



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Průběh mikrosporidiózy způsobené novým
genotypem *Encephalitozoon cuniculi*
na experimentálním modelu

Vypracovala: Tereza Votočková
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich CSc.

České Budějovice 2014

Abstrakt

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární paraziti způsobující onemocnění zvané mikrosporidióza. Infekční strategií je spóra – vysoce organizovaná buňka, díky níž dochází infikování hostitele.

Má práce zaznamenává průběh mikrosporidiózy, která je vyvolaná infikováním experimentálního modelu druhem mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi* a to konkrétně genotypem ECIII.

V teoretické části práce je zahrnuto seznámení s mikrosporidii. Jsou v ní obsaženy první záznamy, které započaly zvýšenou pozornost k jejich podrobnějšímu zkoumání. V této části jsou popsány biologické vlastnosti a systematické zařazení mikrosporidií, popis jejich infekčního materiálu, kterým je spóra. Popisu spór a jejich životního cyklu, díky kterému se mikrosporidie dostávají do hostitelského těla, kde se rozmnožují a způsobují onemocnění, se práce zabývá podrobněji. Jsou zmíněny zdroje, způsoby přenosů mikrosporidií a nejčastěji detekované mikrosporidie u lidí, jejichž pozornost je nejvíce věnována právě *Encephalitozoon cuniculi* – jeho historii, vývoji, infekčnímu průběhu u hostitelů, detekci a léčbě.

V praktické části je popsán metodický postup způsobu sledování mikrosporidiózy na experimentálních modelech, kterými byly laboratorní myši imbredního imunokompetentního kmene BALB/c a myši s těžkou kombinovanou deficiencí SCID. Myši byly per orálně nainfikovány spórami druhu *Encephalitozoon cuniculi* kmene ECIII vyizolovaným z pestršky písečné (*Lagurus lagurus*). Průběh infekce byl sledován na základě koprologického vyšetření trusu myší a na základě vyšetření vzorků orgánů. Zpracování jednotlivých vzorků probíhalo za pomoci molekulární diagnostiky v parazitologické laboratoři AV ČR v Českých Budějovicích. DNA z jednotlivých tkání, orgánů a tělních tekutin byla vyizolována pomocí komerčního kitu QIAamp® DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), trus byl zpracováván pomocí komerčně dodávaného kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). Principem bylo rozbití

jednotlivých spór a získání čisté DNA, která byla vhodná k dalšímu zpracování. Následně byla provedena dvoukroková polymerázová řetězcová reakce. Díky této metodě dojde k rychlému zmnožení DNA založenému na principu replikace nukleových kyselin. Následujícím krokem byla gelová elektroforéza, při níž dochází k rozdělení DNA na jednotlivé fragmenty na základě rozdílných molekulových hmotností působením jednosměrného elektrického proudu. Výsledky byly vizualizovány UV transluminátorem při vlnové délce 312 nm, propojeným s počítačem, na kterém byly jednotlivé výsledky pozorovány.

Součástí výzkumu byla léčba albendazolem BALB/c myši. Lék byl perorálně podáván v rozmezí od 28. do 42. dne po infekci.

Získané výsledky o průběhu mikrosporidiózy jednotlivými orgány a tkáněmi, včetně zahrnuté léčby, byly zaznamenány do přehledných tabulek.

V závěru práce je sepsáno shrnutí výzkumu a jeho porovnání s předchozími studiemi. Výsledky poukázaly na to, že mikrosporidie mohou být hrozbou nejenom pro lidi trpící imunodeficiencí, ale díky jejich úspěšnému přežití v orgánech imunokompetentních hostitelů a jejich schopnosti aktivace z nedetekovatelné hladiny, zdůrazňují nebezpečí latentní mikrosporidiózy jako rizikový faktor život ohrožující skupiny osob podstupující chemoterapii nebo transplantaci orgánů, kdy pacienti mohou získat infikovaný štěp od dárce.

Abstract

Microsporidia are obligate intracellular parasites causing disease called microsporidiosis. The infectious strategy is a spore - a highly organized cell which gives a rise to the infection of the host.

This bachelor thesis records the progress of microsporidiosis provoked by the infection of the experimental model of the species of microsporidia *Encephalitozoon cuniculi*, namely of the genotype ECIII.

The theoretical part includes the familiarization with microsporidia. In this part, there are first records leading to paying more attention to them and initiating their closer examination. This section describes both the biological characteristics and the systematic categorization of microsporidia and the description of a spore as the infectious stage of life cycle, which enables get into the host body where microsporidia reproduce and cause diseases. The sources of microsporidia are mentioned as well as the ways of transmission and microsporidia species most commonly detected in human whose attention is devoted mainly to *Encephalitozoon cuniculi* - its history and development, the infectious progress in hosts, the detection, and the treatment.

The practical part describes the methodical process of the way of monitoring of microsporidiosis on experimental models in a form of laboratory mice of inbred immunocompetent BALB/c and the mice with severe combined immunodeficiency SCID. The mice were orally infected with spores of *Encephalitozoon cuniculi* genotype ECIII, which was isolated from steppe lemming (*Lagurus lagurus*). The progress of infection was monitored both on the basis of coprological examination of mouse feces and on the basis of the examination of tissue and body fluid samples. The processing of individual samples was carried out with the aid of molecular diagnostics in the parasitological laboratory AV ČR in České Budějovice. The DNA from individual tissues and body fluids was isolated by using a commercially supplied kit, QIAamp® DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), the feces were treated with a commercially

supplied QIAamp ® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). The principle was to destroy the individual spores and to obtain the pure DNA which was suitable for further processing. Subsequently, the two-step polymerase chain reaction was carried out, providing rapid multiplication of DNA. The next step was a gel electrophoresis which arouses the division of the DNA into individual fragments on the basis of different molecular weights due to the effect of unidirectional electrical current. The fragments were visualized by UV transilluminator at a wavelength of 312 nm linked to a computer.

The part of the research was the albendazole treatment of BALB/c mice. The drug was orally administered in the range from 28th to 42nd day after the infection.

The results on progress of microsporidiosis through various organs and tissues, including the involved treatment, were recorded in well arranged tables.

At the end of this bachelor thesis, there is a summary of the research and its comparison with previous studies. The results showed that microsporidia may be a threat not only for people suffering from immune deficiency, but thanks to their successful survival in the organs of immunocompetent hosts and their ability of activation from the undetectable level, they emphasize the danger of latent microsporidiosis as a risk and life-threatening factor for groups of people undergoing chemotherapy or organ transplantation where the patients can receive inflected graft from a donor.

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 i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2014

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D., RNDr. Michaele Kotkové, Dis. a vedoucímu práce doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za odborné vedení práce a cenné rady.

Obsah

Abstrakt	2
Abstract	4
ÚVOD	10
1. SOUČASNÝ STAV	11
1.1. MIKROSPORIDIE	11
1.2. BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI A SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ	11
1.3. ŽIVOTNÍ CYKLUS	12
1.3.1. PROCES GERMINACE	13
1.4. MIKROSPORIDIÓZA	15
1.4.1. PŘENOS A ZDROJE MIKROSPORIDIOVÉ INFEKCE	15
1.4.1.1. MIKROSPORIDIE ČLOVĚKA	15
1.4.1.2. ZVÍŘATA JAKO ZDROJ MIKROSPORIDIÍ	16
1.4.1.3. VODA	17
1.4.1.4. POTRAVINY	17
1.4.1.5. HMYZ	18
1.4.2. NEJČASTĚJI DETEKOVANÉ DRUHY MIKROSPORIDIÍ U LIDÍ .	19
1.4.2.1. <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	19
1.4.2.2. <i>Encephalitozoon</i> spp.	19
1.4.2.2.1. <i>Encephalitozoon hellem</i>	19
1.4.2.2.2. <i>Encephalitozoon intestinalis</i>	20
1.5. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	20
1.5.1. INFEKCE <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	22
1.6. LÉČBA MIKROSPORIDIÓZY	23
1.7. DETEKCE SPÓR MIKROSPORIDIÍ	24
1.7.1. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	24
1.7.2. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	25
2. CÍLE PRÁCE	26
3. MATERIÁL A METODY	27

3.1. EXPERIMENTÁLNÍ MODEL	27
3.1.1. SCID (severe combined immunodeficiency).....	27
3.1.2. BALB/c.....	27
3.2. SPÓRY MIKROSPORIDIÍ	28
3.3. LÉČBA BALB/c MYŠÍ.....	28
3.3.1 LÉČIVO.....	28
3.4. INFEKCE SCID A BALB/c MYŠÍ.....	28
3.5. SLEDOVÁNÍ PRŮBĚHU MIKROSPORIDIÓZY	28
3.5.1. SBĚR TRUSU	29
3.5.1.1. POSTUP IZOLACE DNA Z TRUSU	29
3.5.2. ODBĚR VZORKŮ ORGÁNŮ A TKÁNÍ.....	30
3.5.2.1. POSTUP IZOLACE DNA Z TKÁNÍ.....	31
3.5.3. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	32
3.5.4. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	33
3.5.4.1. POSTUP PŘÍPRAVY GELU	34
3.5.4.2. APLIKACE VZORKŮ DO GELU	34
4. VÝSLEDKY	35
4.1. PRŮBĚH MIKROSPORIDIÓZY U SCID MYŠÍ	35
4.2. PRŮBĚH MIKROSPORIDIÓZY U BALB/c MYŠÍ.....	37
4.3. PRŮBĚH MIKROSPORIDIÓZY U BALB/c MYŠÍ PO LÉČBĚ ALBENDAZOLEM.....	40
5. DISKUZE	42
6. ZÁVĚR	47
7. KLÍČOVÁ SLOVA	48
8. SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ	49

ÚVOD

Mikrosporidie jsou obligátní, intracelulární parazité, způsobující onemocnění zvané mikrosporidíóza u téměř všech živočišných druhů. Mezi nejčastěji napadané jedince řadíme ty, jejichž imunitní systém selhal, či je nějakým způsobem oslaben. Jedná se především o HIV pozitivní jedince, dále pacienty po transplantaci orgánů, nebo osoby s idiopatickou CD4⁺ T- lymfocytopenií.

Cílem mé práce bylo sledovat a zaznamenat průběh mikrosporidíózy jednotlivými orgány a tkáněmi na experimentálním modelu. Infekce byla vyvolaná druhem mikrosporidií - *Encephalitozoonem cuniculi*, a to konkrétně genotypem ECIII.

1. SOUČASNÝ STAV

1.1. MIKROSPORIDIE

Mikrosporidie jsou jednobuněční, intracelulární paraziti, kteří jsou zařazeni do samostatného kmene Microsporidia.¹ Tento kmen zahrnuje přibližně 1200 druhů. Tyto druhy jsou známé jako patogeny širokého spektra obratlovců i bezobratlých organismů.²

První zprávy o mikrosporidiích pocházejí z poloviny 19. století, kdy jejich přítomnost u housenek bource morušového (*Bombyx mori*) ohrozila evropský průmysl hedvábí vyvoláním onemocnění zvané „pébrina“. V roce 1857 byl původce tohoto onemocnění pojmenován švýcarským botanikem Nägelim jako *Nosema bombycis*.³ Následnou studií těchto parazitů byla zjištěna jejich přítomnost i u dalších živočichů např. u ryb, domácích i divokých zvířat, hmyzu – jako jsou včely, sarančata a pod.³

Mikrosporidioza u lidí byla poprvé zaznamenána v roce 1959, dramatický nárůst nastal v 70. letech, kdy došlo ke zvyšování počtu jedinců se sníženou imunitou, a to hlavně v důsledku pandemie virové lidské imunitní nedostatečnosti (HIV).³ Mezi nejčastější mikrosporidie u lidí patří *Enterocytozoon bieneusi*, který byl jako první popsán jako gastrointestinální parazit. V následujících letech bylo zaznamenáno celkem sedm rodů mikrosporidií parazitujících u člověka a byly zařazeny mezi oportunní patogeny – infikují tedy hlavně jedince se sníženou imunitou – např. pacienty po transplantaci orgánů, HIV pozitivní jedince a pacienty s protinádorovou terapií.⁴

1.2. BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI A SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ

Mikrosporidie byly díky jednoduchosti své struktury zařazeny mezi primitivní eukaryota. Obsahují jádro ohraničené jaderným obalem, endomembránový systém, cytoskelet. Zároveň ale vykazují molekulární a biologické znaky prokaryot, které zahrnují vlastnosti translačního aparátu, velikost genomu (který je bakteriálního

rozsahu), nepřítomnost mitochondrií, peroxisomů a typického Golgiho aparátu.² Profesor Thomas Cavalier-Smith je zařadil do říše Archezoa, která zahrnuje všechny ostatní amitochondriální organismy. Později ale bylo zjištěno, že mikrosporidie mají společné znaky s houbami a to díky nálezů proteinů, které mají mitochondriální původ, např. proteinu Hsp70. Dalšími znaky podobnosti s houbami je přítomnost chitinu a trehalózy, zároveň nepřítomnost bičků a dalších 9+2 mikrotubulárních struktur.^{3,5}

„Mikrosporidie“ je netaxonomické označení, které popisuje skupinu organismů zahrnující kmen *Microsporidia*.⁶

1.3. ŽIVOTNÍ CYKLUS

Ústředním bodem infekční strategie mikrosporidií je spóra – samostatná, vysoce organizovaná buňka.³ Jsou také klíčem k identifikaci jednotlivých kmenů.⁷

Velikost spór se pohybuje v rozmezí od $2,5 \times 1,5 \mu\text{m}$ až $20 \times 6 \mu\text{m}$ – spóry nalezené u infikovaných savců jsou obvykle $1 - 3 \mu\text{m}$ velké.⁸ Jejich tvar je často kulový, vejcovitý, tyčovitý, popř. tvaru půlměsíce.³

Obal spóry je složen ze tří vrstev – z jednoduché plazmatické membrány a dvou extracelulárních membrán. Na povrchu je tzv. exospóra, složená z elektron-denzní proteinové vrstvy. Vnitřní část stěny je tvořena chitinem a je nazývána endospórou.⁶ Funkcí obalu je chránit sporoplazmu – infekční materiál mikrosporidie – neboli „cytoplazmu spóry“, která je tvořena jádrem, ribozomy, zadní vakuolou a vystřelovacím aparátem, který zahrnuje polaroplast a pólovou trubici. Polaroplast je organela tvořená k sobě těsně přiloženými vrstvami membránových lamel a vezikul.³ Pólová trubice leží stočená uvnitř spóry.⁶

Životní cyklus mikrosporidií zahrnuje proliferační fázi, fázi produkce spór a infekční fázi.⁸

Infekční spóra má jednoduchou strukturu, její funkcí je přenos sporoplazmy do hostitelské buňky pomocí vystřelovacího aparátu.⁶

Proliferační fáze je charakterizovaná tvorbou merontů, vznikající přeměnou sporoplazmy uvnitř napadené buňky, kde dochází k jejich rozmnožování buď binárním nebo několikanásobným množením. Často dochází k vícenásobnému dělení jádra před dělením samotné buňky, čímž dochází ke vzniku mnohojaderných plazmodiálních buněk, tento proces je nazýván merogonií.⁶

Další vývojovou fází mikrosporidiální spóry je sporont, který vzniká z merontů a je charakteristický přítomností vzniklé elektron-denzní proteinové vrstvy na povrchu. Následnou karyokinezí a cytokinezí sporontů vznikají formy zvané sporoblasty. Představují zralé stádium spór připravené k infikování nových buněk, které následuje po prasknutí cytoplazmatické membrány hostitelské buňky a uvolnění infekčních spór, jež mohou zahájit nový životní cyklus.⁶

1.3.1. PROCES GERMINACE

Klíčení spóry závisí na životním prostředí, ve kterém se pohybuje – zahrnující fyzikální a chemické stimuly jako je změna pH, přítomnost anionů, kationů, vystavení ultrafialovému záření nebo peroxidům.³

Prvním signálem toho, že je spóra připravená ke germinaci je zvýšení osmotického tlaku uvnitř spóry. Ten vzniká na základě několika teorií.⁸

Jedna z prvních teorií byla jednoduše založená na zvýšení propustnosti membrán spóry v důsledku její aktivace.⁸

Další z teorií hovoří o vytvoření protonového gradientu. Přenos iontů je zajišťován pomocí ionoforu, což je organická sloučenina umožňující přenos iontů

přes membránu. Protony jsou přenášeny ven ze sporoplazmy, a tím se vytváří alkalické prostředí uvnitř spóry, které zapříčiňuje zvýšení osmotického tlaku uvnitř spóry pronikáním vody skrz membránu. Je nutné poznamenat, že ne všechny mikrosporidie vyžadují alkalické pH prostředí.^{8,9}

Nejvýznamnější z teorií je založená na základě degradace disacharidu trehalózy na monomery glukózy v zadní vakuole, tato reakce dá za vznik zvýšení osmotického tlaku.¹

Důsledkem zvýšení osmotického tlaku každé z těchto teorií, je zvětšování objemu zadní vakuoly a jejímu následnému prasknutí v nejtenčím místě – na apikálním vrcholu. Zároveň dochází k vystřelení pólové trubice ven ze spóry.^{1, 10}

Pólová trubice je unikátní strukturou mikrosporidií, díky níž dochází k infikování hostitelských buněk.¹¹

Před přenosem je trubice schovaná stočená uvnitř spóry, přičemž počet a uspořádání závitů pólové trubice je druhově specifický. Díky změnám osmotického tlaku dochází k vystřelení trubice, jejíž délka následně celkově činí přibližně 50–500 µm. Vystřelení trubice do hostitele trvá přibližně 2 s a dosahuje rychlosti až 100 µm/s. Její vlastnosti a struktura jsou shodné u všech mikrosporidií bez rozdílu druhu, hostitele či geografické polohy.³

Po proniknutí trubice do buňky je sporoplazma vytlačena přímo do cytoplazmy hostitele, kde mikrosporidie zahájí svůj životní cyklus a to buď volně v cytoplazmě, nebo prodělají svůj vývoj v tzv. parazitoformní vakuole, což je označení samostatného kompartmentu uvnitř buněk, který obsahuje vznikající parazity - od okolí je oddělena membránou.¹² Jejím zvětšováním utlačuje hostitelské jádro, orgány i cytoskelet do té doby, dokud tlak v buňce není natolik velký, že buňka i parazitoformní vakuola prasknou – tento způsob vývoje může trvat až několik dní.¹³ Vývoj v parazitoformní vakuole

probíhá u mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*, naopak vývoj volně v cytoplazmě prodělává např. rod *Enterocytozoon*.¹

1.4. MIKROSPORIDIÓZA

Termínem mikrosporidióza je označováno onemocnění způsobené mikrosporidii.¹⁴

1.4.1. PŘENOS A ZDROJE MIKROSPORIDIOVÉ INFEKCE

Několik stovek druhů mikrosporidií je příčinou vzniku onemocnění jak u obratlovců, tak bezobratlých živočichů.¹⁵

Jednotlivé spóry mikrosporidií jsou uvolňovány do životního prostředí prostřednictvím trusu, moče, respiračními sekrety. Zdrojem infekce mohou být infikované osoby a zvířata.

1.4.1.1. MIKROSPORIDIE ČLOVĚKA

Mikrosporidie byly jen zřídka známy jako příčina nemocí u člověka do té doby, než došlo k expanzi výskytu lidí s onemocněním AIDS.¹⁶ Bylo ohlášeno několik set případů s chronickým průjmem u lidí, kteří byli HIV pozitivní – jednalo se o pacienty, kteří byli imunodeficientní a propuknutí mikrosporidiózy bylo vyvoláno díky oslabení jejich organismu. Mikrosporidie byly ovšem detekovány i u lidí, kteří byli HIV negativní, jednalo se převážně o pacienty, jejichž imunitní systém byl, díky prodávajícímu onemocnění, oslaben, popř. u pacientů prodávajících imunosupresivní terapii po transplantaci.²

Nákaza pravděpodobně pochází z jídla nebo vody obsahující spóry. Mikrosporidie byly nalezeny ve vzorcích podzemních a povrchových vod, včetně vod využívaných k zavlažování plodin jako jsou jahody, hlávkový salát, petržel a pod.^{17,18}

Infekce je detekována v dýchacím a zažívacím traktu jedinců, horizontální přenos mezi jedinci je proto nejčastěji fekálně–orální cestou, díky vylučování spór stolicí a močí. Kvůli tomuto přenosu patří mezi nejčastěji infikované lidé homosexuální a drogově závislí – jejichž způsob užívání drog je nitrožilní, popř. lidé, kteří se dostanou do styku s kontaminovanou vodou.⁶

Vertikální přenos prozatím nebyl u člověka prokázán. Transplacentární přenos z matky na plod byl zaznamenán pouze u primátů a hlodavců.¹⁹

1.4.1.2. ZVÍŘATA JAKO ZDROJ MIKROSPORIDIÍ

Přenos mikrosporidií mezi zvířaty a člověkem je označován jako přenos zoonotický.²⁰

Prvním prokázaným případem zoonotického přenosu byla desetiletá dívka, která byla v úzkém kontaktu se štěňaty, která byla infikovaná *Encephalitozoon cuniculi* – spóry mikrosporidií byly nalezeny v renálních tubulech feny, a ve zvýšené koncentraci také v moči štěňat. Sérologickým vyšetřením se u dívky potvrdila nákaza mikrosporidiemi.²¹

Díky rezistenci spór v různých životních podmínkách – jako je voda, sucho, změny teplot – je přenos mezi zvířaty a lidmi více rozmanitý než se očekávalo. Přenos probíhá v důsledku vystavení vodě či potravinám kontaminovaných trusem nebo močí zvířete, nebo aerosolům.²²

1.4.1.3. VODA

Kontaminace vody spórami mikrosporidií je jednou z největších příčin přenosu infekce, a to především díky tomu, že jednotlivé druhy mikrosporidií nejsou, co se týče hostitelů, příliš specifické. Spóry jsou vylučovány močí a trusem infikovaných jedinců do vody, a tím se kontaminovaná voda stává zdrojem přenosu infekce.²³

Jednotlivé spóry jsou vůči okolnímu prostředí velice odolné, a proto mohou ve vodě přežít poměrně dlouhou dobu. Jsou rozměrově velmi malé – díky tomu velice snadno prochází přes filtry, které slouží k čištění vody.²³

Rizikové faktory jsou tedy spojené s vystavením se vodě při rekreačním koupání, ve vířivce, vaně, i samotné pití vody.²⁴

Mezi nejčastější druhy mikrosporidií, které se v kontaminované vodě nacházejí, se řadí *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon intestinalis*.²⁰

1.4.1.4. POTRAVINY

Mikrosporidie patří mezi parazity přenášené potravou v důsledku globalizace potravin, díky níž dochází k rychlejšímu transportu potravin, která zároveň zahrnuje i vyšší množství konzumujících spotřebitelů.²⁵

Příčina kontaminace potravin souvisí s jejím oplachováním kontaminovanou vodou – jedná se převážně o salátovou zeleninu a ovoce, na které se po umytí kontaminovanou vodou v domácnosti parazit přenese. Příkladem je přenos infekce *Encephalitozoon intestinalis*, který byl prokázán ve vodě určené k zavlažování plodin. Dále je kontaminace zapříčiněna používáním chlévské mrvy od infikovaných domácích zvířat jako hnojiva, díky které je potravina znečištěna.^{25, 28}

Nelze opomenout i důležitost správného opracování masa, neboť konzumování syrového, špatně tepelně zpracovaného a nedostatečně osoleného masa, zvyšuje riziko přenosu infekce. Toto tvrzení bylo potvrzeno po nález *Enterocytozoon bieneusi* u prasat, což způsobilo vznik mikrosporidiózy u HIV pozitivního pacienta, který minimálně jednou měsíčně konzumoval nesprávně tepelně opracované vepřové maso.^{25, 26}

Příčinou infekce u lidí je také maso rybí, které je infikované rodem *Pleistophora*. Morfologicky podobný tomuto rodu je druh *Trachipleistophora hominis*, identifikovaný jako původce myositis u HIV pozitivního pacienta.²⁷

Mikrosporidie byly prokázány u HIV pozitivního člověka, nakaženého hovězím masem, a to opět v souvislosti s nesprávně tepelným opracováním.²⁴

1.4.1.5. HMYZ

Důkaz, že přenos infekce je možný i díky hmyzu, byl prokázán u komárů, kteří jsou přirozenými hostiteli druhu *Brachiola* (syn. *Nosema*) *algerae*. I když se nepodařilo na zvířecím modelu vyvolat systémovou infekci, došlo k dostatečnému rozvoji infekce lokální, díky intravenóznímu nebo perorálnímu nakažení jedince, a to v ocase, nohou nebo v uších těchto hostitelů. Nedávno byla také popsána myositida u pacienta trpících diabetem s revmatoidní artritidou, vyvolaná tímto patogenem. Tento nález prokázal, že parazit může u lidí způsobit hluboké infekce tkání.^{20, 29}

Epidemiologické studie prokázaly nakažení HIV pozitivních pacientů mikrosporidiózou po bodnutí včelou, sršněm nebo vosou, čímž se potvrzuje možnost přenosu infekce pomocí hmyzu.³⁰

1.4.2. NEJČASTĚJI DETEKOVANÉ DRUHY MIKROSPORIDIÍ U LIDÍ

1.4.2.1. *Enterocytozoon bieneusi*

Enterocytozoon bieneusi patří do rodu *Enterocytozoon*, který spadá do čeledi Enterocytozoonidae. Do této čeledi spadá také rod, jenž je parazitem ryb - *Nucleospora*, která zahrnuje druh *Nucleospora salmonis*, intranukleární mikrosporidii lososovitých ryb, a *Nucleospora secunda* - parazita teplovodních afrických ryb.^{2,31}

Enterocytozoon bieneusi patří mezi nejčastější původce mikrosporidiových infekcí člověka. Byl poprvé popsán v roce 1985 jako střevní oportunní patogen u HIV pozitivního pacienta se symptomem chronického průjmu. V následujících desetiletích počet nahlášených případů infekce tímto parazitem neustále rostl téměř ve všech částech světa. Infekce postihuje jak osoby imunodeficientní, tak i imunokompetentní.^{22, 32, 33}

1.4.2.2. *Encephalitozoon spp.*

Rod *Encephalitozoon* patří do čeledi Encephalitozoonidae. Druhy *E. cuniculi*, *E. hellem* a *E. intestinalis* vyvolávají onemocnění lidí.²

1.4.2.2.1. *Encephalitozoon hellem*

Encephalitozoon hellem je parazit, který způsobuje infekce v dýchacím, močovém a pohlavním ústrojí u imunokompromitovaných jedinců. Tyto infekce způsobují nekrotizující tracheobronchitidy, prostatitidy, intersticiální nefritidy a ulcerózní cystitidy.³⁴

Cesta přenosu infekce mezi lidmi je nejčastěji vzduchem - parazit byl izolován ze sputa, nosní sliznice a moče infikovaného jedince, který se stává zdrojem infekce. Dále může docházet orální nebo oční autoinokulací kontaminovanými prsty.²

Encephalitozoon hellem patří mezi parazity, jejichž běžným hostitelem jsou ptáci – a to hlavně papoušci, dále kolibříci, pštrosi nebo holubi. Zvířecím hostitelům mikrosporidie způsobují ledvinové a těžké střevní infekce.²

Na molekulární úrovni bylo rozlišeno pět genotypů (1A, 1C, 1D, 2B, 2C), které mají nízkou hostitelskou specifitu a byly nalezeny jak u ptáků, tak u člověka.⁴³

1.4.2.2. *Encephalitozoon intestinalis*

Encephalitozoon intestinalis je druhým nejčastějším druhem mikrosporidií napadajícím člověka. Tento druh je převážně detekován u lidí trpících chronickým průjmem a to v enterocytech, dále jej můžeme nalézt jako patogena infikujícího makrofágy v lamina propria, endoteliální buňky lamina propria, epiteliální buňky žlučových cest, tubulární buňky ledvin, bronchiální a nosní epiteliální buňky.⁶

Encephalitozoon intestinalis byl dále nalezen i u domácích zvířat (krav, koz, prasat, krůt) a narozdíl od ostatních druhů rodu *Encephalitozoon*, u kterých bylo identifikováno více druhů genotypů, nebyly na molekulární úrovni zjištěny žádné rozdíly mezi izoláty pocházejícími od zvířat a od lidí, což naznačuje široké hostitelské spektrum tohoto druhu mikrosporidie.⁴⁴

1.5. *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi byl poprvé detekován v roce 1922 u paralyzovaných králíků, kde byl izolován z míchy, mozku a ledvin. Následně byl pojmenován Constantinem Levaditim v roce 1923.³⁵

Patří mezi parazity, vyvolávající onemocnění u širokého spektra svých hostitelů, zahrnující hlodavce, šelmy, primáty, ptáky a samozřejmě lidi, u těch byla infekce poprvé popsána v roce 1959, izolována z mozkomíšního moku devítiletého japonského chlapce, který trpěl neurologickým onemocněním vyznačujícím se zvracením, křečemi,

bolestmi hlavy a horečkou – byla to vůbec první mikrosporidiová infekce detekovaná u člověka a zároveň první mikrosporidie úspěšně převedená do buněčné kultury ze savce, což zajistilo vývoj diagnostických metod a významné studium experimentálních infekcí laboratorních zvířat.^{36, 6}

Na základě imunologických a molekulárních metod byla zaznamenána existence čtyř genotypů. Genotyp I byl izolován a kultivován z králíků, genotyp II byl popsán u myši a polárních lišek, genotyp III byl nalezen u domestikovaných psů a genotyp IV u člověka po transplantaci ledvin. Genotypy I–III nejsou striktně hostitelsky specifické a přirozené infekce byly detekovány u hlodavců, zajíců, šelem, přežvýkavců a primátů. Tabulka I. znázorňuje rozšíření parazita po celém světě. Všechny tři zvířecí genotypy byly postupně nalezeny i u člověka - a to převážně u lidí imunodeficientních, např. HIV pozitivních, po transplantaci orgánů, či osob s idiopatickou CD4+ T-lymfocytopenií - což dokazuje, že jednotlivé kmeny nejsou striktně závislé na jednom hostiteli.³⁷

Tabulka I.: Hlavní hostitelé a geografické rozšíření *Encephalitozoon cuniculi*.²

genotyp	hostitel	území
<i>E. cuniculi</i> - genotyp I.	králík člověk	Švýcarsko, USA, Německo, Itálie, Japonsko, Austrálie Švýcarsko, Itálie, USA
<i>E. cuniculi</i> - genotyp II.	myš krysa arktická liška	Česká republika, Anglie, USA Švýcarsko Norsko, Finsko
<i>E. cuniculi</i> - genotyp III.	pes poloopice	USA, jižní Afrika USA, jižní Afrika
<i>E. cuniculi</i> - genotyp IV.	člověk	Francie

Vývoj *Encephalitozoon cuniculi* probíhá intracelulárně v parazitoformní vakuole, všechna stádia během vývoje mají jednoduché jádro. Meronti se zdržují v blízkosti vakuoly a jejich tvar je zaoblený či oválný, popř. jinak nepravidelný a jejich velikost se nachází v rozmezí 2,0–6,0 × 1,0–3,0 μm. Sporonti jsou uvnitř vakuoly, kde

se postupně shlukují ve sporoblasty v procesu sporogonie, ta většinou probíhá jako tzv. bisporoblastická – tzn., že vznikají dva sporoblasty, ale je známa i tetrablastická. Rozměry spóry jsou $2,0\text{--}2,5 \times 1,0\text{--}1,5 \mu\text{m}$.⁶

Infekční spóry jsou do prostředí uvolňovány stolicí, močí a sputem. Přenos parazita je tedy převážně ingescí, popř. inhalací. V úvahu musíme vzít i přenos parazita sexuální cestou, který byl naznačen přítomností v močových cestách nebo prostatě. Transplacentární přenos z matky na dítě nebyl prokázán.³⁸

1.5.1. INFEKCE *Encephalitozoon cuniculi*

Prvním místem infekce jsou nejčastěji enterocyty tenkého střeva, odkud je parazit rozptýlen do dalších orgánů a tkání – epiteliální tkáň, dýchací cesty a pod.⁶

E. cuniculi má schopnost přetrvávat v hostitelském organismu i přes jeho aktivovanou imunitní odpověď. Latentní infekce přetrvává dokud je poměr množení parazita a imunitní odpověď hostitele vyrovnaný. Buněčná odpověď u člověka závisí na množství CD4+ T-lymfocytů - jejich deficience je rozhodující pro rozvoj symptomatické fáze infekce – tento rozvoj můžeme pozorovat u HIV pozitivních, lidí se sníženou imunitní odpovědí (dětí, senioři) či jinak imunodeficientních jedinců, kdy dochází ke vzniku klinických manifestací, které zahrnují střevní, oční, svalová a systematická onemocnění - keratokonjunktivitidu, bronchiolitidu, sinusitidu, nefritidu, ureteritidu, cystitidu, prostatitidu, hepatitidu, aj. - projevující se průjmem, zvracením, bolestmi hlavy a pod. U zdravého člověka je množství CD4+ T-lymfocytů v 1 μl krve přibližně 500 – 1200. Bylo zjištěno, že u HIV pozitivních pacientů se komplikační rizika zvyšují, mají-li v 1 μl krve méně než 100 CD4+ T-lymfocytů.^{6, 39, 48}

Ochranná imunita proti mikrosporidiím je zprostředkována pomocí cytotoxických CD8+ T-lymfocytů, efektorových buněk imunitního systému, na jejichž počtu závisí celkové úspěšné zvládnutí infekce. Tyto T-lymfocyty dokáží hostitele

ochránit před intraperitoneální i perorální infekcí tím, že zabraňují množení mikrosporidií za pomoci cytotoxické T-lymfocytární odpovědi, kde hrají hlavní roli efektorových zabíjecích buněk. Produkují cytokiny, což jsou základní regulátory imunitního systému sekretované leukocyty a působící prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj. U mikrosporidiové infekce se uplatňují převážně prozánětlivé cytokiny tumor nekrosis factor(TNF), interferon gamma (INF γ), popř. interleukin 12 (IL-12).^{45, 47, 49}

Při infekci *Encephalitozoon cuniculi* je cytokin IL-12 produkován makrofágy a dendritickými buňkami. Aktivuje NK buňky a $\gamma\delta$ T-lymfocyty k produkci cytokinu INF γ , bez jehož přítomnosti by nedošlo k rozvoji cytotoxické T-lymfocytární odpovědi.⁴⁹

Cytotoxické T-lymfocyty jsou schopny v infikovaném místě rozpoznávat infikované buňky pomocí specifického receptoru (TCR), který se váže na komplex histokompaktibilního komplexu I. (MHC I) s navázaným antigenem *Encephalitozoonu cuniculi*. Takto označené buňky jsou identifikovány a následně usmrceny granulami, obsahujícími perforiny a granzymy. Perforin je protein schopný vytvářet póry v cytoplazmatické membráně, tyto póry fungují jako vstup pro granzym, což je enzym, který aktivuje kaspázy – enzymy, vyvolávající kaskádu reakcí, které zahajují apoptózu buňky.^{47,49}

1.6. LÉČBA MIKROSPORIDIÓZY

V současné době jsou k dispozici dva léky, které se využívají k léčbě mikrosporidiózy u lidí a zvířat.⁴⁰

Albendazol je širokospektrální antiparazitikum ze skupiny benzimidazolů, který slouží jako inhibitor polymerace tubulinu v těle parazita, což vede k rozvratu metabolismu a jeho následné smrti. Má protihlístovou a antifungální aktivitu. Tento lék

je účinný proti druhům *Encephalitozoon*, které infikují savce (včetně člověka) – zlepšuje příznaky onemocnění a plynule likviduje infekci v jednotlivých orgánech. U parazita *Enterocytozoon bieneusi* z čeledi Enterocytozoonidae byl zpočátku albendazol pokládán za účinný, ale následující výzkumy vyvrátily tuto domněnku.^{40,41}

Druhým léčivem je fumagillin, který byl izolován v roce 1951 jako sekundární produkt plísně *Aspergillus fumigatus*. Ze začátku našel uplatnění jako antibiotikum k tlumení prvoka *Nosema apis*, který je příčinou tzv. včelí nemoci – nosematózy. Současně je tento lék účinný i v léčbě mikrosporidiózy – nejprve byl použit u HIV pozitivních pacientů k vyléčení keratokonjunktivitidy - následně se využíval k léčbě mnoha dalších pacientů, kteří byli díky tomu vyléčení. Byl také zaznamenán jako vysoce účinným proti *Enterocytozoon bieneusi*, avšak u některých pacientů způsobil vznik vedlejších účinků v podobě trombocytopenie či neutropenie.^{41, 42}

1.7. DETEKCE SPÓR MIKROSPORIDIÍ

1.7.1. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je nejrozšířenější metodou tzv. DNA-diagnostiky. Principem metody je, že k testované DNA se přidá synteticky vyrobená část genu, kde se očekává mutace (tzv. primer). Zahřátím na 95°C dojde k oddělení řetězců dvouvláknové šroubovice DNA od sebe. Následuje ochlazení na 40 - 65°C, u kterého dojde k procesu hybridizace, která zahrnuje přiložení primerů ke komplementární části řetězce sledované DNA. Další částí reakce je prodlužování řetězce primeru podle předlohy, kterou tvoří sledovaná DNA, tuto reakci zajišťuje enzym DNA-polymeráza. Díky tomuto procesu dochází ke zmnožení požadovaného genu, který je poté možný detekovat. Detekce je možná po rozdělení polynukleotidům v agarózovém gelu elektroforézou.⁴⁶

1.7.2. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Gelová elektroforéza je separační metodou, která slouží k analýze nukleových kyselin a proteinů.⁵⁴

Principem metody je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě – díky rozdílným rychlostem pohybu molekul DNA v gelu, které jsou nepřímo úměrné velikosti molekuly DNA, můžeme separovat jednotlivé molekuly DNA. Provádí se na vhodném nosiči – nejčastěji gelu tvořeném agarózou.⁵⁴

2. CÍLE PRÁCE

1. *Encephalitozoon cuniculi* genotypem III infikovat experimentální modelová zvířata.
2. Zaznamenat průběh mikrosporidie u experimentálního modelu - šíření mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* jednotlivými orgány a zjistit jejich přítomnost či nepřítomnost v trusu.
3. Popsat průběh infekce a srovnat jej s průběhem infekce jiných izolátů.
4. Provést léčbu pomocí albendazolu u infikovaných BALB/c myší.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

Ke studiu průběhu mikrosporidiózy byly vybrány imbrední imunokompetentní myši kmene BALB/c a myši SCID s těžkou kombinovanou imunodeficiencí. Myši byly chovány za standardních podmínek sterilního prostředí v IVC (Air Handling Solutions; Technoplast, Italy) s HEPA filtry (high efficiency particulate air filter) ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. v Českých Budějovicích. Krmeny byly sterilní komerční směsí značky TOP – VELAZ Praha a napájeny sterilní vodou.

3.1.1. SCID (severe combined immunodeficiency)

SCID myši se vyznačují autozomálně recesivní mutací, vykazují závažný kombinovaný imunodeficit ovlivňující B i T – lymfocyty. Myši mají normální NK buňky, makrofágy i granulocyty, nevyvíjejí adaptivní imunitu. Přirozená složka imunity není u myší poškozena.

K tomuto pokusu byly využity samice 7 - 9 týdnů staré, vlastního chovu Parazitologického ústavu, Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. v Českých Budějovicích.

3.1.2. BALB/c

BALB/c myši patří mezi nejvyužívanější imunokompetentní kmeny imbredních myší, vyznačujících se produkcí monoklonálních protilátek po jejich imunizaci.

Pro tento pokus byly použity samice 7 - 9 týdnů staré - Charles River, Germany, distributor AnLab ČR.

3.2. SPÓRY MIKROSPORIDIÍ

K pokusu byly použity spóry druhu *Encephalitozoon cuniculi* kmene ECIII, který byl izolován z pestrušky písečné (*Lagurus lagurus*).

3.3. LÉČBA BALB/c MYŠÍ

Skupině imunokompetentních BALB/c myší bylo denně po dobu 14 dní (v rozmezí od 28. – 42. dne po infekci) perorálně podáváno léčivo. Pro jednu myš činil objem dávky 200 μ l. Tento objem obsahoval 0,18 mg albendazolu, který byl rozpuštěn ve vodě. Aplikování dávky bylo za použití jícnové sondy.

3.3.1 LÉČIVO

Léčba mikrosporidie byla prováděna aplikováním léku Aldifal (MEVAK NITRA, SR), který obsahuje v 1000 ml 100 g albendazolu.

3.4. INFEKCE SCID A BALB/c MYŠÍ

SCID a BALB/c myši byly infikovány mikrosporidii perorálním způsobem pomocí jícnové sondy v dávce 1×10^7 spor v 0,2 ml vody na myš. Myši byly následně chovány ve sterilním prostředí v izolátorech (značky BEM, Znojmo, ČR) s HEPA filtry.

3.5. SLEDOVÁNÍ PRŮBĚHU MIKROSPORIDIÓZY

Průběh infekce byl sledován na základě koprologického vyšetření trusu myší a na základě vyšetření vzorků orgánů jednotlivých skupin myší.

3.5.1. SBĚR TRUSU

Každý den byl prováděn odběr trusu od každé myši do předem označených a vysterilizovaných mikrozkuvek (eppendorfek), které byly následně umístěny do mrazničky, kde byly uchovány při teplotě -20°C .

3.5.1.1. POSTUP IZOLACE DNA Z TRUSU

1) Do jednotlivých 2 ml mikrozkuvek se vzorky trusu o hmotnosti v rozmezí 180-220 mg byly přidány malé skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA). Následující postup byl prováděn dle komerčně dodávaného kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

2) Bylo připipetováno 1ml pufru Anti-streptolysinu (ASL) a takto připravené vzorky byly rozbíjeny v beadbeateru (FastPrep® -24, M.P. Biomedicals, CA, USA) 1 minutu při rychlosti 16 000 g.

3) Vzorky byly inkubovány po dobu 5 min při teplotě 70°C.

4) Po uplynutí doby byly vzorky zvortexovány a následně po dobu 1 minuty centrifugovány při plné rychlosti.

5) Vzniklý supernatant byl přepipetován do nových 2 ml mikrozkuvek, sediment byl vyhozen.

6) Do každé mikrozkuvky bylo vloženo po jedné inhibiční tabletě a takto připravený vzorek byl homogenizován roztřepáním do té doby, dokud nedošlo k rozpuštění tablety, poté byl 1 minutu inkubován při pokojové teplotě a následně 3 minuty centrifugován na plný výkon.

7) Supernatant byl opět přepipetován do nové 1,5 ml mikrozkuvky, pellet byl vyhozen.

8) Následně byla provedena 3 minutová centrifugace vzorku na plný výkon.

9) Do nových 1,5 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 15 µl proteinázy K, k ní bylo přidáno 200 µl supernatantu a 200 µl pufru AL – po každém přidání jednotlivých látek, byly vzorky zvortexovány po dobu 15 s.

10) Takto vzniklá směs byla inkubována při 70°C po dobu 10 minut, během inkubace docházelo k pravidelnému míchání.

11) Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 200 µl 96% etanolu a takto vzniklá směs byla zvortexována.

12) Veškerý supernatant byl přepipetován na QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami, bylo připipetováno na filtr 500 µl pufru AW1 a 500 µl pufru AW2 – mezi jednotlivými kroky byla směs vždy po dobu 1 min centrifugována na plný výkon a byl odstraňován odpad ze sběrné zkumavky.

13) QIAamp kolony byly poté přendány do nových 1,5 ml mikrozkušavek, na membránu bylo napipetováno 200 µl elučního pufru AE a směs byla inkubována 1 minutu při pokojové teplotě a následně zcentrifugována na plný výkon 1 minutu.

14) Po inkubaci byl filtr vyhozen a sběrná mikrozkušavka se získanou DNA byla uchována a uskladněna v mrazničce při teplotě -20°C.

3.5.2. ODBĚR VZORKŮ ORGÁNŮ A TKÁNÍ

Každý týden byly usmrcovány vždy 3 myši z obou sledovaných skupin (BALB/c, SCID). Každé myši byla odebrána krev, moč, proběhl výplach peritonea pomocí 2ml chlazeného PBS a byla provedena pitva jednotlivých orgánů (žaludek, dudodenum, jejunum, ileum, cékum, kolon, slezina, játra, ledviny, močový měchýř, srdce, plíce, mozek). Na každý orgán byla použita jedna sada pitevních nástrojů, která byla předem vysterilněna autoklávováním při 125°C a následně UV světlem o vlnové délce 254 nm přístrojem Uvilink CL 508, UVITEC, UK.

Jednotlivé vzorky byly po vyjmutí použity k izolaci DNA a ke stanovení přítomnosti/nepřítomnosti mikrosporidií ve tkáni.

3.5.2.1. POSTUP IZOLACE DNA Z TKÁNÍ

1) Do mikrozkušavky byla nastříhána tkáň o hmotnosti 10 mg, k ní byly přidány malé skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) a 2-3 zirkoniové kuličky o velikosti 2 mm (Invitex, Germany).

2) Ke vzorku bylo připipetováno 180 µl ATL pufru a takto připravená směs byla rozbíjena v mini-beadbeateru (FastPrep®-24, M.P. Biomedicals, CA, USA) 1 minutu rychlostí 16 000 *g*. Dále se postupovalo podle návodu výrobce komerčně dodávaného izolačního kitu QIAamp® DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) určeného pro čištění a izolaci DNA z živočišných vzorků tkání a buněk, kvasinek a bakterií.

3) Ke směsi bylo připipetováno 20 µl proteinázy K a směs se nechala 1 hodinu inkubovat při 56°C, během tohoto procesu byl vzorek pravidelně míchán.

4) Po skončení inkubace došlo k centrifugaci po dobu 10 s.

5) Ke směsi se připipetovalo 200 µl AL pufru a 200 µl 96 % etanolu, po každé pipetaci proběhlo promíchání vzorku vortexem.

6) Následně proběhla centrifugace rychlostí 16 000 *g* po dobu 10 s.

7) Veškerý vzniklý supernatant byl přepipetován na membránu QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami a následně zcentrifugován 2 minuty při rychlosti 16 000 *g*.

8) Ze sběrné zkumavky byl poté odstraněn odpad.

9) Na vzorek bylo připipetováno 500 µl AW1 pufru a při rychlosti 16 000 *g* byl po dobu 2 minut zcentrifugován.

10) Poté bylo připipetováno 500 µl AW2 pufru a následná centrifugace probíhala po dobu 1 minuty rychlostí 16 000 *g*. Mezi jednotlivými kroky byl odstraňován odpad ze sběrné zkumavky, která byla poté vyhozena a nahrazena novou mikrozkušavkou.

11) Na membránu kolony bylo napipetováno 200 µl elučního AE pufru a takto připravený vzorek byl inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugován při rychlosti 16 000 *g* 1 minutu.

12) Získaná DNA byla uchována v mrazničce při teplotě -20°C.

3.5.3. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Celkový objem reakční směsi sledovaného vzorku (Tabulka II.) pro každou PCR byla 25 µl. Součástí reakce byla také pozitivní a negativní kontrola, jako poslední byla přidávána Taq polymeráza. Pozitivní kontrolou byla DNA vyizolovaná ze spor *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II, který je dlouhodobě udržován v tkáňových kulturách Vero E6 na Parazitologickém ústavu BC AVČR, v.v.i..

Použité roztoky:

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

Tabulka II.: Reakční směs pro PCR – pro jednu reakci

Použitý roztok	primární PCR	sekundární PCR
Deionizovaná H ₂ O	14,87 µl	16,87 µl
Pufr	2,50 µl	2,50 µl
MgCl ₂	1,50 µl	1,50 µl
dNTPs	0,50 µl	0,50 µl
Forward - primer 5'	0,50 µl	0,50 µl
reverse - primer 3'	0,50 µl	0,50 µl
BSA	1,00 µl	
Taq polymeráza	0,63 µl	0,63 µl
DNA/PCR produkt	3,00 µl	2,00 µl
Celkem	25,00 µl	25,00 µl

BSA přidáváno pouze u primární PCR na úkor přidávané deionizované vody.

Použití primerů specifických pro mikrosporidie bylo na základě De Bosscuerea a Katzwinkel-Wladarscha.^{55, 56}

Primery pro primární PCR:

M2F 5' – CGG AGA GGA AGC CTT AGA GA – 3'

M2R 5' – ATA GTG ACG GGC GGT GTG T – 3'

Primery pro sekundární PCR:

MFNest 5' – GAG AGA TGG CTA CTA CGT CCA AGG – 3'

MSP1R 5' – ACA GGG ACM CAT TCA – 3'

Amplifikace DNA probíhala na přístroji termocycler (Little Genius, BIOER) a zahrnovala následující kroky:

- 1) Počáteční denaturaci při 94°C po dobu 3 minut.
 - 2) Denuraci při 94°C po dobu 45 s.
 - 3) Nasedání primerů při teplotě 58°C po dobu 45 s.
 - 4) Syntézu nových řetězců při teplotě 72°C 1 minutu.
 - 5) Dosyntetizování nového řetězce při 72°C po dobu 7 minut.
- Cyklus kroků 1) – 4) probíhal ve 35 opakováních.

3.5.4. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

DNA fragmenty byly detekovány gelovou elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu, který byl obarvený ethidiem bromidem (Sigma) při 70V na přístroji EC300XL, Thermo Scientific po dobu 60 minut. Výsledky byly následně vizualizovány UV transluminátorem (Electronic UV transilluminator, Ultra-Lum, Inc.) při vlnové délce 312 nm. DNA markerem byl 100 bp DNA ladder (Fermentas).

3.5.4.1. POSTUP PŘÍPRAVY GELU

Příprava gelu pro elektroforézu byla prováděna:

- 1) Smícháním 0,8 g agarózy s 80 ml pufru TAE.
- 2) Směs byla přivedena do varu pomocí mikrovlnné trouby za občasného promíchání.
- 3) Poté byla směs zchlazena pod tekoucí vodou.
- 4) Následně byl připipetován 1 µl ethidium bromidum.
- 5) Směs byla promíchána a nalita do formy na gel, byl vložen hřeben využívaný k vytvoření jamek.
- 6) Směs byla nechána ztuhnout.
- 7) Po ztuhnutí byl hřeben odstraněn a do vzniklých jamek byly nanесeny vzorky.

3.5.4.2. APLIKACE VZORKŮ DO GELU

Vzorky získané z PCR aplikujeme do jednotlivých jamek gelu. Objem jednotlivých aplikovaných vzorků činí 20 µl. Přidáme i pozitivní a negativní kontroly a DNA ladder.

Takto připravený gel se vzorky se připojí k napětí o velikosti 70V a nechá se 60 minut inkubovat.

4. VÝSLEDKY

4.1. PRŮBĚH MIKROSPORIDIÓZY U SCID MYŠÍ

Průběh infekce způsobený mikrosporidii byl sledován u 18 myší, které byly perorálně inokulovány 1×10^7 spór *Encephalitozoon cuniculi* dávkou. Každý týden byly 3 ze sledovaných myší usmrceny a za sterilních podmínek vypitvány, ze vzorků jejich jednotlivých orgánů byla vyizolována DNA a vzorky byly vyšetřeny na přítomnost parazita. Pozitivní výsledek byl zaznamenán, byla-li detekce spór v jednotlivých orgánech pozitivní alespoň u jedné z myší.

Již v prvním týdnu byl zaznamenán okamžitý vzestup infekce. Spóry byly detekovány v každém z odebraných vzorků orgánů a tělních tekutin, nástup akutní fáze infekce kmenem ECIII se projevil jako silně agresivní. V následujících týdnech byla mikrosporidiová DNA prokázána ve vzorcích všech sledovaných orgánů a tekutin s výjimkou céka (14.DPI) a krve (14.- 28.DPI). Akutní fáze infekce u SCID myší končila úhynem zbylých myší 39. den po infekci (DPI), kdy DNA mikrosporidií byla na základě molekulárních metod s určitostí prokázána v každém z vyizolovaných orgánů a tkání. Akutní fáze infekce byla potvrzena 4. den po pitvě, kdy zbylé tři myši uhynuly. Průběh mikrosporidiózy v jednotlivých týdnech je znázorněn v tabulce III.

Spóry v trusu, sbíraném každý den od každé myši, byly téměř nepřetržitě detekovány již od prvního dne po infekci až do úmrtí myší (tabulka IV.)

Tabulka III.: Průběh mikrosporidie u SCID myši v orgánech a tkáních.

	7. DPI	14. DPI	21. DPI	28. DPI	35. DPI	39. DPI
žaludek	+	+	+	+	+	†
duodenum	+	+	+	+	+	†
jejunum	+	+	+	+	+	†
ileum	+	+	+	+	+	†
cékum	+		+	+	+	†
kolon	+	+	+	+	+	†
slezina	+	+	+	+	+	†
játra	+	+	+	+	+	†
ledvina	+	+	+	+	+	†
močový měchýř	+	+	+	+	+	†
srdce	+	+	+	+	+	†
plíce	+	+	+	+	+	†
mozek	+	+	+	+	+	†
výplach peritonea	+	+	+	+	+	†
krev	+				+	†
moč	+	+	+	+	+	†

+ pozitivní nález mikrosporidiové DNA ve vzorku, † úhyn myši

Tabulka IV.: Průběh mikrosporidie u SCID myši v trusu.

DPI	trus	DPI	trus	DPI	trus
1.	+	14.	+	27.	+
2.	+	15.	+	28.	+
3.	+	16.	+	29.	+
4.		17.	+	30.	+
5.		18.	+	31.	+
6.	+	19.	+	32.	+
7.		20.	+	33.	+
8.		21.	+	34.	+
9.	+	22.	+	35.	+
10.	+	23.	+	36.	+
11.	+	24.	+	37.	+
12.	+	25.	+	38.	+
13.	+	26.	+	39.	+

4.2. PRŮBĚH MIKROSPORIDIÓZY U BALB/c MYŠÍ

Průběh mikrosporidiózy byl sledován ve skupině 39 BALB/c myší, které byly inokulovány spórami *Encephalitozoon cuniculi* v dávce 1×10^7 . Tři z myší byly každý týden usmrceny, sterilně vypitvány a vzorky jejich jednotlivých orgánů a tělních tekutin byly zpracovány metodami molekulární biologie ke zjištění přítomnosti mikrosporidií.

V prvním týdnu po perorální inokulaci BALB/c myší spórami *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III byla infekce detekována kromě jejunu a ilea v každém orgánu. Akutní fáze infekce, kdy byla mikrosporidiová infekce zaznamenána ve většině orgánů, trvala do 28. DPI. V následující chronické fázi infekce došlo k postupnému vymizení infekce z jednotlivých částí střeva, přičemž infekce nejdéle přetrvávala v céku, a později i z většiny sledovaných orgánů. Nicméně dlouhodobě infekce přetrvávala v slezině, játrech, ledvinách a mozku, kde byla detekována až do ukončení experimentu 91 DPI. V krvi byla přítomnost mikrosporidií potvrzena pouze v první týdnu infekce. Průběh mikrosporidiózy ve tkáních a orgánech je zaznamenána v tabulce V.

Součástí experimentu byl každodenní sběr trusu od každé z myší. Izolovaná DNA *Encephalitozoonu cuniculi* byla pozitivní nejvíce v rozmezí 11. – 21. dne po infekci. V dalších dnech pozitivní detekce spór ustupovala a od 35. dne byly mikrosporidie zaznamenány pouze 50., 68., 84. a 91. den po infekci (tabulka VI.)

Tabulka V.: Průběh mikrosporidiózy u BALB/c myši v orgánech a tkáních.

	7. DPI	14. DPI	21. DPI	28. DPI	35. DPI	42. DPI	49. DPI
žaludek	+	+	+	+			
duodenum	+	+	+	+			
jejunum			+	+			
ileum			+				
cékum	+				+	+	+
kolon	+	+		+			
slezina	+	+	+	+			+
játra	+	+	+		+	+	
ledvina	+	+	+	+			
močový měchýř	+		+				
srdce	+	+		+	+	+	+
pľíce	+	+	+	+			
mozek	+	+	+	+	+	+	+
výplach							
peritonea	+	+	+		+	+	
krev	+						
moč	+				+	+	

	56. DPI	63. DPI	70. DPI	77. DPI	84. DPI	91. DPI
žaludek						
duodenum						
jejunum						
ileum						
cékum			+			
kolon						+
slezina	+	+	+	+	+	+
játra	+	+	+	+	+	
ledvina		+	+	+	+	+
močový měchýř						
srdce						
pľíce	+					
mozek	+	+	+	+	+	+
výplach						
peritonea	+					
krev						
moč					+	+

Tabulka VI.: Průběh mikrosporidiodózy u BALB/c myši v trusu.

DPI	trus
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	+
7.	+
8.	
9.	
10.	
11.	
12.	+
13.	
14.	+
15.	
16.	
17.	+
18.	
19.	+
20.	+
21.	
22.	
23.	
24.	
25.	
26.	+
27.	
28.	
29.	
30.	+

DPI	trus
31.	
32.	
33.	
34.	
35.	+
36.	
37.	
38.	
39.	
40.	
41.	
42.	
43.	
44.	
45.	
46.	
47.	
48.	
49.	
50.	+
51.	
52.	
53.	
54.	
55.	
56.	
57.	
58.	
59.	
60.	

DPI	trus
61.	
62.	
63.	
64.	
65.	
66.	
67.	
68.	+
69.	
70.	
71.	
72.	
73.	
74.	
75.	
76.	
77.	
78.	
79.	
80.	
81.	
82.	
83.	
84.	+
85.	
86.	
87.	
88.	
89.	
90.	
91.	+

+ pozitivní nálezy

4.3. PRŮBĚH MIKROSPORIDIÓZY U BALB/c MYŠÍ PO LÉČBĚ ALBENDAZOLEM

Léčivo albendazol byl per orálně podáván od 28. DPI do 42. DPI včetně. Jeho účinek byl po první týdnu užívání vysoký, protože počet napadených orgánů klesl z devíti na tři. DNA byla detekována ve slezině, plicích a mozku. Počet pozitivních orgánů se snižoval až do 49. DPI, kdy byla DNA *Encephalitozoon cuniculi* detekována pouze ve slezině. Účinky léčby bohužel nebyly trvalé a již týden po vysazení léku byla mikrosporidiální DNA identifikována ve slezině, plicích a peritoneu. Počet pozitivních orgánů stoupal až do 91. DPI, kdy spóry byly detekovány v osmi orgánech. Průběh mikrosporidiózy jednotlivými orgány je znázorněn v tabulce VII. Pozitivní detekce spór v trusu v tabulce VIII.

Tabulka VII.: Průběh mikrosporidiózy u BALB/c myší léčených albendazolem

	21.	Léčba albendazolem									
		28.	35.	42.	49.	56.	63.	70.	77.	84.	91.
žaludek	+	+									
duodenum	+	+									
jejunum	+	+									
ileum	+										
cékum											
kolon		+									
slezina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
játra	+							+	+	+	+
ledvina	+	+									
močový měchýř	+								+	+	+
srdce		+						+	+	+	+
plíce	+	+	+			+	+	+	+	+	+
mozek	+	+	+	+			+	+	+	+	+
výplach peritonea	+					+	+	+	+	+	+
krev											
moč									+	+	+

+ pozitivní nález

Tabulka VIII.: Průběh mikrosporidiózy u BALB/c myší léčených albendazolem v trusu.

DPI	trus
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	
7.	+
8.	
9.	+
10.	+
11.	
12.	+
13.	+
14.	
15.	
16.	+
17.	
18.	
19.	+
20.	
21.	+
22.	
23.	
24.	
25.	
26.	+
27.	
28.	
29.	+
30.	+

DPI	trus
31.	
32.	
33.	
34.	
35.	
36.	
37.	
38.	
39.	
40.	
41.	+
42.	
43.	
44.	
45.	
46.	
47.	
48.	
49.	
50.	
51.	
52.	
53.	
54.	
55.	
56.	
57.	
58.	
59.	
60.	

DPI	trus
61.	
62.	
63.	
64.	
65.	
66.	
67.	
68.	
69.	
70.	
71.	
72.	
73.	
74.	
75.	
76.	+
77.	
78.	
79.	
80.	
81.	
82.	
83.	
84.	+
85.	
86.	
87.	
88.	
89.	
90.	
91.	

+ pozitivní nález

5. DISKUZE

Mikrosporidie jsou jako příčiny oportunních infekcí sledovány od počátku 80. let, kdy se rozmohla světová pandemie AIDS. Před nástupem AIDS byla pozitivní detekce mikrosporidií zaznamenána pouze u osmi pacientů, avšak prevalence mikrosporidiových infekcí se v průběhu let zvýšila od 2 - 50 % u HIV-pozitivních jedinců celého světa. Mikrosporidiální infekce způsobené *Encephalitozoon cuniculi* jsou v současné době detekovány převážně u pacientů, jejichž imunitní systém je potlačen a to převážně u již zmíněných HIV-pozitivních jedinců, dále u osob, kteří podstoupili transplantaci orgánů a u pacientů s idiopatickou CD4+ T-lymfocytopenií. V posledních letech jsou detekovány i u imunokompetentních pacientů, u kterých je průběh infekce ve většině případů asymptomatický, mohou se však objevit i případy ve formě akutních střevních onemocnění a dokonce byla zaznamenána i systémová mikrosporidioza, kdy byl *Encephalitozoon cuniculi* genotypu I. detekován v mozkovém abscesu 56 letého muže.^{2, 50, 51}

Encephalitozoon cuniculi se řadí mezi nejvíce studované mikrosporidie. Díky své nízké specifitě hostitele a spórám, jenž dokáží odolávat nepříznivým vlivům prostředí, se s tímto parazitem setká ve svém životě většina lidí. Člověk se snadno nakazí např. z vody nebo potravin, které jsou kontaminované výkaly či močí infikovaných zvířat.²²

Na imunitní odpovědi hostitelského systému na mikrosporidie se z velké části podílí makrofágy, které jednak zajišťují fagocytózu, ale zároveň zapříčiňují rozšíření parazita v organismu. Fagocytóza spór je v menším rozsahu u BALB/c myší, jejichž organismus obsahuje mechanismus, který dokáže potlačit aktivaci fagocytární schopnosti právě u makrofágů, které jsou aktivovány mikrosporidii. Naopak u SCID myší, jejichž imunitní systém má deficienci T a B – lymfocytů a tudíž je jejich obrana závislá pouze na mechanismu aktivování fagocytózy u makrofágů, je šíření spór do tkání organismu rychlejší. Toto tvrzení, které bylo zkoumáno Markovou Petrou,

bylo potvrzeno průběhem mikrosporidiózy u našeho experimentu, kdy infekce v prvním týdnu po inokulaci SCID myši byla detekována v každém z orgánů a následek infekce byl fatální - narozdíl od BALB/c myši, u nichž průběh byl po per orální inokulaci podobný, kdy infekce byla kromě jejunu a ileu v každém z orgánů, avšak v následujících týdnech došlo k eliminaci detekovaných spór v orgánech na minimum.⁵²

Per orální inokulace SCID myši vedla k rozšíření mikrosporidií do všech orgánů a tkání již během prvního týdne s následným úhynem během 39 DPI. Pozitivní detekce spór v trusu po dobu infekce dokazují přítomnost mikrospor v trávicím traktu. Doba přežití infikovaných SCID myši byla 39 dní. Průběh mikrosporidiózy u SCID myši způsobené infekcí *Encephalitozoon cuniculi* genotypem ECIII zobrazuje tabulka III. na str. 35. Ve srovnání se studií, prováděnou v roce 2011 u *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II., se sledovaný kmen ECIII projevil jako daleko agresivnější než předchozí studie. Infekce u kmene ECII měla oproti ECIII pozvolnější nástup a přítomnost mikrospor ve všech orgánech nastala až ve 28. DPI (viz tabulka IX.).⁵³

Tabulka IX.: Průběh mikrosporidiózy u SCID myši v orgánech.⁵³

	7. DPI	14. DPI	21. DPI	28. DPI
žaludek			+	+
duodenum	+	+	+	+
jejunum		+	+	+
ileum			+	+
cékum	+		+	+
kolon	+	+	+	+
slezina		+	+	+
játra		+	+	+
ledvina				+
močový měchýř			+	+
srdce		+	+	+
pľíce		+	+	+
mozek	+	+	+	+
výplach peritonea	+	+	+	+
krev			+	+
moč			+	+

U BALB/c myši se mikrosporidie ECIII šířily do téměř všech orgánů a tkání až do 28. DPI. Po této fázi začala promořenost orgánů klesat, ale z většiny orgánů nevymizela až do 91. DPI, kdy byl pokus ukončen. Průběh infekce znázorňuje Tabulka V. ze str. 37. Narozdíl od SCID myši však infekce nevedla ke smrti hostitele. Ve srovnání s kmenem ECII, kdy mikrosporidie vymizely celkově ze všech orgánů a tkání v 56. DPI (viz tabulka X.), představuje kmen ECIII daleko vyšší nebezpečí v případě nakažení imunokompetentních pacientů.⁵³

Tabulka X.: Průběh mikrosporidiózy u BALB/c myši v orgánech.⁵³

	7. DPI	14. DPI	21. DPI	28. DPI	35. DPI	42. DPI	49. DPI
žaludek			+				
duodenum			+				
jejunum				+	+		
ileum	+	+	+	+	+		
cékum					+		
kolon					+		
slezina		+	+	+	+	+	+
játra			+	+	+	+	
ledvina				+	+		
močový měchýř			+	+	+		
srdce				+	+		
pľíce					+	+	
mozek	+	+	+	+	+	+	+
výplach peritonea	+	+	+	+	+	+	
krev			+	+			
moč		+	+	+	+		

+ pozitivní nález

Orgánem, ve kterém byla detekce spór pozitivní téměř po celou dobu výzkumu byla slezina. Z předchozích studií bylo zjištěno, že slezina tvoří rezervoár mikrosporidií, ve které mohou přežívat i bez toho, aniž by infikovanému jedinci způsobily klinické problémy. Jedná se o rovnovážný stav mezi infikovaným jedincem a parazitem, ve kterém mohou oba dlouhodobě přežívat. Pokud ale dojde k rozvrácení tohoto vztahu,

např. oslabením imunitního systému, a hostitel přestane mít kontrolu nad udržováním parazita, může dojít k rozvoji infekce a následnému šíření mikroskop organismem.⁵⁵

Léčba albendazolem aplikovaná u BALB/c myši 28.– 42. DPI měla po prvním týdnu léčby znatelný vliv. Počet pozitivních orgánů po ukončení terapie albendazolem ve 49. DPI klesl detekci jednoho pozitivního orgánu, a to sleziny. V následujících dnech se infekce začala opět šířit do jednotlivých orgánů a tkání na celkový počet osmi pozitivních vzorků v 91. DPI, kdy byl pokus ukončen. Léčba albendazolem je zobrazena v tabulce VII. na str. 39. Léčba genotypu III. se ukázala jako ne zcela účinná, což zase potvrzuje agresivnost tohoto kmene, neboť ve srovnání s výzkumem ECII, prováděným v minulých letech se u imbredního kmene myši BALB/c prokázala jako účinná, kdy po ukončení terapie (tj. 49. DPI) klesl počet detekovaných orgánů také pouze na jeden, a to také slezinu. Narozdíl ale od genotypu ECIII byly detekce spór v následujících týdnech negativní a to až do 63. DPI, kdy byl pokus ukončen. Průběh léčby BALB/c myši genotypu ECII je znázorněn v tabulce XI.⁵⁵

Tabulka XI.: Průběh mikrosporidiózy v orgánech BALB/c myši léčených albendazolem.⁵³

				Léčba albendazolem					
	7.	14.	21.	28.	35.	42.	49.	56.	63.
žaludek			+						
duodenum			+						
jejunum									
ileum	+	+	+	+					
cékum									
kolon									
slezina		+	+	+	+	+	+		
játra			+	+					
ledvina									
močový měchýř			+	+	+				
srdce				+					
pľíce									
mozek		+	+	+	+				
výplach									
peritonea		+	+	+					
krev									
moč			+	+	+				
+ pozitivní nález									

Získaná zjištění prokazují, že *Encephalitozoon cuniculi* dokáže přežívat v tělesných orgánech bez toho, aniž by se klinicky projevoval. Avšak při oslabení imunitního systému může nastat rozšíření infekce a tím pádem dojít k rozvoji mikrosporidiózy, která by mohla ohrozit život jedince.

6. ZÁVĚR

Infekce *Encephalitozoonem cuniculi* genotyp III. u jedinců s deficiencí imunitního systému je fatální.

U imunokompetentních jedinců je průběh mikrosporidiózy regulován imunitním systémem. Infekce nemá smrtelný účinek, avšak mikrosporidie jsou stále přítomny převážně v trávicím ústrojí, odkud se při oslabení imunitního systému může infekce opět rozšířit.

Léčba albendazolem není stoprocentně účinná, určité množství mikrosporidií přežívá v některých orgánech, odkud se mohou rozšířit do organismu.

Výsledky mé práce ukazují, že infekce mikrosporidii může být hrozbou nejenom pro imunodeficientní pacienty, ale problémy s nimi spjaté mohou způsobit i u pacientů, kteří jsou mikrosporidii infikováni, ale prozatím je průběh onemocnění asymptomatický. Mikrosporidióza je proto stále aktuálním tématem probíhajících studií.

7. KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrosporidie

Mikrosporidióza

Encephalitozoon cuniculi

SCID myši

BALB/c myši

Molekulární diagnostika

KEY WORDS

Microsporidia

Microsporidiosis

Encephalitozoon cuniculi

SCID mice

BALB/c mice

Molecular diagnostic

8. SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

1. **Shadduck JA, Greeley E** (1989): Microsporidia and human infections. Clin Microbiol Rev 2:158-165
2. **Mathis A, Weber R, Deplazes P** (2005): Zoonotic potential of the microsporidia. Clin Microbiol Rev 18:423-445
3. **Keeling PJ, Fast NM** (2002): Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Ann Rev Microbiol 56:93-116
4. **Keeling PJ, McFadden GI** (1998): Origins of microsporidia. Trends Microbiol 6:19-23
5. **Mathis A, Weber R, Deplazes P** (2005): Zoonotic potential of the microsporidia. Clin Microbiol Rev 18:423-445
6. **Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL** (1994): Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev 7:426-461
7. **Cali A., Weiss L., Takvorian P.** (2005): A review of the development of two types of human skeletal muscle infections from microsporidia associated with pathology in invertebrates and cold-blooded vertebrates. Folia Parasitol. 52:51-61
8. **Schmidt G., Roberts L.** (1981): Foundations of parasitology. 171-173.
9. **Dall DJ.** (1983): A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the Microspora. J Theor Biol., 105:647–659.

10. **Undeen AH, Vandermeer RK.** (1994): Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista: Microspora) spores—a quantitative study. *J Eukaryot Microbiol.* 41:129–132.
11. **Didier E.S., Weiss L.** (2008): Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protistology* 5:243-255
12. **Rönnebäumer K, Gross U, Bohne W** (2008): The nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. *Eukaryot Cell* 7:1001-1008
13. **Scanlon M, Shaw AP, Zhou CJ, Visvesvara GS, Leitch GJ** (2000): Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle. *J Eukaryot Microbiol* 47:525-531
14. **Koudela B, Vítovec J, Kučerová Z, Ditrich O, Trávníček J** (1993): The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol (Praha)* 40:279-286
15. **Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, Gelas P, Persat F, Piens MA, Trepo C** (1999): Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in person with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 180:2003-2008
16. **Didier E.S., Weiss M.L.** (2011): Microsporidiosis: Not just in AIDS patients. 24:490 -495
17. **Evering T., Weiss L.M.** (2006): The immunology of parasite infections in immunocompromised hosts. 28:549-565

18. **Jedrzejewski S., Graczyk T.K., Majewska A.C.** (2007): Quantitative Assessment of Contamination of Fresh Food Produce of Various Retail Types by Human-Virulent Microsporidian Spores. 73:4071-4073
19. **Snowden KF, Shadduck JA** (1999): Microsporidia of higher vertebrates. In Wittner M, Weiss LM (eds.), *The Microsporidia and microsporidiosis*. ASM, Washington DC, pp. 393-419
20. **Didier E.S. et al** (2004): Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology* 126:145-166
21. **McInnes, E.F., Stewart, C.G.,** (1991): The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 62, 51–54.
22. **Bryan, R.T., Schwartz, D.A.** (1999): **Epidemiology of microsporidiosis.** In: **Wittner, M., Weiss, L.** (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 502–516.
23. **Franzen, C., Müller, A.** (1999): Cryptosporidia and microsporidia—waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 245–262.
24. **Hutin, Y.J., Sombardier, M.N., Liguory, O., Sarfati, C., Derouin, F., Modai, J., Molina, J.M.** (1998): Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J. Infect. Dis.* 178: 904–907.
25. **Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B.** (2000): Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol.* 30, 1379–1393.

26. **Vavra, J., Yachnis, A.T., Shadduck, J.A., Orenstein, J.M.** (1998): Microsporidia of the genus *Trachipleistophora*— causative agents of human microsporidiosis: description of *Trachipleistophora anthropophthera* n. sp. (Protozoa: Microsporidia). *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 273–283.
27. **Field, A.S., Marriott, D.J., Milliken, S.T., Brew, B.J., Canning, E.U., Kench, J.G., Darveniza, P., Harkness, J.L.** (1996): Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2803–2811.
28. **Thurston-Enriquez, J.A., Watt, P., Dowd, S.E., Enriquez, R., Pepper, I.L., Gerba, C.P.** (2002): Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J. Food. Prot.* 65, 378– 382.
29. **Cali A., Coyle C., Takvorian P.M., Wittner M., Rhodes L.V., Brown D., Naktin J., Young E., Colasant G., Weiss L.M.** (2003): Preliminary evidence for *Brachiola algerae* as the etiology of a case of myositis. In: *Proceedings of the Eighth International Workshop on Opportunistic Protists.* (abstract), p. 99.
30. **Dascomb, K., Frazer, T., Clark, R.A., Kissinger, P., Didier, E.,** (2000): Microsporidiosis and HIV. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 24, 290–292.
31. **Lom, J., and I. Dykova.,** (2002): Ultrastructure of *Nucleospora secunda* n.sp. (Microsporidia), parasite of enterocytes of *Nothobranchius rubripinnis*. *Eur. J. Protistol.* 38:19–27.
32. **Desportes, I., Y. Le Charpentier, A. Galian, F. Bernard, B. Cochand- Priollet, A. Lavergne, P. Ravisse, and R. Modigliani.** (1985): Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bienensei* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.* 32:250–254

33. **Breitenmoser A.C., Mathis A., Burgi E., Weber R., Deplazes P.** (1999): High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans, *Parasitology* 118: 447–453.
34. **Weber R, Kuster H, Visvesvara GS, Bryan RT, Schwartz DA, Luthy R** (1993): Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: pulmonary colonization, microhematuria, and mild conjunctivitis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 17:415–419
35. **Wright JH, Craighead EM** (1922): Infectious motor paralysis in young rabbits. *J Exp Med* 36:135-140
36. **Matsubayashi H, Koike I, Mikata I, Takei H, Higiyama S** (1959): A case of *Encephalitozoon*-like infection in man. *Arch Pathol* 67: 181–187.
37. **Didier E.S., Visvesvara G.S., Baker M.D, Rogers L.D., Bertucci D.C., De Groote M.A. and Vossbrinck C.R.** (1996): A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J. Clin. Microbiol* 34(11):2835.
38. **Schwartz D. A., Visvesvara G.S., Weber R., and Bryan R.T.** (1994): Male genital tract microsporidiosis and AIDS: Prostatic abscess due to *Encephalitozoon hellem*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 41:618
39. **Sandfort, J., Hannemann A., Stark D., Owen R.L., and Ruf B.** (1994): *Enterocytozoon bieneusi* infection in an immunocompetent HIVnegative patient with acute diarrhea. *Clin. Infect. Dis*, 19:514-6

40. **Kotler, D., Orenstein, J.M.** (1999): Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: **Wittner, M., Weiss, L. (Eds.),** The Microsporidia and Microsporidiosis.. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 258–292.
41. **Molina JM, Oksenhendler E, Beauvais B, Sarfati C, Jaccard A, Derouin F, Modai J** (1995): Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *J Infect Dis* 171:245-249
42. **Conteas, C.N., Berlin, O.G., Ash, L.R., Pruthi, J.S.** (2000): Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63, 121–127.
43. **Snowden K., Logan K., Phalen D.N.** (2000): Isolation and characterization of an avian isolate of *Encephalitozoon hellem*. *Parasitology* 121: 9-14.
44. **Didier E.S., Rogers L.B., Orenstein J.M., Baker M.D., Vossbrinck C.R., van Gool T., Hartskeerl R., Soave R., Beaudet L.M.**(1996): Characterization of three *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 34-43
45. **Sak B, Salát J, Horká H, Saková K, Ditrich O** (2006): Antibodies enhance the protective effect of CD4⁺ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol Immunol* 28:95-99
46. **Racek J., et al** (2006): *Klinická biochemie*. Praha.
47. **Hořejší V., Bartůňková J.** (2009): *Základy imunologie*. Praha.
48. **Morpeth S. C., Thielman N. M.** (2006): Diarrhea in patients with AIDS. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* 9: 23-37.

49. **Khan I. A., Moretto M., Weiss L. M.** (2001): Immune response of *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect.* 3: 401-405.
50. **Franzen C., Müller A.** (2001): Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*, 3: 389–400.
51. **Ditrich O, Chrdle A, Sak B, Chmelík V, Kubále J, Dyková I, Kváč M** (2001): *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol*, 49:2769-2771
52. **Marková Petra** (1997): Interakce myších peritoneálních makrofágů se sporami *Encephalitozoon cuniculi* *in vivo* a *in vitro*. Magisterská diplomová práce. Jihočeská univerzita. Přírodovědecká fakulta.
53. **Kotková M.** (2011): Průběh mikrosporidiózy způsobené *Encephalitozoon cuniculi* u imunokompetentních a imunodeficientních myší. České Budějovice. Magisterská diplomová práce. Jihočeská univerzita. Přírodovědecká fakulta.
54. **Šmarda J.** (2005): *Metody molekulární biologie*. Brno.
55. **De Bosscuere H, Wang Z, Orlandi PA** (2007): First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. hellem* in a European brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. *Zoonoses Public Health* 54: 131–134.
56. **Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Helse W, Löscher T, Rinder H** (1996) Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop Med Int Health* 1: 373–378.

