

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Oportunní paraziti u alkoholiků

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Gabriela Křivánková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

5. května 2011

Abstrakt

The target of this study was proving the occurrence of opportunistic parasites in alcoholics. The examined material was stool. In total 28 samples were examined. 4 samples from the patients of Psychiatric Hospital in Červený Dvůr, 5 samples were from the patients hospitalized at the psychiatric ward of the Central Military Hospital, 3 samples were provided by the patients of the Psychiatric Hospital in Havlíčkův Brod and 16 samples were from the patients in terrain, coming to the therapy to outpatient's ward.

For the microscopic examination of stool the following methods were applied: M.I.F.C concentration method for providing the development stages of protozoans, coloring method of Miláček-Vítovec, serving for the diagnostic of crypto-sporidia oocysts in stool and Calcofluor, which is aimed at the detection of microsporidia. Molecular diagnostic was based on PCR and product restriction. PCR method has shown the presence of microsporidia in case of 1 patient of 28.

Following sequenation and phylo-genetic analysis diagnosed *Encephalitozoon cuniculi*. *Encephalitozoon cuniculi* was detected in case of one patient from terrain.

Occurence of microsporidia in alcoholics amounts 4%.

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za odborné a cenné rady při vzniku této bakalářské práce a také trpělivost a čas, který mi věnoval. Děkuji kolektivu Laboratoře oportunních parazitů PaÚ AVČR v Českých Budějovicích za poskytnutí výborných pracovních podmínek při výzkumu, za jejich vstřícnost a profesionální přístup. Dále děkuji všem dárcům vzorků, bez jejichž ochoty by tato práce nevznikla. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu.

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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž 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 These.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 5. května 2011

OBSAH

ÚVOD	7
1. SOUČASNÝ STAV	8
1.1 Parazitismus.....	8
1.2 Oportunní parazitismus.....	9
1.3 Střevní parazitární infekce.....	9
1.3.1 <i>Obrana hostitelského organismu proti parazitární infekci</i>	10
1.3.1.1 <i>Nespecifická imunita</i>	11
1.3.1.2 <i>Specifická imunita</i>	11
1.4 Závislost na alkoholu.....	12
1.5 Mikrosporidie	13
1.6 Kryptosporidie	16
1.7 <i>Isospora belli</i>	19
1.8 <i>Cyclospora cayetanensis</i>	20
1.9 <i>Toxoplasma gondii</i>	21
1.10 <i>Pneumocystys jiroveci</i>	24
1.11 <i>Entamoeba histolytica</i>	25
1.12 <i>Strongyloides stercoralis</i>	27
2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY	28
2.1 Cíl práce.....	28
2.2 Hypotézy.....	28
3. METODIKA	28
3.1 Charakteristika sledovaného souboru	28
3.2 Odběr vzorků	29
3.3 Metody parazitologického vyšetření.....	29
3.3.1 <i>Mikroskopické vyšetření stolice</i>	30
3.3.1.1 <i>M.I.F.C.</i>	30
3.3.1.2 <i>Barvení dle Miláčka-Vítovce</i>	30
3.3.1.3 <i>Barvení calcofluorem</i>	31

3.3.2 Molekulární diagnostika	33
3.3.2.1 Izolace DNA ze vzorku stolice.....	33
3.3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	35
3.3.2.3 Gelová elektroforéza (ELFO)	37
3.3.2.4 Extrakce z gelu (MinElute Gel Extraction Kit Protokol)	38
3.4 Statistické vyhodnocení výsledků.....	39
4. VÝSLEDKY	39
4.1 Mikroskopické a molekulární vyšetření stolice	39
4.1.1 Výsledky vyšetření stolice koncentrační sedimentační metodou (M.I.F.C.)	39
4.1.2 Výsledky vyšetření stolice barvením dle Miláčka a Vítovce	39
4.1.3 Výsledky vyšetření stolice barvením Calcofluor	39
4.1.4 Nálezy mikrosporidií metodou PCR.....	40
4.1.5 Vyhodnocení výsledků sekvenace a fylogenetické analýzy	41
4.1.6 Výsledky vyšetření sledovaného souboru jednotlivými metodami	41
4.1.7 Přehled pozitivních vzorků na mikrosporidie u jednotlivých skupin pacientů	43
5. DISKUZE	44
6. ZÁVĚRY	49
7. LITERATURA	50
8. KLÍČOVÁ SLOVA	65

Úvod

Oportunní paraziti jsou organismy, které mohou vyvolat závažná onemocnění při narušení imunitního systému hostitele. U imunokompromitovaných pacientů je riziko oportunních infekcí vysoké, a to i v případě nízké virulence. Alkohol zasahuje do funkce buněk imunitního systému, dochází k narušení imunitního systému a zvýšené vnímavosti k infekci. Abúzus alkoholu je spojen se sníženou produkcí protilátek a snížením aktivity makrofágu, často je také provázen proteinovou malnutricí a poklesem imunity.

Tato práce se snaží prokázat přítomnost oportunních parazitů u alkoholiků, v závislosti na konzumaci alkoholu a poškození organismu jedince.

1. Současný stav

1.1 Parazitismus

Parazitismem označujeme soužití dvou organismů, hostitele a parazita. Parazit neboli cizopasník je organismus, jenž získává živiny z jednoho či více hostitelů.

Existuje několik typů soužití organismu a hostitele. Symbióza je definována jako vztah dvou organismů, které bez sebe nemohou existovat. Zahrnuje komensalismus, forézu, mutualismus (Volf et Horák, 2007, Bednář, 1999). Při komensalismu parazit využívá potravy z vnějšího i vnitřního prostředí hostitele bez jeho poškození. Forézou označujeme využití hostitelského organismu k transportu jiného organismu nebo úkrytu. Za mutualismuz považujeme stav, kdy jeden z organismů získává živiny (Rohde, 2005).

Rozdělení parazitů na ektoparazity a endoparazity je dáno lokalizací (Rohde, 2005). Ektoparazité žijí na povrchu hostitele, endoparazité jsou přítomni v organismu hostitele (Volf et Horák, 2007). Endoparazity lze dělit na střevní, krevní, dutinové a tkáňové. Toto rozčlenění je na základě napadeného orgánu (Bednář, 1999).

Parazitické organismy lze dělit také na základě jejich životní strategie. Mikroparaziti se v těle hostitele množí. Makroparaziti produkují infekční stadia bez pomnožení (Rohde, 2005).

Životní cyklus parazitů rozdělujeme na monoxenní a heteroxenní (Rohde, 2005).

Na základě vztahu cizopasníka a hostitele rozeznáváme dočasný parazitismus neboli temporární (Volf et Horák, 2007, Bednář, 1999). Permanentní paraziti setrvávají v hostiteli i celý život (Volf et Horák, 2007). Obligatorní parazité jsou odkázáni na cizopasný život. Fakultativní organismy parazitují příležitostně (Bednář, 1999).

Parazité se mohou žít na jednom hostiteli (monofágní) nebo na několika hostitelských organismech (polyfágní) (Bednář, 1999). Obvykle dochází k poškození hostitele (Rohde, 2005).

1.2 Oportunní parazitismus

Pojmem oportunní parazitismus lze rozumět schopnost mikroorganismů - parazitů vyvolat závažné onemocnění při narušení imunitního systému hostitele. U imunokompromitovaných pacientů je vysoké riziko oportunních infekcí, a to i v případě nízké virulence (Sepkowitz, 2002). K oportunním infekcím u imunodeficitních jedinců řadíme toxoplasmózu, mikrosporidiózu, kryptosporidiózu a onemocnění způsobené isosporou (Petithory et al., 1989) a *C. cayetanensis* (Jíra, 2009). Mezi oportunní parazitózy v našich podmínkách, které byly hlášeny a zveřejněny na www.szu.cz, patří toxoplasmóza a kryptosporidióza.

1.3 Střevní parazitární infekce

Tyto infekce jsou vyvolávány helminty nebo prvoky, kteří mají škodlivé účinky na střevní tkáň (Hoste, 2001). Střevní parazitární infekce patří mezi nejrozšířenější infekce v rozvojových zemích (Siwila, 2010). Gastrointestinální trakt je primárním místem v průběhu životního cyklu parazitů (Park, 2007). Střevní infekce jsou často způsobeny *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *Cryptosporidium* sp. (Ngui et al., 2011). Při invazi epitelových buněk sliznice tlustého a slepého střeva entamebami dochází k nekrotickým lézím. Gastrointestinální onemocnění je spojeno s abdominálními obtížemi, průjmy. Může docházet k ztrátě chuti k jídlu, střevní malaabsorpci (Hoste, 2001). Mikrosporidie *E. intestinalis* a *E. bienersi* vyvolávají změny v tenkém střevě (Jíra, 2009).

K přenosu dochází fekálně-orální cestou, kontaminovanou vodou, potravou (Stejskal, 2007). Důležitou skutečností je vztah parazita a imunitního systému jedince. K výrazným projevům infekce dochází u nemocných s poruchou specifické buněčné imunity (Krejsek et Kopecký, 2004).

Imunitní odpověď organismu vůči parazitům zahrnuje fyziologické obranné bariéry a také složky přirozené a specifické imunity (Krejsek et Kopecký, 2004).

Vybraná parazitární onemocnění v ČR v letech 2001 - 2011 únor znázorňuje Tab. 1.

Tab. 1 : Vybraná parazitární onemocnění v ČR v letech 2001-2011 únor

Diagnóza	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	únor 2011
Amebóza	25	29	18	15	20	9	9	11	5	18	0
Kryptosporidióza	3	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Toxoplasmóza	516	646	455	319	347	328	231	248	221	258	23

(www.szu.cz)

V Tab.1 je patrná nízká prevalence kryptosporidiózy. Kryptosporidie se však vyskytují relativně často. Problém je v diagnostice, protože nejsou zahrnuty v rutinním schématu vyšetření střevních parazitóz a některé parazitologické laboratoře nepoužívají cílené barvení na kryptosporidie. Amebóza pravděpodobně zahrnuje i nálezy nepatogenních střevních améb, které některé laboratoře hlásí. Mezi nepatogenní améby patří *E. dispar*, *E. hartmanni*, *E. coli* (Volf et Horák, 2007). Toxoplasmóza je každoročně diagnostikována u 300 až 400 lidí (Nohýnková, 2011).

1.3.1 Obrana hostitelského organismu proti parazitární infekci

Obranné mechanismy proti parazitům jsou jak specifické tak i nespecifické (Jíra, 2009). Parazité stimulují specifickou buněčnou odpověď. Dochází k indukci TH1 T-lymfocytů, což je typické cytotoxickou reaktivitou, vznikem granulomů. V případě vniku TH2 imunitní odpovědi, je stimulována populace B-lymfocytů k tvorbě specifických protilátek všech tříd imunoglobulinů. U parazitárních infekcí je výrazné zvýšení IgE (Krejsek et Kopecký, 2004).

1.3.1.1 Nespecifická imunita

Poskytuje jen částečnou ochranu. Nespecifické imunitní mechanismy se uplatňují dříve než adaptivní imunitní mechanismy (Hicks et al., 2000).

V první linii dochází k uplatnění fyzikálně-chemických bariér v sliznici trávicího traktu, které tvoří mechanické překážky. Muciny a mucinové molekuly jsou hlenovité sekrety většiny epitelů, které mají podíl na adhezi a invazi hostitelské buňky. Hostitelské muciny brání usídlení parazitů a ulehčují jejich vypuzení. Paraziti secernující enzymy degradující mucin a usnadňující překonání membrány z mucinu. Interakce s muciny hostitele se mohou uplatnit u kryptosporidií, lambií, entaméb (Hicks et al., 2000).

Druhou linii tvoří humorální a buněčné obranné mechanismy, se kterými se setkávají protozoičtí paraziti jimž se podařilo překonat bariérové mechanismy. Humorální složku tvoří alternativní cesta aktivace komplementu, jíž vyvolají povrchové vrstvy protozoí. C3 složka aktivuje fragment C3b, který se naváže na povrch parazita a dochází k aktivaci komplementové kaskády s terminální lytickou fází (Overath et Aebischer, 1999).

1.3.1.2 Specifická imunita

Mezi specifické imunitní mechanismy patří humorální a buněčně zprostředkované mechanismy (Hořejší et Bartůňková, 2005).

Subpopulace Th1 zprostředkuje buněčnou imunitní odpověď proti intracelulárním parazitickým protozoím (Jíra, 2009). Pohlcení parazita makrofágem vede k produkci IL-12, ten směřuje diferenciaci T-prekursorů na Th1. Th1 produkuje TNF a INF-gama. Tyto cytokiny aktivují makrofágy k tvorbě NO (baktericidní oxid dusnatý). K aktivaci makrofágů pomáhají protilátky IgG2, produkované pod vlivem INF-gama. Imunokomplexy obsahující tuto protilátku se dobře váží na Fc makrofágů a tím je stimulují (Hořejší et Bartůňková, 2005).

Subpopulace Th2 zprostředkuje humorální imunitní odpověď (Jíra, 2009). Th2 spolupracuje s B-ly. Pomoc je založena na produkci IL-4, IL-5, IL-6 a přímém mezibuněčném kontaktu. Pro vznik Th2 buněk je třeba setkání

prekurzorové buňky s antigenem na APC za přítomnosti IL-4. Pod vlivem IL-4 dochází k produkci protilátky IgE. IgE nasedají na IgE receptory na povrchu mastocytů a basofilů. Při kontaktu s parazitem dojde k uvolnění mediátorů a zánětlivé reakci (Hořejší et Bartůňková, 2005).

U intestinálních nákaz se uplatňuje slizniční imunitní systém. Imunitní buňky tvoří CD4+ a CD8+ T-buňky, B-buňky, NK a fagocyty. Luminální antigeny ve střevě stimulují lymfatickou tkáň, lamia propria mucosae a intraepiteliální lymfocyty (McDonald, 1999).

Protozoa indukují sekreci chemokinů (Brenier-Pinchart et al., 2001).

1.4 Závislost na alkoholu

Světová zdravotnická organizace popisuje rizikové pití jako pravidelnou konzumaci 20 až 40g alkoholu denně u žen, u mužů 40 – 60g denně. Poškození zdraví fyzického nebo psychického je výsledkem nadměrné konzumace alkoholu, tedy škodlivé konzumace. Zde se množství alkoholu pohybuje u žen okolo 40g na den, u mužů okolo 60g denně. Závislost na alkoholu je definována jako soubor fyziologických, behaviorálních a kognitivních fenoménů, kdy požívání alkoholu je pro jedince prioritou nad vším ostatním (Anderson et al., 2005).

Jedním z kritérií závislosti na alkoholu je zvyšování potřeby alkoholu k dosažení intoxikace či požadovaného účinku. Závislý setrvává v konzumaci alkoholu i přes uvědomění si negativního účinku (Anderson et al., 2005).

Alkohol poškozuje žaludek, pankreas, centrální nervový systém a způsobuje periferní neuropatie (Mačák et Mačáková, 2004). Alkoholická hepatitida je jedním z prvních příčin onemocnění jater alkoholiků a následně cirhózy jater. U těžkých závislostí na alkoholu se cirhóza projevuje do 5 let. Významnou roli pro klinický průběh onemocnění představují imunologické mechanismy (Saito et Ishii, 2004).

Užívání alkoholu vede k negativním účinkům na imunitní systém. Osoby zneužívající alkohol jsou více náchylné k některým infekčním onemocněním a bakteriemi. Infekce mají tendenci být kontinuální a jsou často spojovány

s vysokou úmrtností. Vysoké dávky alkoholu způsobují snížení humorální a buněčné imunitní odpovědi (Pavia et al., 2004).

Akutní a chronická intoxikace alkoholem může způsobit snížení fagocytární schopnosti, zvýšit patologickou imunitní odpověď s indukci proteinů akutní fáze a zvýšení hladiny imunoglobulinů, která je obvykle projevem autoimunity (Waszkiewicz et Szulc, 2010). Bylo zjištěno, že ethanol má imunitní a autoimunitní účinky. V krvi je obsaženo malé množství lymfocytů citlivých na ethanol a protilátek specifických pro tyto sloučeniny. U pacientů závislých na alkoholu byla zjištěna přítomnost ethanol citlivých lymfocytů a protilátek anti-ethanol, což svědčí o patologické syntéze protilátek (Bykova et Sedinina, 2002).

Konzumace alkoholu inhibuje některé složky přirozené imunity, například NK buňky (Miller et al., 2011). Akutní příjem alkoholu inhibuje aktivitu DC buněk, tedy antigen, prezentující funkci buňky (Szabo et al., 2004).

Chronické pití alkoholu způsobuje zvýšení střevní propustnosti, což vede k abnormalitám ve střevní epitelální vrstvě. Zvýšená propustnost usnadňuje průnik bakterií přes střevní bariéru. Bakterie se dostanou do mízních uzlin a portálního oběhu, což může způsobit sepsi (Moss, 2005). Alkohol snižuje odolnost proti střevním parazitům (Watson, 1993). Nadměrné požívání alkoholu narušuje metabolismus většiny živin (Bunout, 1999).

1.5 Mikrosporidie

Mikrosporidie z fylogenetického hlediska řadíme mezi houby, dříve však patřily mezi prvoky (Bednář, 1999, Weis, 2001). Náleží tedy do říše Fungi, kmene Microspora, třídy Microsporea, řádu Microsporida (Vivarés et al., 2002, Jíra 2009). Mikrosporidie jsou obligátní parazité (Ghosh et al., 2006). Jsou charakteristické absencí buněčných složek typických pro eukaryotické buňky jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát a bičíky (Corradi et Keeling, 2009).

Vývoj mikrosporidií probíhá uvnitř hostitelské buňky (Jíra, 2009). Životní cyklus probíhá ve dvou fázích merogonii a sporogonii (Mathis, et al., 2005). Během merogonie se buňky rozmnožují a rozpadem plasmodií vznikají dceřiné

buňky, jež mohou rozmnožování opakovat. Buňky mikrosporidií jsou ohraničeny plasmatickou membránou, která komunikuje s cytoplasmou hostitelské buňky. V tomto stadiu není hostitelská buňka poškozována. Po vyplnění hostitelské buňky začnou mikrosporidie na svém povrchu vytvářet elektrodenzní stěnu. Jednotlivé buňky pokryté stěnou se osamostatňují a vzniká spora, která je funkčně adaptovaná pro infikování další buňky téhož hostitelského organismu nebo nového hostitele. Uvnitř spory je cytoplasma s jádrem a vystřelovací aparát. Vystřelovací aparát obsahuje pólové vlákno, polaroplast a vakuolu. Po aktivaci spory dochází k vystřelení pólového vlákna. Pólové vlákno pronikne tkání a zárodek parazita je infikován do cytoplasmy hostitelské buňky. Po infekci hostitele vytvoří mikrosporidie další generaci, která je vyloučena z hostitele tělními tekutinami (Volf et Horák, 2007). Postiženy jsou enterocyty doudena, jejunum, rohovka, buňky ledvin, mozku, svaly (Bednář, 1999).

Infekční fáze parazita je schopna přežít nepříznivé podmínky životního prostředí hostitele a transport přes jeho žaludek (Pierce et Huston, 2009).

Mikrosporidie se vyskytují především u jedinců s narušenou imunitou, zvláště s defektem CD4⁺ lymfocytů (Šerý et Bálint, 1998). Mikrosporidie zodpovídají za onemocnění s vysokou úmrtností u osob s poruchami imunity (de Souza et Garcia-Zapata, 2006). Byly nalezeny jako původci infekčního onemocnění u pacientů s AIDS, avšak také u příjemců orgánů, dětí, cestovatelů, osob nosících kontaktní čočky, starších osob (Didier, 2005). Infikují široké spektrum organismů (Windsor, 1997). Spóry mikrosporidií jsou běžně v životním prostředí. Druhy patogenní pro člověka byly nalezeny ve vodě (Weis, 2001). Organismus se brání mikrosporidiím imunitní odpovědí typu Th1 (Mathews et al., 2009).

Výskyt mikrosporidií je geopolitní, endemický nebo sporadický. Nákaza se přenáší perorální cestou (Jíra, 2009).

Mezi významné lidské patogeny patří *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*,

Trachipleistophora hominis, *Trachipleistophora anthropophthera*, *Vittaforma corneae* (Volf et Horák, 2007).

Rod *Enterocytozoon* je typický svým překotným vývojem (Volf et Horák, 2007). Spóry měří 2,5 - 3,2 x 1,2 - 1,6 µm, polární vlákno obsahuje 4 - 7 závitů (Deplazes et al., 1996). *Enterocytozoon bieneusi* je jednobuněčný patogen způsobující lidské mikrosporidiiózy (Acosta et al., 2008, Widmer et Akiyoshi, 2010). Osidluje enterocyty duodena a jejunu, též sigmoideum, rektum, vzácně i epitel žlučových cest, vyvolává dlouhodobé průjmy (Šerý et Bálint, 1998).

Výskyt byl zaznamenán u imunokompromitovaných osob, u pacientů s AIDS, osob s neurologickými poruchami (Canning et Hollister, 1990, Sak et al., 2008). Multiorgánová mikrosporidiióza *E. bieneusi* je nejčastěji diagnostikována u HIV infikovaných pacientů, ve stolici, duodenální biopsii, výtoku z nosu a sputu (Pierce et Huston, 2009).

U osob s poruchou imunitního systému, pacientů s HIV+/AIDS a příjemců transplantátů vznikají chronické průjmy, anorexie, malabsorpce, porucha absorpce cukrů (Tumwine et al., 2002). Infekce *E. bieneusi* je nejčastěji diagnostikována u osob s počtem buněk CD4+ < 100 buněk/ mm³, stejně jako *E.intestinalis* (Okhuysen, 2001). Diseminovaná infekce se může projevit při hodnotě CD4+ < 50 buněk/mm³ (Walker et al., 2006). Gastrointestinální infekce vedou k chronickým průjmům, které nejčastěji postihují pacienty s AIDS v rozvojových zemích. Chronický průjem je spojen s úbytkem tělesné hmotnosti, snížením kvality života a zkrácením přežívání u HIV pozitivních pacientů. V Africe, ve spojení s chronickým průjmem zemřelo 72% nemocných. *Enterocytozoon bieneusi*, představují významnou příčinu chronického průjmu u pacientů s AIDS (Bern et al., 2005).

Mikrosporidie byly nalezeny po transplantaci, ale ve většině případů byly diagnostikovány až po smrti pacienta (Walker et al., 2006).

Enterocytozoon bieneusi působí histologické změny v duodenu, tenkém a tlustém střevě a také konečníku. Změny se projevují atrofií, prodloužením krypt, fúzí klků (Černý, 2008).

Encephalitozoon intestinalis, dříve *Septata intestinalis* (Franze et al. 1995) napadá enterocyty tenkého střeva, buňky lamia propria včetně endotelových buněk. Spóry prvoka měří 1,5 - 2,0 μm (Molina et al., 1995). Prostřednictvím makrofágů se infekce šíří do žlučových cest, plic, tubulárních buněk ledvin. Je příčinou průjmů a infekce u pacientů s AIDS (Franze et al., 1995). Diseminovaná forma se vyskytuje u nemocných s HIV (Molina et al., 1995).

V České republice byla prokázána séropozitivita u osob s rizikem nákazy HIV, 11 % séropozitivita u intravenózních uživatelů drog a 16 % u alkoholiků (Kučerová-Pospíšilová et Ditrich, 1998).

Velmi přínosné pro léčbu mikrosporidií u HIV infikovaných pacientů je užívání HAART (vysoce aktivní antiretrovirové terapie). V nemocnici St. Vincent v Sydney, podstoupili HIV infikovaní pacienti v letech 1995 až 2006 vyšetření na mikrosporidiózy. Vyšetřeno bylo celkem 3564 pacientů. Pozitivita byla prokázána u 159 pacientů. Většina pacientů byla těžce imunokompromitovaných (CD4^+ 105 buněk/ mm^3), přičemž pouze 16 % imunokompromitovaných pacientů užívalo HAART. 32 % pacientů zemřelo po stanovení mikrosporidiózy, 68 % pacientů s mediánem CD4^+ buněk/382 mm^3 , kteří přežili užívalo HAART. Snížení výskytu mikrosporidiózy potvrzuje účinnost HAART v prevenci imunodeficience a oportunních infekcí. Od roku 1995 od roku 2004 došlo ke snížení mikrosporidiózy z 11 % na 0 % (van Hal et al., 2007). Mikrosporidióza je problémem nejen u HIV pacientů, ale také u starších osob okolo 75. roku života (Lores et al., 2002).

Mikrosporidie lze barvit Giemsou, Calcofluorem. K diagnostice druhu lze použít PCR (Okhuysen, 2001).

Účinnou terapií v případě *E.intestinalis* je albendazol (Votava et al., 2003).

1.6 Kryptosporidie

Rod *Cryptosporidium* řadíme do kmene Apicomplexa. Kryptosporidie byly dříve řazeny ke kokcidiím. Molekulární genetika ukazuje, že nejbližší příbuzní jsou gregariny (Volf, et Horák, 2007).

Kryptosporidie mají velmi specifickou tkáňovou lokalizaci. Vyskytují se v mikrokličkách trávicího traktu, epitelu dýchacích cest, některé mohou parazitovat v epiteliální výstelce žaludeční stěny (Volf et Horák, 2007).

Kryptosporidie považujeme za příčinu průjmových onemocnění na celém světě, zejména mezi malými dětmi a pacienty s deficitem imunity (Chalmers et Davies, 2010).

U imunokompromitovaných jedinců, zvláště u nemocných s AIDS, onemocnění manifestuje v chronický průjem, jenž má za následek dehydrataci a malabsorpci (Černý, 2008).

Kryptosporidie způsobují rovněž gastroenteritidu. Závažnost onemocnění závisí na místě infekce, imunitním stavu jedince (Chalmers et Davies, 2010). Kryptosporidie podněcují neadaptivní imunitu, slizniční ochranná reakce brání množení parazitů, prostřednictvím lektinu vázajícího manózu (BML), (Kelly et al., 2000). Specifická imunita se projevuje zvýšením hladiny specifických imunoglobulinů (Pollok et al., 2001).

Inkubační doba se pohybuje v rozmezí od 2 do 10 dnů (Alcantara et al., 2000).

Kryptosporidie je endemická zoonóza, šířící se fekálně-orální cestou (Jíra, 2009).

Nejvýznamnějším zdrojem nákazy je *Cryptosporidium parvum* a *Cryptosporidium hominis* (Jíra, 2009).

Cryptosporidium parvum je monoxenní intestinální parazit (Jíra, 2009). Životní cyklus *C. parvum* prochází několika fázemi (Elliot et Clark, 2002).

Cryptosporidium parvum se nezanořuje do cytoplasmy, ale je od ní odděleno přichytnou ploškou, jenž představuje intracelulární kompartment v apikální oblasti enterocytu. V tomto rozhraní parazit-hostitel byla prokázána přítomnost aktinu a alfa-aktininu (Elliot et Clark, 2002). Tento protein váže aktin a v další fázi vývoje parazita mizí. Energetický metabolismus kryptosporidií je závislý na glykolýze (Jíra, 2009).

Z trofozoitů vznikají procesem merogonie meronti I. typu s 8 merozoity, kteří po rozrušení hostitelského enterocyty invadují další enterocyty. Meronty I. typu se formují v meronty II. typu a merozoity II. generace. Následujícím krokem je gametogonie. Při gametogonii vznikají makrogamonty a mikrogamonty s 16 pohyblivými mikrogametami. Po fertilizaci vzniká z makrogamet zygota a z ní oocysta (Tetley et al., 1998). Existují dva typy oocyst, tenkostěnné, zodpovědné za endoinvazi a silnostěnné, které jsou rezistentní k působení environmentálních vlivů (Jíra, 2009). Na přilnutí kryptosporidie ke střevnímu epitelu se účastní specifické lektiny Gal/GalNAc (galaktóza-N-acetylgalaktosamin), (Chen et Larusso, 2000). Na počátku infekce při excystaci se uplatňují cysteinové a serinové proteázy. *Cryptosporidium parvum* indukuje buněčnou programovanou smrt neinfikovaných buněk. U specifických hostitelů mohou sporozoiti vniknout do leukocytů a přežívat v parazitoforní vakuole, čímž si udržují svou infekčnost (Jíra, 2009).

Tento intracelulární prvok je příčinou průjmu u lidí a zvířat po celém světě (Denf et al., 2003). *Cryptosporidium parvum* primárně infikuje epiteliální buňky trávicího traktu, což vede k akutním vodnatým průjmům (Denf et al., 2003). Průběh je odlišný u imunokompetentních a imunodeficitních jedinců. U imunokompetentních jedinců vzniká akutní gastroenteritida se zvýšenou teplotou. U imunodeficitních jedinců kryptosporidíóza manifestuje v chronický průjem s dehydratací a malabsorpcí (Černý, 2008). *Cryptosporidium parvum* je spojeno s významnou morbiditou a mortalitou u pacientů se syndromem získaného selhání imunity (AIDS), (Denf et al., 2003). U HIV-infikovaných osob s počtem buněk CD4+ > 200 buněk/ml, může infekce spontánně vymizet, ale v pozdějších stádiích onemocnění HIV při poklesu CD4+ buněk, < 100 buněk/ml, onemocnění vede k dehydrataci, podvýživě, často s následkem smrti (Okhuysen, 2002). Výrazné rozmnožování parazita ve střevním epitelu vede k destrukci enterocytů (Bednář, 1999). Již 10 oocyst může způsobit infekci u zdravých osob, u imunokompromitovaných pacientů k vyvolání infekce stačí méně (Okhuysen, 2002).

Diagnostika kryptosporidií je založena na mikroskopickém průkazu oocyst ve stolici. Na fixované preparáty vývojových forem se používá barvení Giemsa-Romanovsky (Pavlásek, 1995), Ziehl-Neelsen a Miláček-Vítovec (Garcia, 1997). Pro průkaz protilátek se používá ELISA test (Kjos et al., 2005). Velmi spolehlivou metodou je PCR, s citlivostí záchytu < 10 oocyst (Morgan et Thompson, 1998).

Účinná terapie dosud není známa, zkouší se paromycin, azithromycin (Blanshard et al., 1997), u nemocných s průjmy nitazoxanid (Rossignol et al., 1998, 2001).

1.7 *Isospora belli*

Isospora belli náleží do kmene Apicomplexa, třídy Coccidea, řádu Eimeriida. Tato kokcidie je monoxenní parazit (Jíra, 2009).

Merogonie a gametogonie probíhá v buňkách epitelu duodena a jejunu (Restrepo et al., 1987). Sporozoit ze sporocysty a oocysty vnikne do hostitelské buňky, dojde k vytvoření parazitoformní vakuoly. Sporozoit se mění v mnohoaderný meront, který se dělí na řadu merozoitů, kteří se po vniknutí do buněk přemění v samčí a samičí gametocyty. Po uvolnění gamet a splynutí dochází ke vzniku silnostěnné zygoty, z které vzniká oocysta (Volf et Horák, 2007). Sporulace oocysty probíhá endogenně i exogenně (Restrepo et al., 1987).

Nákaza se šíří fekálně-orální cestou (Forthal et Guest, 1984). Onemocnění se nejvíce vyskytuje u homosexuálů (Forthal et Guest, 1984) a HIV pozitivních pacientů (Jíra, 2009). Imunokompetentní jedinci mohou prodělat nákazu bez příznaků (Callot et al., 1971). U imunokompromitovaných jedinců se isospora chová jako oportunní parazit, napadá střevní stěnu, působí chronické průjmy, nauzeu, dehydrataci, malabsorpční syndrom (Jíra, 2009). Může se objevit eozinofilie (Callot et al., 1971).

Izospóra je nejčastěji diagnostikována v tropech a v subtropích, převážně u HIV+ osob. V Zambii až 29 %, Senegal 15,3 %, Haiti 12 % (Jíra, 2009).

U dospělých osob s AIDS ve Venezuele byla *I. belli* diagnostikována u 14 % osob, u 98 % osob se vyskytoval chronický nebo akutní průjem. U 81,25 % osob byl počet CD4+ buněk $< 200/\text{mm}^3$ (Cerdad et al., 2003).

Pro diagnostiku je nejpřínosnější střevní biopsie (Boldorini et al., 1996). Oocysty barvíme dle Ziehl-Neelsena, Uvitexem (Frazen et al., 1996). K průkazu se také používá PCR (Müller et al., 2000).

Nákaza je citlivá na léčbu kotrimoxazolem (Ebrahimzadeh et Bottone, 1996).

1.8 Cyclospora cayetanensis

Cyclospora cayetanensis je enteropatogenní kokcidie, kterou řadíme do kmene Apicomplexa, třídy Coccidea, řádu Eimeriida (Jíra, 2009).

Nachází se v enterocytech duodena a jejunu (Smith et al., 1997). Schizonti obsahují 4 – 12 merozoitů (Jíra, 2009). Sporulace je exogenní po dobu 1 až 2 týdnů. Vyloučené oocysty tedy nejsou infekční (Smith et al., 1997). Oocysty jsou kulovité, měří 8 – 10 μm (Jíra, 2009). Oocysta rodu *Cyclospora* obsahuje dvě sporocysty se Stiedovými tělísky a každá sporocysta obsahuje dva sporozoity. Stiedovo tělísko je místo, kudy sporozoiti při excystaci vylézají (Volf et Horák, 2007).

Zdrojem nákazy je fekálně kontaminovaná voda a potrava (Katz, et al., 1999). Přítomnost byla prokázána u asymptomatických nosičů, imunokompetentních osob i imunodeficitních ve formě epidemie (Sifuentes-Osorio et al., 1995). Onemocnění se vyskytuje v asociaci s *C. parvum* (Jíra, 2009). Hojně se vyskytuje v klimaticky teplých oblastech (Volf et Horák, 2007). V ČR byla nákaza diagnostikována u skupiny turistů po pobytu v USA a Mexiku (Rubík et Tolarová, 1997) a v období mezi lety 1997 - 2004 u 16 importovaných jedinců (Tolarová, 2005).

Inkubační doba je 2 - 11 dnů. Nákaza způsobuje vodnaté průjmy s abdominálními křečemi, nauzeu, zvracení (Gascon et al., 1995). U nemocných s imunodeficitem jde o prolongované onemocnění s častými recividami (Jíra,

2009). U postižených může dojít k alkalózní cholecystitidě se zvýšením alkalické fosfatázy (de Górdolas et al., 2001).

Diagnóza se potvrdí průkazem oocyst ve stolici, doporučuje se flotační metoda (Kimura et al., 2004).

Léčit lze kotrixomazolem nebo ciprofloxacinem (Jíra, 2009).

1.9 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii patří do kmene Apicomplexa, třídy Coccidea, řádu Eimeriida, čeledi Toxoplasmatidae (Volf et Horák, 2007, Jíra, 2009).

Toxoplasma gondii je intracelulární parazit (Miller et al., 2007). Biologický cyklus *T. gondii* je charakteristický střídáním konečného hostitele, jímž je kočkovitá šelma a meziphostitele, které mohou představovat teplokrevní obratlovci včetně člověka (Jíra, 2009).

Izosporová pohlavní fáze probíhá v enterocytech konečného hostitele, tedy kočkovité šelmy (Jíra, 2009). Po požití infikovaného jídla kočkovitou šelmou, obsahující pseudocysty nebo oocysty, bradyzioti nebo sporozoiti penetrují do epiteliálních buněk a dochází k diferenciaci v merozity. Merozoit diferencuje v makrogamety a mikrogamety, po jejich splynutí dochází k tvorbě zygoty – oocysty (Despommier et Karapelou, 1987). Oocysta obsahuje dvě sporocysty a každá obsahuje čtyři sporozoity. Infekční stádium *T. gondii* je vyloučeno do prostředí. *T. gondii* má dvě infekční stadia, kterými se lze nakazit. Zralá oocysta v trusu nakažených koček a tkáňová cysta, která se vytvoří ve tkáni náhodného hostitele (Votava et al., 2003).

Nepohlavní cyklus má dvě fáze růstu v závislosti na tom, zda je infekce akutní či chronická. Tachyzoit představuje rychle rostoucí fázi parazita během akutní fáze toxoplasmózy (Black et Boothroyd, 2000). Tachyzoiti se množí procesem endodygonie. Při tomto procesu množení se začne dělit jádro a postupně vznikají organely dvou dceřiných jedinců, poté se mateřská buňka rozpadne. Při vzniku více jak dvou dceřiných buněk proces označujeme endopolygonický (Goldman et al., 1958). Pseudocysta obsahuje parazity ve fázi

dělení, obsahuje menší počet parazitů, tvoří se nejčastěji v akutním stadiu infekce. Po rozpadu pseudocysty se tachyzoiti uvolňují do hostitelské tkáně (Botero-Kleiven et al., 2001). Tkáňová cysta charakterizuje chronickou fázi (Black et Boothroyd, 2000). Tkáňová cysta je pokryta elastickou membránou, která je velmi odolná vůči působení trávicích tekutin a chrání tak parazity před působením stresových faktorů. Cysta obsahuje bradyzoity (Radke et al., 2003). Bradyzoiti infikují střevní lumen (Black et Boothroyd, 2000).

Nákaza se šíří fekálně-orální cestou, kapénkovou infekcí, oděrkami v kůži po manipulaci s infekčním materiálem (Jíra, 2009).

Nákaza *T. gondii* u nás patří k nejrozšířenějším parazitózám. Toxoplasmóza může být získaná nebo vrozená. V případě vrozené infekce se u infikovaného dítěte může objevit kalcifikace mozku, hydrocephalus, poruchy zraku a malformace (Kořínková, 2006).

Akvirovaná forma představuje onemocnění, k němuž dochází postnatálně. Rozlišujeme několik forem, uzlinovou formu, neurotoxoplazmózu, oční toxoplazmózu, septickou formu a postižení orgánů (Jíra, 2009).

V centru infikované zóny nacházíme nekrotická ložiska s parazity v okolí. Nekrózy mohou dosáhnout velikosti až 2-3 mm. Starší ložiska mohou kalcifikovat (Jíra, 2009).

V České republice byl proveden výzkum seroprevalence toxoplasmové infekce u vojenského personálu. Pozitivita byla prokázána u 23 %. K přenosu toxoplasmózy pravděpodobně došlo konzumací syrového masa, při kontaktu s kočkou (Koubelkova et al., 2007). Vyšší prevalence byla prokázána u osob žijících na venkově. Screeningová komplementfixační reakce prokázala přítomnost protilátek u 24,8% Pražanů a 41,7% u venkovských oblastí (Zítek, 1998).

Toxoplasmóza je jednou z nejvýznamnějších oportunních infekcí u pacientů s HIV/AIDS. Toxoplasmová encefalitida je jednou z příčin morbidity a mortality u těchto pacientů. V důsledku terapie HAART však došlo k snížení celkové incidence encefalidity (Nissapatorn, 2009).

Obrana organismu proti *T. gondii* je zajištěna vrozenou imunitou, tedy neutrofilů a trombocytů. Toxoplasmózy mohou penetrovat do neutrofilu, tím unikají fagocytóze. Takto infikované neutrofilů nemohou parazity usmrctvat, ale zpomalují jejich dělení (Subauste et Wessendarp, 2000).

Toxoplasma gondii stimuluje B-buňky k sekreci imunoglobulinů třídy IgG, IgM a IgE. IgA tlumí průnik parazita sliznicí (Garweg et al., 2000). Tato získaná, adaptativní protilátková imunitní reakce je účinná pouze v akutní fázi nákazy (Fatoohi et al., 2003). Významnou úlohu hrají T-buňky (Mun et al., 2002). IL-12 a IFN- β stimuluje CD8 lymfocyty. Ochranný účinek je zprostředkován tvorbou IFN- γ , jenž aktivuje lymfocyty, cytotoxickou aktivitou a přímým cytotoxickým účinkem.

Vyčerpání CD4+ lymfocytů podporuje infekci a zvyšuje parazitární zátěž (Denkers, 1996). Paraziti přežívají celoživotně ve formě tkáňové cysty v různých orgánech a tkáních hostitele (Chanon et al., 2002).

Klinické formy toxoplasmózy jsou vypsány v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2: **Klinické formy toxoplasmózy s vybranými klinickými příznaky**

Toxoplasmóza		Klinické příznaky	
Získaná	akutní	inaparentní	vznik séropozitivity
		abortivní	chřipkovité onemocnění
		uzlinová	zduření lymfatických uzlin
		oční	chorioretinitida
		nervová	meningoencefalitida
		viscerální	pneumonie
	chronická	únavový syndrom	únavnost, bolest hlavy
		gynekologická	opakované potraty
	reaktivace (při imunodeficienci)		ložisková encefalitida
Vrozená	odumření plodu	potrat	
	inaparentní	séropozitivita dítěte	
	oční	katarakta, strabismus	
	mozková	hydroencefalus	
	viscerální	hepatitida	

(Havlík et al., 2002)

K průkazu toxoplazmové nákazy se s výhodou používá metoda PCR. Dále také ELISA, imunofluorescence, hemaglutinační reakce (Havlík et al., 2002).

Základem léčby je kombinace pyrimatamiu se sulfoamidem (Havlík et al., 2002).

1.10 *Pneumocystys jiroveci*

Molekulární fylogenetika prokázala, že *Pneumocystys jiroveci* je kvasinková houba ze skupiny Hemiascomycotina (řád Pneumocystidales), (Volf et Horák, 2007). *Pneumocystis jiroveci* má dvě životní formy, trofozoit a cysta.

Obě můžeme nalézt v infikované plicní tkáni (Garcia et Bruckner, 1997). Trofozoit má amébovitý tvar velikosti 5 μm s tubulárními výběžky na povrchu. Po vdechnutí nasedá na alveoly pneumocytů a pomocí tubulárních výběžků se zanořují. Trofozoit se množí příčným dělením, stěna trofozoitu se ztlušťuje a vzniká silnostěnná cysta. Cystě předchází stádium precysty, kdy stěna není ještě dostatečně tlustá (Votava et al., 2003).

Pneumocystys jiroveci vyvolává pneumocystózu. U hostitele s imunodeficitem mohou buňky zaplnit plicní sklípky a způsobit smrt hostitele (Volf et Horák, 2007).

Rezervoárem a zdrojem onemocnění pro člověka jsou domácí zvířata a hlodavci. Nákaza se přenáší vzdušnou cestou. Pneumocystózou jsou postiženi pacienti s AIDS, kojenci, pacienti po transplantaci, léčení a po léčbě kortikoidy a imunosupresivy. Onemocnění je charakterizováno plasmocelulární pneumonií. Pneumocystóza byla diagnostikována u homosexuálů s AIDS (Černý, 2008). Pneumocystóza se může objevit u starších dětí nebo dospělých při poklesu CD4+ buněk pod $200/\text{mm}^3$ (Garcia et Bruckner, 1997).

Diagnostika je možná přímou fluorescencí, PCR (Hauser et al., 2011). K mikroskopickému průkazu BAL se používají speciální barvení, Giemsa, toluidinová modř, stříbření dle Grocotta. Nepřímý serologický průkaz nemá větší význam (Votava et al., 2003).

Pneumocystóza se léčí kotrimoxazolem nebo pentamidinem (Volf et Horák, 2007).

1.11 Entamoeba histolytica

Entamoeba histolytica neboli měňavka úplavičná (Volf et Horák, 2007), patří do kmene Amoebozoa, třídy Entamoebidea, řádu Entamoebida (Jíra, 2009).

Entamoeba histolytica má 2 životní formy (Clark et Roger, 1995). Měňavka opouštějící cystu obsahuje 4 jádra, dělení vede ke vzniku trofozoitů formy minuta (Volf et Horák, 2007). Cysta představuje klidovou životní formu, má kulovitý tvar, měří 8 - 20 μm (Ghosh et al., 1999). Forma minuta měří 10-16

μm, vyskytuje se mimo epizody průjmu. Uvádí se, že jde o neinvazivní prekurzor cysty (Ghosh et al., 1999). Poté se forma minuta dělí, dochází k adhezi na sliznici střeva a vzniká forma magna, která proniká do submukózy a množí se v podslizničním vazivu (Volf et Horák, 2007). Trofozoity formy magna představuje invazivní stadium, je protaženého tvaru, velikosti 20 - 40 μm (Clark et Roger, 1995).

Virulence a invaznost trofozoitů entaméb jsou zprostředkovány několika faktory. Lektin, uváděný jako Gal/GalNAc, je glykoprotein zprostředkovávající adhezi k střevnímu epitelu a likvidaci efektorových buněk (Adler et al., 1995). Cysteinové proteázy jsou významným faktorem virulence, narušují epitelovou bariéru střeva a ochrannou vrstvu mucinu na střevních epitelích (Moncada, et al., 2003). Entaméby degradují IgA (Que et al., 2003).

Inkubační doba amébozy je 1 - 4 týdny. Rozlišujeme několik klinických forem onemocnění. U amébové dyzenterie postižení trpí těžkými průjmy s příměsí krve a hlenu. Neléčená nákaza může přejít do chronického stadia. Zejména u oslabených osob dochází k akutnímu fulminantnímu průběhu, horečkám, pocením, dehydratací. V ojedinělých případech dochází k perforaci střeva (Jíra, 2009). Améboom je charakteristický rozšířením léze do stěny ilea, infekce vyvolává zánětlivý otok (Jíra, 2009). Při extraintestinální manifestaci je nejčastější postižení jater (Wells et Arguedas, 2004). Amébový jaterní absces se objevuje asi u 2 % osob (Peters et Bienzel, 1981). Améba může diseminovat do mozku (Okhuysen, 2001).

Améboza se vyskytuje po celém světě, daleko více však v zemích teplého klimatu, s nedostatkem nezávadné pitné vody. Ve vyspělých zemích mírného klimatu jde zpravidla o importovanou nákazu (Havlík et al., 2002).

Diagnostika se opírá o přímý mikroskopický průkaz z čerstvé stolice v nativním preparátu (Votava et al., 2003). Dále se používá barvení Ziehl – Neelsen, barvicí metoda trichromem, imunofluorescence a PCR (Wumba et al., 2010). Pro průkaz specifických antigenů a protilátek lze užít metodu ELISA (Votava et al., 2003)

V případě invazivních onemocnění jako je kolitida, absces, by měli být pacienti léčeni metronidazolem, efektivním lékem je též tinidazol (Okhuysen, 2001)

1.12 *Strongyloides stercoralis*

Strongyloide stercoralis neboli hádě střevní, je cizopasníkem člověka, ale také psa. Radíme jej mezi hlístice, třídy Secernentea a řádu Rhabditida.

Parazitickou formou jsou pouze samičky produkující vajíčka (Volf et Horák, 2007). *Strongyloides stercoralis* má složitý životní cyklus, probíhající ve střevě hostitele a volně v prostředí. Nejprve se vyvíjejí rhabditiformní larvy L1, které se mohou přeměnit přímo do druhé L2 fáze a třetí filariformní L3. Volně žijící dospělé samičky a samci se mohou množit a produkovat L1, které se vyvinou do stadia L3. L3 může proniknout kůží hostitele do plic, dýchacích cest a nakonec do střeva, kde dozrávají vajíčka (Siddiqui et Berk, 2001).

Tento drobný červ, velikosti 2 x 0,4mm, zpravidla parazituje na sliznici jejunu (Černý, 2008).

Larvy *S. stercoralis*, které se vyvinou během infekční etapy v zažívacím traktu, mohou někdy proniknout střevní sliznicí do tenkého střeva. Tato schopnost opakovat cyklus vede k chronickému průběhu infekce (Siddiqui et Berk, 2001).

Vyskytuje se převážně v tropech a subtropích. K nákaze dochází alimentární cestou (Černý, 2008). Infekce *S. stercoralis* postihuje 50-100 milionů lidí na celém světě (Marty et al., 2005). Vyšší výskyt *S. stercoralis* byl hlášen u chronického alkoholismu. Výskyt *S. stercoralis* stoupá u alkoholiků s množstvím ethanolu (Marques et al., 2010).

Klinické projevy onemocnění jsou velmi pestré. V invazivní fázi se objevuje kopřivka a alergie v místě vniku larvy do organismu. Kašel, dýchací obtíže charakterizují plicní fázi. V gastrointestinální fázi jsou bolesti břicha i epigastriu, nevolnost, zvracení, průjemy s příměsí krve (Černý, 2008). Multiorgánového šíření s vysokou úmrtností je především u pacientů s infikovanými T-buňkami virem HTVL-1, u pacientů, kteří dostávají

kortikosteroidy, podstupují chemoterapii nebo jsou po transplantaci (Marty et. al., 2005).

Diagnostika se opírá o nález pohyblivých larev ve stolici.

Terapie je možná azolovými preparáty (Černý, 2008).

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo shromáždit biologický materiál (stolice) pacientů závislých na alkoholu a vyšetřit jej na přítomnost oportunních parazitů. U vybraného materiálu izolovat DNA a pomocí PCR vyšetřit materiál na přítomnost oportunních parazitů a pozitivní izolát genotypizovat.

2.2 Hypotézy

H₁: Výskyt oportunních parazitů u alkoholiků bude vyšší, alkohol narušuje imunitní systém, což může způsobit zvýšenou vnímavost k určitým infekcím.

H₂: Výskyt oportunních parazitů bude u alkoholiků srovnatelný s jedinci imunokompletními, závislost na alkoholu se neodráží na výskytu oportunních parazitů.

3. Metodika

3.1 Charakteristika sledovaného souboru

Sledovaný soubor se skládal z 28 vzorků stolice. Z celkového množství dárců byli 4 dárce (14%) z Psychiatrické léčebny Červený Dvůr, tito pacienti podstupují obvykle 3 měsíční intenzivní odvykací léčbu. Odběr materiálu u těchto pacientů byl předem konzultován s ošetřujícím lékařem. Věkové rozmezí pacientů Psychiatrické léčebny Červený Dvůr bylo od 25 let do 59 let. 16 osob (57%) závislých na alkoholu bylo z terénu, převážně z oblasti Moravy. Pacienti závislí

na alkoholu z terénu, jsou léčeni ambulantně v psychiatrické ordinaci. U pacientů z terénu bylo věkové rozmezí 20 až 70 let. Výzkumu se zúčastnilo 5 pacientů (18 %) z psychiatrického oddělení Ústřední vojenské nemocnice Praha, 3 pacienti (11 %) z Psychiatrické léčebny Havlíčkův Brod. Převážně se jednalo o stabilizované pacienty, kteří již alkohol nekonzumují. Všichni dárci byli starší 18 let. Sledovaný soubor tvořili muži i ženy. Údaje daných skupin pacientů nejsou jednotné, vzhledem k anonymnímu poskytnutí vzorku. Pacienti dle svého uvážení uvedli pohlaví a věk.

V průběhu výzkumu bylo osloveno několik léčeben. Na spolupráci přistoupila pouze Psychiatrická léčebna Červený Dvůr, Psychiatrická léčebna Havlíčkův Brod a psychiatrické oddělení Ústřední vojenské nemocnice Praha. Odmítnutí bylo zdůvodněno nedostatkem času institucí, hospitalizací pacientů v deliriu, agresivními pacienty, se kterými by spolupráce byla velmi obtížná. Množství materiálu odráží také neochotu pacientů účastnit se vyšetření oportunních parazitů.

Všichni pacienti byli informováni o správném odběru materiálu, hygienických podmínkách a následném vyšetření vzorků.

3.2 Odběr vzorků

K vyšetření jsem použila vzorky nativní stolice. Vzorky stolice byly odebrány do sběrových nesterilních nádob. Vzorky byly před zpracováním uchovány v chladu, transport probíhal pomocí přenosného chladičového boxu.

Jsem si vědoma vlivu uskladnění, transportu a časového intervalu mezi odběrem a zpracováním na výsledky výzkumu.

3.3 Metody parazitologického vyšetření

Vzorky stolice byly vyšetřeny barvicími metodami Miláček-Vítovec a Calcofluorem, dále koncentrační metodou M.I.F.C a molekulárně genetickou metodou PCR (polymerázové řetězové reakce).

3.3.1 Mikroskopické vyšetření stolice

3.3.1.1 M.I.F.C.

Metoda M.I.F.C spočívá v mertiolátové-jodivé-formaldehydové koncentraci, která je považována za univerzální sedimentační metodu. Slouží k diagnostice vývojových stadií prvoků případně helmintů.

Pracovní roztoky:

- 1) roztok MIF (500 ml H₂O; 50 ml 40 % formaldehydu; 400 ml 0,1 % roztoku mertiolátu sodného; 10 ml glycerinu)
- 2) Lugolův roztok (1 g krystalického jodu; 2 g KJ; 100 ml H₂O)

Postup:

1. Homogenizovat vzorek stolice (velikosti hrachu) s 5ml MIF a 1ml Lugolova roztoku.
2. Homogenní směs přefiltrovat přes gázu.
3. K přefiltrovanému extraktu přidat 6 ml éteru, roztřepat, zcentrifugovat 2 min při 1 500 ot/min.
4. Vzniklý prstence uvolnit za pomoci špejle a vzorek slít.
5. Prohlédnout sediment.

Sediment se prohlíží světelným mikroskopem (OLYMPUS IX70) při objektivu 40x.

3.3.1.2 Barvení dle Miláčka-Vítovce

Tato metoda slouží k diagnostice oocyst kryptosporidií ve stolici.

Pracovní roztoky:

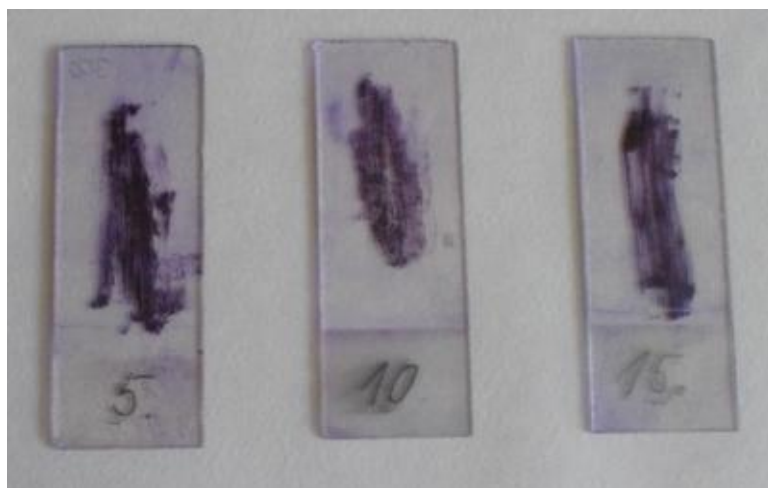
- 1) roztok methylvioleti (methylviolet 1,2 g; anilin 2 g; fenol 2 g; ethanol 60 ml; destilovaná voda 140 ml)
- 2) kyselina sírová (1 - 2 % vodný roztok)
- 3) tartrazin (1 % tartrazin v 1 % kyselině sírové)

Postup:

1. Rozetřít vzorek stolice na podložní sklo, vytvořit rovnoměrný nátěr.
2. Faxovat methanolem v plameni.

3. Barvit roztokem methylvioleti, 30 minut.
4. Opláchnout vodou.
5. Diferenciovat 2 % kyselinou sírovou.
6. Opláchnout vodou.
7. Dobarvit tartrazinem.
8. Opláchnout vodou a usušit.

Preparát prohlížíme světelným mikroskopem (OLYMPUS IX70) za použití olejové imerze, při objektivu 100x.



Obr. 1: Preparát stolice nabarvený barvením Miláček-Vítovec

3.3.1.3 Barvení calcofluorem

Metoda barvení calcofluorem slouží k detekci mikrosporidií.

Pracovní roztoky:

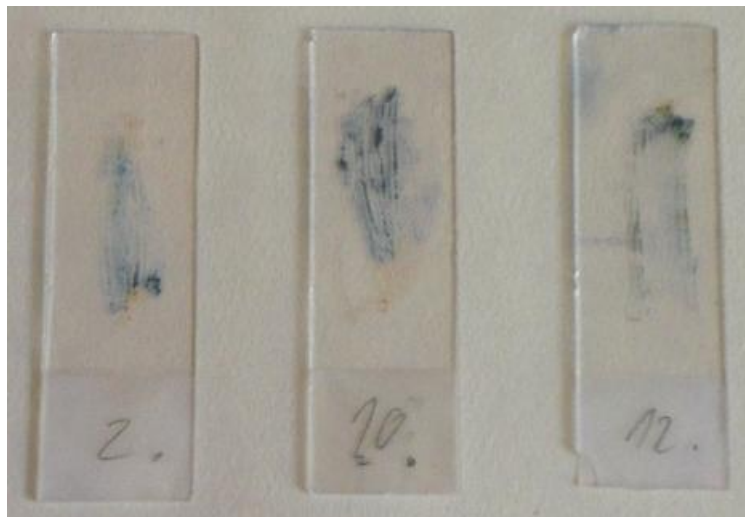
- 1) 0,1 % Calcofluor (Calcofluor 0,1 g; PBS 100 ml; pH 7,2)
- 2) 0,5 % Evansova modř (Evansovy modře 0,5 g; PBS 100 ml; pH 7,2)

Postup:

1. Rozetřít vzorek stolice na podložní sklo, vytvořit rovnoměrný nátěr.
2. Fixace methanolem 3 minuty, nechat zaschnout.
3. Barvit 0,1 % Uvitexem, 10 minut.

4. Opláchnout vodou.
5. Dobarvit 0,5 % roztokem Evansovy modře 5 sekund.
6. Opláchnout ve vodě, nechat zaschnout.

Preparát prohlížíme fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX 70) při vlnové délce 490 nm olejovou imerzí při zvětšení 1000x.



Obr. 2: Preparát stolice barvený Calcofluorem



Obr. 3: Mikroskop OLYMPUS IX 70

3.3.2 Molekulární diagnostika

3.3.2.1 Izolace DNA ze vzorku stolice

Izolace DNA byla provedena pomocí komerčního kitu QIAamp DNA Stool.

Pracovní postup:

1. Do eppendorfký navážit 180 – 200 mg (velikost hrášku) vzorku stolice.
2. Přisypat skleněné kuličky o průměru 0,5mm.
3. Připipetovat 1 ml Buffer ASL, vortexovat 1 minutu, dokonale zhomogenizovat.
4. Rozbít v mini beadbeateru, 2 minuty při max. rychlosti (120 s/5 000 kmitů).
5. Inkubovat 5 minut při 70°C v inkubačním bloku.
6. Vortexovat 15 s, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti.
7. Maximum supernatantu přenést do čisté mikrozkušavky (pelet vyhodit).
8. Přidat ½ inhibiční EX tablety, vortexovat 1 minutu (dokonale rozpustit), inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě.
9. Centrifugovat 3 minuty při max. rychlosti.
10. Přepipetovat veškerý supernatant do nové eppendorfký, znovu centrifugovat 3 minuty při max. rychlosti. Napipetovat 15 µl proteinase K do čisté mikrozkušavky a přidat 200 µl supernatantu.
11. Přidat 200 µl Buffer AL, vortexovat 15s.
12. Inkubovat 10 minut při 70°C v inkubačním bloku.
13. Přidat 200 µl 96% etanolu, vortexovat.
14. Přepipetovat lyzát na QIAamp kolonu opatřenou sběrnou zkušavkou, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti.
15. Přidat 500 µl Buffer AW1, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti, vyměnit sběrnou zkušavku.
16. Přidat 500 µl Buffer AW2, centrifugovat 3 minuty při max. rychlosti.

17. Přenést kolony na čistou mikrozkušavku, napipetovat 200 μ l BufferAE přímo na membránu, inkubovat 1 minutu při lab.teplotě, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti.

Získanou DNA uchovávat při - 20°C.



Obr. 4 : Homogenizátor (FastPrep®-24, M. P. Biomedicals, CA, USA)



Obr. 5 : Inkubační blok



Obr. 6 : Centrifuga na mikrozkušavky

3.3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metodou PCR je možno získat velké množství kopií určitého úseku molekuly DNA pomocí primerů. Metodou PCR amplifikujeme část genu. V tomto případě genu ITS.

Celkový objem reakční směsi pro každou PCR byl 25 µl (Tab. 2). Byly provedeny dvě sady PCR s různými sety primerů, jedna pro průkaz přítomnosti *E. bienusii* a druhá pro průkaz *Encephalitozoon* spp. Součástí každé sady PCR byla pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA vyizolovaná z kultury *E. intestinalis* a *E. bienusii*.

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

Roztok	Objem (µl)
Deionizovaná voda	13,87
Pufr	2,5
MgCl ₂	1,5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
D´NTP ₃	0,5
Taq polymeráza	0,63
Templátová DNA	5
Celkem	25

Tab. 3: **Primery pro *Enterocytozoon bienusii***

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

Tab. 4: **Primery pro *Encephalitozoon* spp.**

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

Amplifikační program na termocykleru (Little Genius, BIOER, obr. 7) pro primery MSP:

1. Počáteční denaturace 95°C, 3 min.
2. Denaturace při 94°C, 45 s.
3. Nasedání primerů při 55°C, 45 s.
4. Syntéza nového řetězce při 72°C, 1 min.
5. Dosyntetizování nového řetězce při 72 °C, 10 min.

Celkem proběhlo 40 cyklů.



Obr. 7 : **Termocykler (Little Genius,BIOER)**

3.3.2.3 Gelová elektroforéza (ELFO)

Při gelové elektroforéze dochází k rozdělení DNA fragmentů v agarózovém gelu podle molekulových hmotností působením elektrického pole. Touto metodou byla ověřena délka DNA fragmentů.

Použité roztoky:

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

Pracovní postup:

1. Agarozu s TAE pufrém rozehtát v mikrovlnné troubě.
2. Ochladit pod tekoucí vodou.
3. Připipetovat 1 pl Erbe, aby výsledná koncentrace byla 0,5 µg/ml.
4. Dobře promíchat a nalít do připravené vaničky s držákem a hřebenem.
5. Gel nechat ztuhnout přibližně 5 - 10 minut.
6. Gel vložit do elektroforetické vany tak, aby starty byly vlevo u záporné elektrody.
7. Do jamek napipetovat 25 µl produktu PCR a při napětí 70 V nechat vyvíjet potřebnou dobu pro vytvoření fragmentů DNA.
8. Rozdělené fragmenty vizualizovat pod UV transiluminátorem při vlnové délce 302 nm.

Fragmenty DNA byly zaslány na sekvenaci do Laboratoře genomiky BC AVČR. Fylogenetická analýza byla provedena v Biologickém centru AV ČR v Českých Budějovicích (neprováděno autorkou).



Obr. 8 : Vana na elektroforézu

3.3.2.4 Extrakce z gelu (*MinElute Gel Extraction Kit Protokol*)

Pracovní postup:

1. Vyříznout fragment DNA z gelu čistým skalpelem. Dát do připravené eppendorfky, prázdnou eppendorfku předem zvážit.
2. Zvážit eppendorfku s fragmentem gelu a připipetovat 3 objemy QG pufru. Inkubovat 10 minut při 50°C, kontrolovat rozpouštění, míchat každé 2 – 3 minuty během rozpouštění.
3. Po rozpouštění musí být v eppendorfce žlutý roztok.
4. Připipetovat 1 objem isopropanolu do eppendorfky.
5. Přepipetovat veškerý objem na kolonu a centrifugovat 1 minutu při max. g.
6. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použít s kolonou.
7. Připipetovat 500 μ l QG pufru a centrifuguj 1 minutu při max. g.
8. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použít s kolonou.
9. Promýt připipetováním 750 μ l PE pufru na kolonu, inkubovat 2 - 5 minut při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při max. g.
10. Vylít odpad ze sběrné zkumavky, centrifugovat 1 minutu při max. g.
11. Kolonu dát do 1,5 ml eppendorfky a provést eluci napipetováním 30 μ l EB pufru.
12. Inkubovat 1 minutu a poté centrifugovat 1 minutu při max. g.

3.4 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky byly statisticky zpracovány za pomoci Fisherova exaktního testu v kontingenční tabulce.

4. Výsledky

4.1 Mikroskopické a molekulární vyšetření stolice

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

Metodou M.I.F.C. nebyla prokázána přítomnost žádného parazita.

4.1.2 *Výsledky vyšetření stolice barvením dle Miláčka a Vítovce*

Barvením dle Miláčka a Vítovce nebyla prokázána přítomnost oocyst kryptosporidií.

4.1.3 *Výsledky vyšetření stolice barvením Calcofluor*

Výsledky vyšetření stolice barvením Calcofluor znázorňuje tabulka Tab. 5.

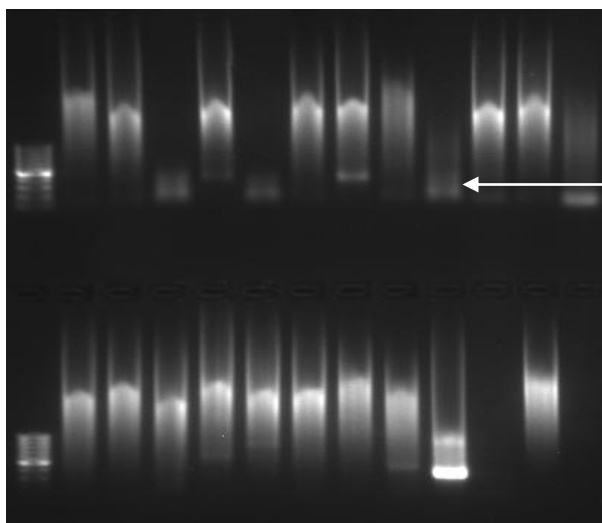
Tab. 5: Výsledky vyšetření stolice barvením Calcofluor

Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení
1	-	15	-
2	-	16	-
3	-	17	+ <i>Nepotvrzeno</i>
4	-	18	-
5	-	19	-
6	-	20	-
7	-	21	-
8	-	22	-
9	-	23	-
10	-	24	-
11	-	25	-
12	-	26	-
13	-	27	-
14	-	28	-

V tabulce Tab. 5 jsou znázorněny výsledky vyšetření barvením Calcofluor. Vzorek číslo 17 vykazoval známky positivity na mikrosporidie. Tento nález však nebyl potvrzen metodou PCR. Neshoda byla pravděpodobně způsobena záměnou mikrosporidií za kvasinky nebo jiné střevní parazity, kteří pod UV světlem fluoreskují totožně.

4.1.4 Nálezy mikrosporidií metodou PCR

Pomocí PCR bylo vyšetřeno všech 28 vzorků stolice. Z celkového množství byly 3 fragmenty DNA zaslány na sekvenaci do Laboratoře genomiky BC AVČR. Fylogenetická analýza byla provedena v Biologickém centru AV ČR v Českých Budějovicích.



Obr. 9: **Pozitivní výsledek gelové elektroforézy (*Encephalitozoon* sp.)**

Na Obr. 9 je fotografie pozitivní gelové elektroforézy, šipkou je znázorněn pozitivní vzorek.

4.1.5 *Vyhodnocení výsledků sekvenace a fylogenetické analýzy*

Sekvenace a fylogenetická analýza (neprováděno autorkou) potvrdila přítomnost rodu *Encephalitozoon*. Jedná se konkrétně o *E. cuniculi* genotyp I.

4.1.6 *Výsledky vyšetření sledovaného souboru jednotlivými metodami*

V Tab. 6 jsou znázorněny výsledky vyšetření všech metod, které byly použity při vyšetření sledovaného souboru.

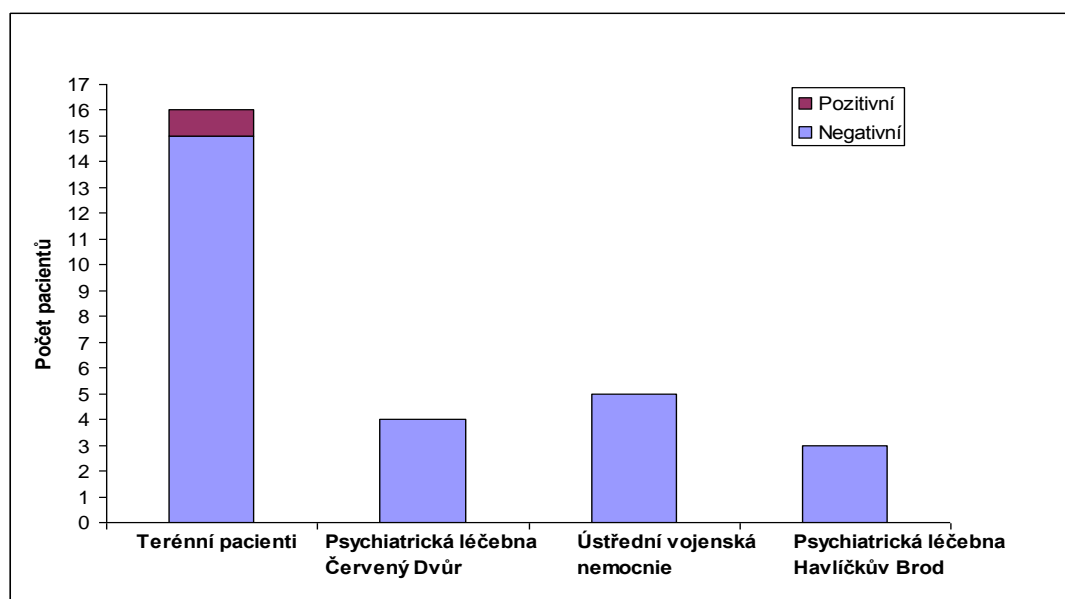
Tab. 6: Výsledky vyšetření sledovaného souboru jednotlivými metodami

Vzorek	Vzhled stolice	M.I.F.C	Miláček-Vítovec	Calcofluor	PCR
1	Pevná	-	-	-	-
2	Pevná	-	-	-	-
3	Pevná	-	-	-	-
4	Pevná	-	-	-	-
5	Pevná	-	-	-	-
6	Pevná	-	-	-	<i>Encephalitozoon sp.</i>
7	Pevná	-	-	-	-
8	Pevná	-	-	-	-
9	Pevná	-	-	-	-
10	Pevná	-	-	-	-
11	Pevná	-	-	-	-
12	Pevná	-	-	-	-
13	Pevná	-	-	-	-
14	Pevná	-	-	-	-
15	Pevná	-	-	-	-
16	Pevná	-	-	-	-
17	Měkká	-	-	<i>+Nepotvrzeno</i>	-
18	Pevná	-	-	-	-
19	Pevná	-	-	-	-
20	Pevná	-	-	-	-
21	Pevná	-	-	-	-
22	Pevná	-	-	-	-
23	Pevná	-	-	-	-
24	Pevná	-	-	-	-
25	Pevná	-	-	-	-
26	Pevná	-	-	-	-
27	Pevná	-	-	-	-
28	Pevná	-	-	-	-

Tabulka znázorňuje výsledky všech provedených vyšetření. Kdy u vzorku číslo 17 byla pozitivita na mikrosporidie, která však nebyla potvrzena PCR.

Naopak u vzorku číslo 7 byla zjištěna pozitivita na mikrosporidie metodou PCR, ale preparát barvený barvením Calcofluor nevykazoval známky přítomnosti mikrosporidií.

4.1.7 Přehled pozitivních vzorků na mikrosporidie u jednotlivých skupin pacientů



Obr. 10: Přehled pozitivních vzorků na mikrosporidie u jednotlivých skupin pacientů

Na Obr. 10 můžeme vidět počet pacientů jednotlivých zařízení, kteří přistoupili na spolupráci. U jednotlivých skupin je znázorněn výsledek vyšetření na mikrosporidie. Pozitivní vzorek byl pouze u pacienta z terénu. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami nejsou statisticky významné ($p < 0,05$).

5. Diskuze

Zneužívání alkoholu má nepříznivé účinky na náš imunitní systém. Nadměrná konzumace alkoholu způsobuje náchylnost k některým infekčním a bakteriálním onemocněním. Tyto infekce mají tendenci být kontinuální a jsou často spojovány s vysokou mírou úmrtnosti. Alkohol způsobuje snížení humorální a buněčné imunitní odpovědi, a tím vážně omezuje obranyschopnost organismu vůči infekčním agens (Pavia et al., 2004). Právě humorální a buněčná imunitní odpověď hraje roli v obraně proti oportunním parazitům (Hořejší, 2005).

Oportunní parazité způsobují závažné onemocnění u imunodeficitních pacientů (Sepkowitz, 2002).

Průkaz oportunních parazitů u alkoholiků není příliš častý. Častěji se diagnostika provádí u transplacovaných pacientů, imunosuprimovaných a AIDS/HIV pacientů.

Metodou přímého průkazu nebyla prokázána přítomnost vývojových stadií prvoků ani oocyst kryptosporidií. Negativní výsledek těchto mikroskopických metod může souviset s imunitním stavem alkoholiků. Alkoholici jsou daleko náchylnější k infekcím, avšak imunitní systém sledovaného souboru nebyl natolik poškozen a vnímavý k infekci oportunními parazity. Přenos střevní kryptosporidiózy vodou a potravinami je celosvětovým problémem veřejného zdraví. Střevní invaze byla diagnostikována u imunokompromitovaných jedinců, zvláště u těch infikovaných virem lidské imunodeficiencie HIV/AIDS (Kothavade, 2011). Kryptosporidióza je jednou z nejčastějších příčin průjmu na Haiti. U dětí mladších pěti let, HIV jedinců, a lidí žijící v nižších sociálně-ekonomických podmínkách je příčinou onemocnění spotřeba vody nebo potravin kontaminovaných oocysty *Cryptosporidium*. Studie se zabývala přítomností oocyst v povrchových vodách a ve veřejném zásobování vodou. Z celkového množství 37 vzorků z nádrží bylo 65 % kontaminováno, voda poskytovaná veřejnou společností byla také kontaminována (54%), (Brasseur et al., 2011). Infekce byla též diagnostikována u HIV pozitivního novorozence, kdy matka trpěla průjmou. K přenosu tedy došlo přímým kontaktem. Jako vhodné se proto jeví

použití screeningového vyšetření na kryptosporidiózu u HIV pacientů (Abdelmalek et al., 2011). Studie zabývající se diagnostikou střevních parazitů u HIV/AIDS prokázala přítomnost *Cryptosporidium* sp. v 9,4 % z 64 HIV/AIDS pacientů v provincii Mazandaran v Íránu. (Daryani et al., 2009). Dříve byla diagnostikována kryptosporidióza až u 60 % AIDS pacientů (Fleming, 1990). Toto vypovídá o zlepšující se účinku terapie HIV/ AIDS HAART. Kryptosporidióza je závažným problémem nejen u HIV/AIDS pacientů, ale také pacientů po transplantaci a častých hemodialýzách (Chiuchetta, 201). *Cryptosporidium parvum* bylo diagnostikováno jako příčina průjmu u 7 příjemců transplantátu z 43 (Arslan et al., 2007). Kryptosporidium bylo zjištěno u 12 (11,5%) dialyzovaných pacientů z celkového počtu 104. Jelikož jsou dialyzovaní pacienti potencionálními kandidáty na transplantaci je třeba preventivních opatření proti infekci (Seyrafian et al., 2006).

Celý sledovaný soubor pobýval v dobrých hygienických podmínkách, riziko nákazy kontaminovanou potravou nebo vodou je malé. Pacienti Psychiatrické léčebny Červený Dvůr, Ústřední vojenské nemocnice i pacienti Psychiatrické léčebny Havlíčkův Brod jsou navíc pravidelně kontrolováni lékařem. Pacienti z terénu pocházejí z dobrých sociálně-ekonomických podmínek.

Přítomnost mikrosporidií metodou Calcofluor byla prokázána u 1 vzorku. Tento nálezn však nebyl potvrzen metodou PCR. Neshoda byla pravděpodobně způsobena záměnou mikrosporidií za kvasinky nebo jiné střevní parazity, kteří pod UV světlem fluoreskují totožně. Vyšetření barvením Calcofluor se ukázalo jako málo specifické a citlivé pro průkaz mikrosporidií. Daleko větší specifitu poskytuje PCR. Citlivost PCR umožňuje enzymatickou amplifikaci genu z nepatrného množství nukleových kyselin a omezeného množství materiálu (Gasser, 1999). PCR umožňuje druhovou a genotypovou identifikaci mikrosporidií (Kock et al., 1997).

Po provedení metody PCR a ELFO byly vzorky zaslány na sekvenaci a fylogenetickou analýzu. Sekvence a fylogenetická analýza prokázaly přítomnost

mikrosporidií ve vzorku. Jednalo se o *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I. *E. cuniculi* byl prokázán u 1 (4 %) z celkového množství pacientů.

V práci Kučerové-Pospíšilové byl *E. cuniculi* detekován u 16 % alkoholiků, u 7 % byl prokázán *Encephalitozoon hellem* (Kučerová-Pospíšilová et Ditrich, 1998). K průkazu však použila serologické metody ELISA a Western blotting. ELISA je nejužívanější metodou ke stanovení protilátek IgG, senzitivita laboratorních kitů dosahuje 90 – 100 %, avšak variabilní specifita je 76 – 96 % (Zima et al., 2002). Metoda Western blotting je metoda založená na elektroforetickém dělení proteinů a jejich reakci s protilátkou (Zima et al., 2002). Ve srovnání s PCR je potřeba více materiálu, pro Western blotting je třeba 1 ng. PCR je vysoce citlivou metodou (Bergendahl et al., 2003), u které dokážeme pracovat s množstvím pikomolů až attomolů (10^{-18} mol.) (Zima, 2002). Metoda ELISA může mít až 1000x nižší senzitivitu než PCR (Adlet et al., 2003). V případě serologického vyšetření musíme brát v potaz klinický stav pacienta a výsledky ostatních vyšetření (Zima, 2002). Pozitivita protilátek proti *E. hellem* a *E. cuniculi* v séru alkoholiků může znamenat již proběhlou nákazu parazitem za stálé přítomnosti protilátek, nebo skrytou nákazu bez příznaků. Na rozdíl od metody PCR, která nám potvrdila aktuální přítomnost *E. cuniculi* ve stolici pacienta, by se dalo hovořit o mikrosporidiióze.

Mikrosporidiióza je jednou z hlavních oportunních infekcí u pacientů s HIV/AIDS, příjemců orgánů, dětí, cestovatelů a starších osob. Nejčastější příčinou infekce pro člověka je *E. bienersi* a *E. intestinalis* (Anane et Attouchi, 2010). Mikrosporidie jsou patogenem jak pro člověka, tak i pro zvířata. U tohoto souboru byl detekován *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I a to u pacienta ve věku 45 let. *Encephalitozoon cuniculi* se označuje jako zoonotický parazit (Deplazes et al. 1996). První nález *E. cuniculi* u člověka byl v roce 1984 u dvouletého dítěte s neurologickými poruchami ve Švédsku (Hollister et Cannig, 1987). Bylo prokázáno, že *E. cuniculi* může infikovat několik hostitelských druhů, včetně člověka. *Encephalitozoon cuniculi* byl diagnostikován u lidí pracujících se zvířaty, konkrétně králíky. Při kontaktu s takto nakaženým zvířetem je tedy nutné

dodržovat základní hygienické pravidla (Ozkan et al., 2011). Z toho lze usuzovat, že pacient, u kterého jsme diagnostikovali *E. cuniculi* se mohl nakazit od infikovaného zvířete. *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I byl také detekován u pacientů geriatrického zařízení. Pozitivita byla prokázána u 2 pacientů z celkových 5 pozitivních na mikrosporidie (Černá, 2010). *Encephalitozoon* byl též detekován v souvislosti s idiopatickou CD4+ T-lymfopenií a v pokročilém stadiu lidské imunodeficiency (Kodjikian et al., 2005). Z imunologického hlediska je nejlépe prostudovaným druhem *E. cuniculi* (Salát et Braunfuchsová, 2002). Mikrosporidie byly zjištěny u 30 HIV pozitivních pacientů z 159 během výzkumu v Rusku. Nejvyšší prevalence byla u *E. intestinalis* 12,8 %, *E. bienersi* byl prokázán u 1,2 % pacientů a *E. cuniculi* u tří pacientů. U jednoho z pacientů s *E. cuniculi* byl diagnostikován kmen I i II (Sokolova et al., 2011). *Encephalitozoon cuniculi* byl zjištěn také u pacienta po transplantaci ledviny (Talabani et al., 2010).

Enterocytozoon bienersi je nejčastějším původcem lidské mikrosporidie. *Enterocytozoon bienersi* je častým gastrointestinálním parazitem u AIDS pacientů (Velasquez et al., 1999). V Portugalsku dosáhl výskyt *E. bienersi* u HIV pozitivních pacientů 29 %. Pacienti trpěli průjmem a gastrointestinálním onemocněním (Filip et al., 2001). Ve Španělsku, na Kanárských ostrovech na Tenerife bylo vyšetřeno 156 vzorků stolice zejména imunokompromitovaných jedinců. *E. bineusi* byl prokázán u 18 (11,54 %) z 156 vzorků stolice (Acosta et al., 2008). U jedinců po alogenní transplantaci byla celková prevalence mikrosporidií 7,4 % (Zajíčková, 2010). Přítomnost mikrosporidií z celkovou prevalencí 11 % byla prokázána u pacientů geriatrického zařízení, z 5 vzorků byly 3 pozitivní na *E. bienersi* (Černá, 2010). V roce 2008 byly mikrosporidie detekovány s prevalencí 100 % u drogově závislých, konkrétně druh *E. bienersi* (Bucharová, 2008). Porovnání výsledků Evy Bucharové s mými (drogově závislí jsou z hlediska rizika oportunních infekcí podobní alkoholikům) a s výsledky výše citovaných studií dovoluje předpokládat, že v případě drogově závislých se na vysoké prevalenci podílel více přenos infekce v úzkém kolektivu, než případné poškození imunitního systému drogami.

Z výsledků sledovaného souboru nelze hodnotit, zda výskyt mikrosporidií u pacientů závislých na alkoholu souvisí s jeho konzumací. Jak již bylo zmíněno, protilátky proti *E. cuniculi* byly diagnostikovány u 16 % alkoholiků pomocí serologických metod (Kučerová-Pospíšilová et Ditrich, 1998). Serologickým vyšetřením nelze rozlišit, zda byli pacienti v aktuálním stadiu nákazy, nebo šlo o přítomnost protilátek po prodělané nákaze mikrosporidiiemi. Dle získaných informací o sledovaném souboru nikdo netrpěl průjmovým onemocněním, které je velmi často přítomno u mikrosporidiových nákaz (Didier, 2004). Přítomnost *E. cuniculi* u jednoho z nich mohla souviset s alkoholismem, nebo došlo k přenosu ze zvířete.

Pro potvrzení, zda je výskyt oportunních parazitů u alkoholiků vyšší, je třeba ověřit hypotézu na rozsáhlejším souboru pacientů, případně v akutním stádiu alkoholismu. Zavržení nebo potvrzení hypotéz je proto velmi obtížné. Pacienti mohli mikrosporidiazou trpět v průběhu akutního stadia alkoholismu, kdy je imunitní systém zatížen. Prodělaná nákaza by se dala prokázat serologickými metodami.

6. Závěry

- I. Vyšetření vzorků stolice molekulární metodou PCR prokázalo přítomnost mikrosporidií u 1 pacienta (4 %).
- II. Nález byl identifikován jako druh *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I.
- III. Výskyt mikrosporidií u alkoholiků se nelišil výrazně od výskytu u jiných skupin pacientů v riziku, s výjimkou uživatelů drog.
- IV. Nízká prevalence u těchto pacientů může být dána dobrými hygienickými podmínkami.
- V. Ve srovnání s průkazem mikrosporidií u alkoholiků serologickou metodou byl výskyt nižší. Výskyt oportunních parazitů u alkoholiků je třeba intenzivně studovat. Průkaz by bylo vhodnější provádět u pacientů v akutním stadiu alkoholismu.

7. Literatura

1. Abdelmalek, R., Anane, S., Chabchoub, N., Essid, R., Aoun, K., Chaabéne, TB., Bouratbine, A. (2011): Microsporidia and cryptosporidia coinfection in an HIV-infected newborn. *Arch Pediatr*: 31
2. Acosta, N.A., Morales, J.L., Guio, Y.L., Álvarez, N.C., Foronda, P., Florez, J.A., Izquierdo, F., Díaz, N.B., Del Águila, C., Valladares, B. (2008): *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 99: 848-855
3. Adler, M., Wacker, R., Niemeyer, C.M. (2003): A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 22: 240-50
4. Adler, P., Wood, S.J., Lee, Y.C. (1995): High affinity binding of *Entamoeba histolytica* lectin to polyvalent N-acetylgalactosaminides. *J Clin Microbiol* 270: 5164-5171
5. Alcántara, C.S., Yang, CH., Steiner, T.S. (2003): Interleukin-8, tumor necrosis factor-alpha, and lactoferrin in immunocompetent hosts with experimental and Brazilian children with acquired cryptosporidiosis. *Am J Trop Med Hyg* 68: 325-328
6. Anane, S., Attouchi, H. (2010): Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol* 34: 450-64
7. Anderson, P., Gual, A., Colom, J. (2005): Alcohol and Primary Health Care: Clinical Guidelines on Identification and Brief Interventions. *Dpt Health Governnt Catalonia*: 1-142
8. Arslan, H., Inci, E.K., Azap, O.K., Karakayali, H., Torgay, A., Haberal, M. (2007): Etiologic agents of diarrhea in solid organ recipients. *Transpl Infect Dis* 9: 270-5
9. Bednář, M. *Lékařská mikrobiologie*, Praha: Marvil 1999. 588s.

10. Bergendahl, V., Glaser, B.T., Burgess, R.R. (2003): A fast Western blot procedure improved for quantitative analysis by direct fluorescence labeling of primary antibodies. *J Immunol Meth* 277: 117-125
11. Bern, C., Kawai, V., Vargas, D., Rabke-Verani, J., Williamson, J., Chavez-Valdez, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Vivar, A., Ticona, E., Ñavincopa, M., Cama, V., Moura, H., Secor, WE., Visvesvara, G., Gilman, RH. (2005): The Epidemiology of Intestinal Microsporidiosis in Patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. *J Inf Dis* 191:1658–1664
12. Black, M.W., Boothroyd, J.C. (2000): Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(3): 607-623
13. Blanshard, C., Shanson, D.C., Gazzard, B.G. (1997): Pilot studies of azitromycin, letrazuril and paromycin in the treatment of cryptosporidiosis. *Int J STD AIDS* 8: 124-129
14. Boldorini, R., Tosoni, A., Mazzuco, G. (1996): Intracellular protozoan infection in small intestinal biopsies of patients with AIDS. *Pathol Res Pract* 192: 249-259
15. Botero-Kleiven, S., Fernández, V., Lindh, J., Richter-Dahlfors, A., von Euler, A., Wahlgren, M. (2001): Receptor-mediated endocytosis in an apicomplexan parasite (*Toxoplasma gondii*). *Exp Parasitol* 98(3): 134-144
16. Brasseur, P., Agnamey, P., Emmanuel, E., Pape, J.W., Vaillant, M., Raccurt, C.P. (2011): *Cryptosporidium* contamination of surface and water supplies in Haiti. *Arch Environ Occup Health* 66: 12-7
17. Brenier-Pinchart, M.P., Pelloux, H., Derouich-Guergoug, D. (2001): Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol* 17: 292-296
18. Bucharová E., (2009): *Střevní paraziti u uživatelů drog*. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
19. Bunout, D. (1999): Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition* 15: 583-589

20. Bykova, A.A., Sedinina, N.S. (2002): Immune and autoimmune effects of ethanol. *Eksp Klin Farmakol* 65: 60-63
21. Callot, J., Kremer, M., Paradis, C., Roumbourg, H. (1971): Commentaires sur 286 cas de coccidiose digestive humaine diagnostiqués à Stasbourg. *Bull Soc Path Exot Filiales* 64: 464-468
22. Canning, E.U., Hollister, W.S. (1990): *Enterocytozoon bieneusi* (Microspora): prevalence and pathogenicity in AIDS patients. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 84: 181-186
23. Cerdad, G., Arenas-Pinto, A., Pocaterra, L. (2003): Isosporiasis in Venezuelan adults infected with human immunodeficiency virus: clinical characterization. *Am J Trop Med Hyg* 69: 217-222
24. Clark, C.G., Roger, A.J. (1995): Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Nat Acad Sci* 92: 6518-6521
25. Corradi, N., Keeling, P.J. (2009): Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biol Rev* 23: 1-8
26. Černá, L. (2010): *Oportunní paraziti u pacientů geriatrických zařízení*. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
27. Černý, Z. *Infekční nemoci Jak pečovat o pacienty s infekčním onemocněním*, Brno: NCO NZO, 2008. 284s. ISBN 978-80-7013-480-1
28. Daryani, A., Sharif, M., Meigouni, M., Mahmoudi, F.B., Rafiei, A., Gholami, S., Khalilian, A., Gohardehi, S., Mirabi, A.M. (2009): Prevalence of intestinal parasites and profile of CD4+ counts in HIV+/AIDS people in north of Iran. *Pak J Biol Sci* 15: 1277-81
29. de Górgolas, M., Fortés, J., Guerrero, MLF: (2001): *Cyclospora cayetanensis* cholecystitis in patient with AIDS. *Ann Intern Med* 134: 166
30. de Souza, E.S., Garcia-Zapata, M.T. (2006): Laboratory diagnosis of opportunistic intestinal parasites with emphasis on human microsporidiosis, in Goiania-Go. *Trop Med* 39: 560-564

- 31.Denf, M., Rutherford, M.S., Abrahamsen, M.S. (2003): Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*. *Adv Drug Deliver Rev* 56: 869-884
- 32.Denkens, E.Y. (1996): A *Toxoplasma gondii* Superantigen: Biological effects and implications for the host-parasite interaction. *Parasitol Today* 67: 362-366
- 33.Deplazes, ES., Mathis, A., Baumgartner, R. (1996): Immunologic and molecular characteristic of *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patient with keratokonjunctivitis. *J Infect Dis* 163: 617-621
- 34.Despommier, D.D., Karapelou, A.W. *Parasite life cycles*. New York: Springer – Verlag. 1987. 18s
- 35.Didier, E.S. (2005): Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94: 61-76
- 36.Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K., Didier, P.J. (2004): Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 126: 154-166
- 37.Ebrahimzadeh, A., Bottone, EJ. (1996): Persistent diarrhea caused by *Isospora belli*: therapeutic response to pyrimethamine and sulfadiazine. *Diag Microbiol Infect Dis* 26: 87-89
- 38.Elliott, D.A., Clark, D.P. (2000): *Cryptosporidium parvum* induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface. *Infect Immun* 68: 2315-22
- 39.Fatoohi, A.F., Cozon, G.J., Wallon, M. (2003): Cellular immunity to *Toxoplasma gondii* in congenitally infected newborns and immunocompetent infect hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 181-184
- 40.Filip M.B. Ferreir, F.M.B., Bezerra, L., Santos, M.B.G., Bernardes, R.M.A., Avelino, I. (2001): Intestinal microsporidiosis: a current infection in HIV-seropositive patients in Portugal. *Microbes Infect* 3:1015-1019

41. Fleming, A.F. (1990): Opportunistic infections in AIDS in developed and developing countries. *Trans Roy Soc Trop Med* 84: 1-6
42. Forthal, D.N., Guest, S.S. (1984): *Isospora belli* enteritis in three homosexual men. *Amer J Trop Med Hyg* 33: 1060-1064
43. Franzen, C., Müller, A., Schwenk, A., Salzberger, B., Fätkenheuer, G., Mahrle, G., Diehl, V. (1995): Intestinal microsporidiosis with *Septata intestinalis* in a patient with AIDS—response to albendazole. *J Infect* 31: 237-239
44. Garcia, L.S., Bruckner, D.A., *Diagnostic medical parasitology*, Washington: ASM PRESS, 1997. 937s.
45. Garweg, J.G., Jacquier, P., Boehnke, M. (2000): Early aqueous humor analysis in patient with human ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 38: 966-1001
46. Gascon, J., Corachan, M., Bombi, J.A. (1995): *Cyclospora* in patient with traveller's diarrhea. *Scand J Infect Dis* 27: 511-514
47. Gasser, .RB. (1999): PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 84: 229-258
48. Ghosh, K., Cappiello, CD., McBride, SM. (2006): Functional characterization of putative aquaporin from *Encephalitozoon cuniculi*, a microsporidia pathogenic to humans. *Int J Parasitol* 56: 57-62
49. Ghosh, S.K., Field, J., Frisardi, M. (1999): Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun* 67: 3073-3081
50. Goldman, M., Carver, R.K., Sulzer, A.J. (1958): Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J Parasit* 44: 161-171
51. Göpferová, D., Pazdiora, P., Dáňová, J. *Epidemiologie (obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí)*, 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006. 298s. ISBN 80-246-1232-1

52. Hauser, P., Bille, J., Lass-Flörl, C., Geltner, C., Feldmesser, M., Levi, M., Patel, H., Muggia, V., Alexander, B., Hughes, M., Follett, S.A., Cui, X., Leung, F., Morgan, G., Moody, A., Perlin, D.S., Denning, D.W. (2011): Multicentre, prospective clinical evaluation of respiratory samples from subjects at risk for *Pneumocystis jirovecii* using a Commercial Real Time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2
53. Havlík, J. *Infekční nemoci*, 2.vydání. Praha: Galén, 2002. 186s. ISBN 80-7262-173-4
54. Hicks, S.J., Theodoropoulos, G., Carrington, S.D., Corfield, A.P. (2000): The role of mucins in host-parasite interactions. Part I- protozoan parasites. *Parasitol Today* 16: 476-481
55. Hollister, W.S., Canning, E.U. (1987): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infection in man. *Parasitol Today* 94: 209-219
56. Hořejší, V., Bartůňková, J. *Základy imunologie*, Praha: Triton, 2005. 279 s. ISBN 80-7254-686-4
57. Hoste, H. (2001): Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. *Int J Parasitol* 31: 231-244
58. Chalmers, R.M., Davies, A.P. (2010): Clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol* 124: 138- 164
59. Chanon, J.Y., Miselis, K.A., Minnis, L.A. (2002): *Toxoplasma gondii* induces granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by human fibroblasts: implications for neutrophil apoptosis. *Infect Immun* 70: 6048-6057
60. Chen, X.M., Larusso, N.F. (2000): Mechanism of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 118: 368-379
61. Chiuchetta, F.A. (2010): Cryptosporidiosis in a patient with ankylosing spondylitis treated with adalimumab. *Rev Bras Reumatol* 50: 328-332

62. Jíra, J., *Lékařské protozoologie Protozoální nemoci*, 1. vydání. Praha: Galén, 2009. 567s. ISBN 978-80-7262-381-5
63. Jíra, J., Rosický, B. *Imunodiagnostika a epidemiologie toxoplasmosy*. Praha: Academia 1983. 262.
64. Karanis, P., Sotiriadou, I., Kartashevc, V., Kourenti, C., Tsvetkova, N., Stojanova, K. (2006): Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ Res* 102: 260-271
65. Katz, D., Kumar, S., Malecki, J. (1999): Cyclosporiasis associated with imported raspberries, Florida, 1999. *Pub Health Rep* 114: 427-438
66. Kelly, P., Jack, D.L., Naemm, A. (2000): Mannose-binding lectin is component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. *Gastroenterology* 119: 1236-1242
67. Kimura, K., Kumar, S., Malecki, J. (1999): Comparison of three microscopic techniques for diagnosis of *Cyclospora cayetanensis*. *FEMS Microbiol Lett* 238: 263-266
68. Kjos, S.A., Jenkins, M., Okhusyen, P.C. (2005): Evaluation of recombinant oocyst protein CP41 for detection of *Cryptosporidium*- specific antibodies. *Mikrobiology* 66: 27112717
69. Kock, P., Petersen, H., Fenner, T., Sobottka, I., Schmetz, C., Deplazes, P., Pieniazek, N.J., Albrecht, H., Schottelius, J. (1997): Species-specific identification of microsporidia in stool and intestinal biopsy specimens by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 369-376
70. Kodjikian, L., Garweg, J.G., Nguyen, M., Schaffner, T., Deplazese, P., Zimmerli, S. (2005): Intraocular microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia. *Int J Med Microbiol* 294: 529-33
71. Kolbekova, P., Kourbatova, E., Novotna, M., Kodym, P., Flegr, J. (2007): New and old risk-factors for *Toxoplasma gondii* infection: prospective

- cross-sectional study among military personnel in the Czech Republic. *Clin Microbiol Infect* 13: 1012-7
- 72.Kořínková, K. *Obecná parazitologie: Význam a biologie parazitů*, 1. vydání. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem Přírodovědecká fakulta. 2006. 91s. ISBN 80-7044-798-2
- 73.Kothavade, R.J. (2011): Challenges in understanding the immunopathogenesis of *Cryptosporidium* infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12
- 74.Kodjikijan, L., Garweg, J.G., Nguyen, M., Schaffner, T., Deplazes, P.(2005): Intraocular microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia. *Int J Med Microbiol* 294:529-533
- 75.Krejsek, J., Kopecký, O. *Klinická imunologie*, Hradec Králové: NUCLEUS HK. 2004. 941s ISBN 80-86225-50-X
- 76.Kučerová-Pospíšilová, Z., Ditrich, O. (1998): The serological surveillance of several groups of patients using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E. cuniculi* antibodies to microsporidia in patients. *Folia Parasitol* 45: 108-112
- 77.Lores, B., López-Miragaya, I., Arias, C., Fenoy, S., Torres, J., del Aguila, C. (2002): Intestinal Microsporidiosis Due to *Enterocytozoon bienewisi* in Elderly Human Immunodeficiency Virus–Negative Patients from Vigo, Spain. *Clin Infect Dis* 34:918–921
- 78.Mačák, J., Mačáková, J. *Patologie*, Praha: Grada. 2004. 347s. ISBN 80-247-0785
- 79.Marques, C.C., da Penha Zago-Gomes, M., Goncalves, C.S., Pereira, F.E. (2010): Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larva in stools. *PLoS Negl Trop Dis* 22: 4-6
- 80.Marty, F.M., Lowry, C.M., Rodriguez, M., Milner, D.A., Pieciak, S.W., Sinha, A., Fleckenstein, L., Baden, L.R. (2005): Treatment of Human

- Disseminated Strongyloidiasis with a Parenteral Veterinary Formulation of Ivermectin. *Clin Infect Dis* 41: e8-e5
81. Mathews, A., Hotard, A., Hale-Donze, H. (2009): Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microb Inf* 11:905- 911
82. Mathis A., Weber R., Deplazes, P., (2005): Zoonotic Potential of the Microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 18: 423–445
83. Mc Donald, V. (1999): Gut intraepithelial lymphocytes and immunity to Coccidia. *Parasitol Today* 15: 438-487
84. Miller, A.M., Horiguchi, N., Neony, W.I., Radaeva, S., Gao, B. (2011): Molecular Mechanisms of Alcoholic Liver Disease: Innate Immunity and Cytokines. *Alcohol Clin Exp Res* 1
85. Miller, C.M., Boulter, N.R., Ikin, R.J., Smith, N.C. (2007): The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 39: 23-39
86. Mok, M.T.S., Tay, E., Sekyere, E., Glenn, W.K., Bagnara, A.S., Edwards M.R. (2005): *Giardia intestinalis*: Molecular characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase. *Gene* 357: 73-82
87. Molina, J.M., Oksenhendler, E., Beauvais, B. (1995): Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *J Infect Dis* 171: 245-249
88. Moncada, D., Keller, K., Chadee, K. (2003): *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infect Immun* 71: 838-844
89. Morgan, U.M., Thompson, R.C. (1998): PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? *Parasitol Today* 14: 241-245
90. Moss, M. (2005): Epidemiology of Sepsis: Race, Sex, and Chronic Alcohol Abuse. *Clin Infect Dis* 41: S490-S497
91. Müller, A., Bialek, R., Fätkenheuer, G. (2000): Detection of *Isospora belli* by polymerase chain reaction using primers based on small-subunit ribosomal RNA sequences. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 631-634

- 92.Mun, H.S., Aosai, F., Norose, K. (2000): *Toxoplasma gondii* Hsp70 as danger signal in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Cell Stress Chaperon* 5: 328-335
- 93.Ngui, R., Ishak, S., Chuen, C.S., Mahmud, R., Lim, Y.A. (2011): Prevalence and risk factors of intestinal parasitism in rural and remote West Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis* 1: 974
- 94.Nissapatorn, V. 2009: Toxoplasmosis in HIV/AIDS: a living legacy. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40: 1158-1178
- 95.Nohýnková, E. (2011): *Protozoární původci oportunních nákaz (Toxoplasma, Pneumocystis)* http://www1.lf1.cuni.cz/uim/mater-copy/TOXOPLASMA_A_PNEUMOCYSTIS.pdf
- 96.Okhuysen, P.C. (2001): Traveler's Diarrhea Due to Intestinal Protozoa. *Clin Infect Dis*:110-114
- 97.Okhuysen, P.C., Chappell, CL. (2002): *Cryptosporidium* virulence determinants- where we are yet? *Int J Parasitol* 32: 517-525
- 98.Overath, P., Aebischer, T. (1999): Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens. *Parasitol Today* 15: 325-332
- 99.Ozkan, O., Ozkan, A.T., Zafer, K. (2011): Encephalitozoonosis in New Zealand rabbits and potential transmission risk. *Vet Parasitol* 15
- 100.Park, M.S., Kim, K.W., Kwon, H., Lee, D.H. (2007): Intestina parasitic infection. *Abdominal Imaging* 33: 166-171
- 101.Pavia, C.S., La Mothe, M., Kavangh, M. (2004): Influence of alcohol on antimicrobial immunity. *Biomed Pharmacother* 58: 84-89
- 102.Pavlásek, I. (1991): Využití glycerinu při detekci oocyst *Cryptosporidium parvum* a *C. baileyi* v trusu savců a ptáku. *Vet Med* 36: 255-256
- 103.Peters, M., Bienzle, U. (1981): Amöbenleberabszess. *Inter Prax* 21: 679-688
- 104.Petithory, J.C., Milgram, M., Siodlak, F. (1989): Opportunistic aspects of parasitosis. *Ann Biol Clin* 1989: 438-5

105. Pierce, K., Huston, C.D. (2009): Protozoan, Intestinal. *Encyclopedia Microbiol*: 696-705
106. Pollok, R.C.G., Farthing, M.J., Bajaj-Ellitt, M. (2001): Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology* 120: 99-107
107. Que, X., Brinen, L.S., Perkins, P. (2002): Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Molec Biochem Parasitol* 119:23-32
108. Radke, J.R., Guerini, M.N., Jerome, M.N. (2003): A change in the premitotic period of cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma Gondii*. *Molec Biochem Parasitol* 131: 119-127
109. Restrepo, C., Macher, A.M., Radany, E.H. (1987): Disseminated extraintestinal isosporiasis in patient with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Path* 87: 536-542
110. Rohde, K. *Marine parasitology*, Collingwood: CSIRO. 2005. 565s.
111. Rossignol, J.F., Ayoub, A., Ayers, M.S. (2001): Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis* 184: 103-106
112. Roy, S., Kabir, M., Stroup, S.E., Mondal, D., Houpt, E.R. (2005): *Giardia* Assemblage A Infection and Diarrhea in Bangladesh Rashidul Haque. *J Infect Dis* 192: 2171-2173
113. Rubík, I., Tolarová, V. (1997): Problematika kokcidiových infekcí (*Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis*) v České Republice. 14. Pečenkovy epidemiologické dny : 74-75
114. Saito, H., Ishii, H. (2004): Recent understanding of immunological aspects in alcoholic hepatitis. *Hepatol Res* 30: 193-198
115. Sak, B., Kváč, M., Hanzlíková, D., Cama, V. (2008): First report of *Enterocytozoon bienersi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 153: 3-4

- 116.Salát, J., Braunfuchsová P. (2002): *Encephalitozoon cuniculi* a *Encephalitozoon intestinalis* - původci oportunních infekcí. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1: 26-30
- 117.Sepkowitz, K.A. (2002): Opportunistic Infections in Patients with and Patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Dis* 34:1098-1107
- 118.Seyrafian, S., Pestehchian, N., Kerdegari, M., Yousefi, H.A., Bastani, B. (2006): Prevalence rate of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients in Iran. *Hemodial Int* 10: 375-9
- 119.Siddiqui, A.A., Berk, S.L. (2001): Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Clin Infect Dis* 33: 1040-1047
- 120.Sifuentes-Osorio, J., Porrás-Cortés, G., Bendall, R.P. (2003): *Cyclospora cayetanensis* infection in patient with and without AIDS: biliary diseases as another clinical manifestation. *Appl Environ Microbiol* 69: 4662-4669
- 121.Siwila, J., Phiri, I.G.K., Enemark, H.L., Nchito, M., Olsen, A. (2010): Intestinal helminths and protozoa in children in pre-school in Kafue district, Zambia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 104: 122-128
- 122.Smith, H.V., Paton, C.A., Mtambo, M.M.A. (1997): Sporulation of *Cyclospora* sp. oocyst. *Appl Environ Microbiol* 63: 1631-1632
- 123.Sokolova, O.I., Demyanov, A.V., Bowers, L.C., Didier, E.S., Yakovlev, A.V., Skarlato, S.O., Sokolova, Y.Y. (2011): Emerging Microsporidia Infections in Russian HIV-Infected Patients. *J Clin Microbiol* 30
- 124.Státní zdravotní ústav. *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2000-2009 absolutně*. <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolute>
- 125.Stejskal, F., 2007: *Střevní parazitární infekce*. <http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-706-strevni-parazitarni-infekce>
- 126.Subauste, C.S., Wessendarp, M.J. (2000): Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and

- Cd40 ligand signaling that controls Il-12-dependent and-independent T cell production of INF- γ . *Immunology* 165: 1498-1505
- 127.Szabo, G., Dolganiuc, A., Mandrekar, P., White, B. (2004): Inhibition of antigen-presenting cell functions by alcohol: implications for hepatitis C virus infection. *Alcohol* 33: 241-249
- 128.Šerý, V., Bálint, O. *Tropická a cestovní medicína*, Praha: MEDON. 1998. 569s. ISBN 80-902122-4-7
- 129.Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., Menotti, J. (2010): Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol* 48: 2651-3
- 130.Tetley, L., Brown, S.M., McDonald, V. (1998): Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology* 144: 3249-3255
- 131.Tolarová, V. (2005): Co víme o cyklospórze. Oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy. Seminář Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP a dalších. Praha: 13-19
- 132.Totková, A., Klobušický, M., Valent, M. *Lekárská parazitologia*, Martin: 2008. 400s. ISBN 978-80-8063-263-2
- 133.Tumwine, J., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Akiyoshi, D.E., Buckholt, M.A., Tzipori, S. (2002): *Enterocytozoon bienersi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Amer J Trop Med Hyg* 67: 299-303
- 134.van Hal, S.J., Muthian, K., Matthews, G., Harkness, J., Stark, D., Cooper, D., Marriot, D. (2007): Declining incidence of intestinal microsporidiosis and reduction in AIDS-related mortality following introduction of HAART in Sydney, Australia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 101:1096-110
- 135.Vanacova, S., Liston, D.R., Tachezy, J., Johnson, P.J. (2003): Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 33: 235-255

- 136.Velasquez, J.N., Carnevale, S., Labbe, J.H., Chertcoff, A., Cabrera, M.G., Oelemann, W., Silva, S. (1999): In situ hybridization: A molecular approach for the diagnosis of the microsporidian parasite *Enterocytozoon bieneusi*. *Hum Pathol* 30: 54-58
- 137.Vivarès, C.P., Gouy, M., Thomarat, F. (2002): Functional and evolutionary analysis of eukaryotic genome. *Curr Opin Microbiol* 5: 499-505
- 138.Volf, P., Horák, P. *Paraziti a jejich biologie*, 1.vydání. Praha: Triton, 2007. 318s. ISBN 978-80-7387-008-9
- 139.Votava, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*, Brno: Neptin, 2003. 495s. ISBN 80-902896-6-5
- 140.Walker, M., Kublin, J.G., Zunt, J.R. (2006): Parasitic Central Nervous System Infections in Immunocompromised Hosts: Malaria, Microsporidiosis, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis. *Clin Infect Dis* 42:115-125
- 141.Waszkiewicz, N., Szulc, A. (2010): Immunity defects in acute and chronic alcohol intoxication. *Pol Merkur Lekarski* 29: 269-273
- 142.Watson, R.R. (1993): Resistance to intestinal parasites during murine AIDS: role of alcohol and nutrition in immune dysfunction. *Parasitol* 107: 69-74
- 143.Weiss, L.M. (2001): Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop* 78: 89-102
- 144.Wells, C.D., Arguedas, M. (2004): Amebic liver abscess. *South Med J* 97: 673-682
- 145.Widmer, G., Akiyoshi, D. (2010): Host-specific segregation of ribosomal nucleotide sequence diversity in the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* Infection. *Genet Evol* 10: 122-128
- 146.Windsor, J.J. (1997): Microsporidial infection in humans: current practice and developments in laboratory diagnosis. *Br J Biomed Sci* 54: 2216-221

- 147.Wumba, R., Longo-Mbenza, B., Mandina, M., Odio, W.T., Biligui, S., Sala, J., Breton, J., Thellier, M. (2010): Intestinal parasites infection in hospitalized AIDS patients in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Parasite* 17: 321-328
- 148.Zajíčková, P. (2010): *Oportunní paraziti u pacientů s transplantáty a dalších imunosuprimovaných pacientů*. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
- 149.Zima, T. *Laboratorní diagnostika*, Praha: Galén 2002. 728s.
- 150.Zítek, K. (1998): *Prevence kongenitální toxoplasmózy*.
Čes Gynek 63: 58-64

8. Klíčová slova

Oportunní paraziti

Mikrosporidie

Alkoholismus