivem nádorového onemocnění i vlivem léčby cytostatiky. Všichni

onkologičtí pacienti s potvrzeným výskytem druhu *Enterocytozoon bieneusi*, genotyp D byli léčeni chemoterapií. Nejvíce pacientů (9) bylo léčeno léčbou HAM, z toho u dvou pacientů se potvrdila přítomnost druhu *Enterocytozoon bieneusi*, genotyp D. Další dva pacienti s potvrzenou přítomností mikrosporidií byli léčeni indukční chemoterapií "7+3". Dále byla používána léčba "priming"HD-CPA+G-CSF a HiDAC. Léčbou CTD byli léčeni dva pacienti, u žádného z nich se nepotvrdila přítomnost mikrosporidií.

Zároveň jsem vyvrátila hypotézu, že léčba cytostatiky účinně brání množení mikrosporidií. Jsem si vědoma malého počtu vzorků potřebných k tomuto výzkumu (ač se jednalo o maximum, které šlo pro daný výzkum získat), díky tomu není příliš možné vzorky statisticky vyhodnotit. Příčina, proč pacienti z Polska neměli mikrosporidie vůbec zůstává nevysvětlena a ve výzkumu mikrosporidií u onkologických a hematologických pacientů je třeba pokračovat.

6. Závěr

- 1) Mikroskopickou metodou nebyla potvrzena přítomnost žádného ze zkoumaných druhů mikrosporidií.
- 2) Metodou PCR a následnou analýzou byla potvrzena přítomnost druhu *Encephalitozoon cuniculi*, genotyp II a to u jednoho pacienta s hematologickým onemocněním, konkrétně akutní lymfoblastickou leukémií (5%). Dále byla potvrzena přítomnost druhu *Enterocytozoon bieneusi*, genotyp D u dvou pacientů s hematologickým onemocněním, konkrétně s akutní lymfoblastickou leukémií a trombocytopenií (10%) a u šesti pacientů s onkologickým onemocněním, konkrétně u dvou pacientů s folikulárním syndromem, u dvou pacientů s myelodní leukémií, u jednoho pacienta s folikulárním lymfomem a poslední pacient trpěl mnohočetným myelomem (24%).
- 3) Hypotéza, která tvrdila, že chemoterapie léčící nádorová onemocnění zároveň potlačuje množení mikrosporidií v těle pacientů, byla vyvrácena

7. Literatura

1. ABDEL, L. – HAFEEZ, E.H. – AHAMD, A.K. – ALI, B.A. – MOSLAM, F.A.: Opportunistic parasites among immunosuppressed children in Minia District, Egypt. *Korean Journal of Parasitology* (2012); 57-62
2. ANANE, S. – ATTOUCHI, H.: Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin. Biol.* 34 (2010); 450 – 464
3. BEAUVAIS, B. – SARFATI, C. – LARIVIERE, M. – DEROUIN, F.: Microsporidiosis. *Presse Medical* (2006); 23 ; 332-338
4. CANNING, E.U. – HOLLISTER, W.S.: Microsporidia of mammals – widespread pathogens or opportunistic curiosities? *Parasitology Today* (1987); 3 ; 267-273
5. COTTE, L. – RABODONIRINA, M. – CHAPUIS, F. – BAILLY, F. – BISSUEL, F. – RAYNAL, C. – GELAS, P. – PERSAT, F. – PIENS, M.A. – TREPO, C.: Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in person with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect Diseases* 180 (1999); 2003-8
6. ČERNÁ, L.: oportunní paraziti u pacientů geriatrických zařízení. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity. České Budějovice (2010).
7. DIDIER, E. S.: Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica* 94 (2005); 61-76
8. DIDIER, E. S. – WEISS, L.M.: Microsporidiosis: Current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* (2006); 19; 485-492

9. DIDIER, E. S. – STOVALL, M. E. – GREEN, L. C.: Epidemiology of microsporidiosis: Sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology* (2004);126 ; 145 – 166

10. DIDIER, E. S. – DIDIER, P. J. – FRIEDBERG, D. N. – STENSON, S. M. – DRENSTEIN, J. M. – YEE, R. W. – MO, F. O. – DAVIS, R. M. – VOSSBRINCK, C. – MILLICHAMP, N. – SHADDUCK, J. A.: Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (N- SP), from 3 AIDS patients with keratoconjunctivitis. *Journal of Infectious Diseases* (1991); 163; 617 – 621

11. DIDIER, E. S. – WEISS, L. M.: Microsporidiosis: Not just in AIDS patients. *Current Opinion in Infectious Diseases* (2001);24 ; 490-495

12. FRANZEN, C.: Microsporidia: How can they invade other cells? *Trends Parasitol* (2004); 20; 275-279

13. GASSER, R. B.: PCR – based technology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* 84 (1999); 229 – 258

14. CHABCHOUB, N. – ABDELMALEK, R. – ISSA, S. – KANOUN, F. – CHAABENE BEN, T. – BOURATBINE, A. – AOUN, K .: Contribution of PCR for detection and identification of intestinal microsporidia in HIV infected patients. *Pathologic Biologic* 60 (2012); 91 – 94

15. JÍROVEC, O.: Parasitologie pro lékaře – III. Přepřacované a rozšířené vydání. *Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p.* (1977); ISBN - 08 – 003 – 788; 405

16. KASPER, L. H. – BUZON – GATEL, D.: Some opportunistic infections in AIDS: Candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. *Parasitology Today* (1998); 14; 150-156

17. KOŘÍNKOVÁ, K.: Obecná parazitologie – význam a biologie parazitů. *Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta* (2006); ISBN – 80 – 7044 – 798 – 2; 3 – 5
18. KŘIVÁNKOVÁ, G.: Oportunní paraziti u alkoholiků. Bakalářská práce. zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity. České Budějovice (2011)
19. LANTERNIER, F. – BOUTBOUT, D. – MENOTTI, J. – CHANDESIRIS, M. O. – SARFATI, C. – MAMZER BRUNEEL, M. F. – CALMUS, Y. – MECHAL, F. – VIARD, J. P. – LECUIT, M. – BOUGNOUX, M. E. – LORTHOLARY, O.: Microsporidiosis in solid organ transplant recipient: Two *Enterocytozoon bieneusi* cases and review. *Transplant Infectious Disease* (2009); 1; 83 - 88
20. LI, W. – CAMA, V. – FENG, Y. Y. – GILMAN, R. H. – BERN, C. –ZHANG, X. C. – XIAO, L. H.: Population genetic analysis of *Enterocytozoon bieneusi* in humans. *International Journal For Parasitology* (2012); 3; 287 – 293
21. MEZINÁRDNÍ STATISTICKÁ KLASIFIKACE NEMOCÍ A PŘIDRUŽENÝCH ZDRAVOTNÍCH PROBLÉMŮ (<http://www.uzis.cz/cz/mkn/index.html>)
22. PELIKÁNOVÁ, M: Mikrosporidiové infekce lidí. *Bakalářská práce*. Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice (2009)
23. SAK, B. – KVÁČ, M. – KUČEROVÁ Z. – KVĚTOŇOVÁ, D. – SAKOVÁ, K.: Latent Microsporidial Infection in Immunocompetent Individuals – A Longitudinal Study. *Plos Neglected Tropical Diseases* 5 (2011).
24. SAK, B. – BRADY, D. – PELIKÁNOVÁ, M. – KVĚTOŇOVÁ, D. – ROST, M. – KOSTKA, M. – TOLAROVÁ, V. – HŮZOVÁ, Z. – KVÁČ, M.: Unapparent

- microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology* 49 (2011); 1064-1070
25. SHADDUCK, J. A. – ORENSTEIN, J. M.: Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* (1993); 117; 1215-9
 26. SCHWARTZ, D. A. – VISVESVARA, G. S. – DIESENHOUSE, M. C. – WEBER, R. – FONT, R. L. – WILSON, L. A. – CORRENT, G. – SERDAREVIC, U. N. – ROSBERGER, D. F. – KEENEN, P. C.: Pathologic features and immunofluorescent antibody demonstration of ocular microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) in seven patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J. Ophthalmol* 115 (1993); 285 – 92
 27. SNOWDEN, K. F. – LOGAN, K. – PHALEN, D. N.: Isolation and characterization of an avian isolate of *Encephalitozoon hellem*. *Parasitology* Jul. (2000); 121; 9-14
 28. SMETANOVÁ, R.: Výskyt mikrosporidií u různých skupin pacientů (u dětí). *Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice* (2011)
 29. SULAIMAN, I. M. – FAYER, R. – LAL, A. A.: Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host – adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl. Environ. Microbiology* (2003); 69; 4495 – 4501
 30. THELLIER, M. – BRETON, J.: *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15 (2008)
 31. THOMARAT, F. – VIVARES, C. P. – GOUY, M.: Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin

- of microsporidia and reveals a high frequency of fast – evolving genes. *J. Mol. Evol.* (2004); 59; 780 – 791
32. VOLF, P. – HORÁK, P.: Paraziti a jejich biologie. *Triton*. Praha (2007); ISBN – 978 – 80 – 7387 – 008 – 9; 132
33. WIDMER, G. – AKIYOSHI, D. E.: Host – specific segregation of ribosomal nucleotide sequence diversity in the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi*. *Infect. Genet. Evol.* 10 (2010); 122-8
34. WILLIAMS, B. A.: Unique physiology of host – parasite interactions in microsporidia infections. *Cell Microbiol* 11 (2009); 1551 – 1560
35. YAKOOB, J. – ABBAS, Z. – BEG, M. A. – JACRI, W. – NAZ, S. – KHALID, A. – KHAN, R.: Microsporidial infections due to *Encephalitozoon intestinalis* in non HIV –infected patients with chronic diarrhoea. *Epidemiology and infection* (2012); 10; 1773-79

8. Klíčová slova

Oportunní mikrosporidiózy

Hematologičtí a onkologičtí pacienti

Radioterapie

Chemoterapie

Diagnostika

Keywords

Opportunistic microsporidiosis

Hematologic and oncologic patients

Radiotherapy

Chemotherapy

Diagnostic

9. Přílohy

Vyšetřovací protokol

a) Hematologičtí pacienti

				<i>Encephalitozoon spp.</i>		<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	
pacient	věk	pohlaví	diagnóza	mikroskop	PCR	mikroskop	PCR
1	17	m	D 696	neg	neg	neg	neg
2	10	ž	C 910	neg	neg	neg	poz
3	17	m	D 696	neg	neg	neg	neg
4	11	ž	C 911	neg	neg	neg	neg
5	11	ž	D 696	neg	neg	neg	neg
6	18	m	C 719	neg	neg	neg	neg
7	4	m	C 910	neg	neg	neg	neg
8	7	m	C 910	neg	neg	neg	neg
9	11	m	D 696	neg	neg	neg	neg
10	4	m	D 696	neg	neg	neg	poz
11	4	m	C 910	neg	poz	neg	neg
12	14	m	C 910	neg	neg	neg	neg
13	4	m	D 696	neg	neg	neg	neg
14	4	ž	D 696	neg	neg	neg	neg
15	10	ž	C 719	neg	neg	neg	neg
16	2	m	C 911	neg	neg	neg	neg
17	2	ž	D 696	neg	neg	neg	neg
18	2	ž	D 696	neg	neg	neg	neg
19	4	ž	D 696	neg	neg	neg	neg
20	4	ž	C 910	neg	neg	neg	neg

b) onkologičtí pacienti

				<i>Encephalitozoon spp</i>		<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	
pacient	věk	pohlaví	diagnóza	mikroskop	PCR	mikroskop	PCR
1	36	ž	C 911	neg	neg	neg	neg
2	49	ž	C 911	neg	neg	neg	neg
3	59	ž	C 920	neg	neg	neg	neg
4	20	m	C 911	neg	neg	neg	neg
5	73	m	C 900	neg	neg	neg	poz
6	63	m	C 911	neg	neg	neg	neg
7	65	ž	C 911	neg	neg	neg	neg
8	60	m	C 920	neg	neg	neg	neg
9	59	ž	C 830	neg	neg	neg	poz
10	27	m	C 911	neg	neg	neg	neg
11	59	m	C 920	neg	neg	neg	neg
12	55	ž	C 911	neg	neg	neg	neg
13	71	m	C 838	neg	neg	neg	neg
14	55	m	C 911	neg	neg	neg	neg
15	61	m	C 838	neg	neg	neg	neg
16	59	m	C 900	neg	neg	neg	neg
17	46	ž	C 911	neg	neg	neg	neg
18	75	ž	C 820	neg	neg	neg	poz
19	45	m	C 911	neg	neg	neg	neg
20	70	m	C 920	neg	neg	neg	poz
21	66	m	C 920	neg	neg	neg	neg
22	55	ž	C 911	neg	neg	neg	neg
23	63	m	C 820	neg	neg	neg	poz
24	77	m	C 920	neg	neg	neg	poz
25	73	m	C 920	neg	neg	neg	neg