

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Oportunní paraziti u alkoholiků

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Gabriela Křivánková

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

16. srpna 2010

Abstract

Cílem této studie byl průkaz oportunních parazitů u alkoholiků. Vyšetřovaným materiálem byla stolice. Celkem bylo vyšetřeno 20 vzorků, 4 od pacientů Psychiatrické léčebny Červený Dvůr 16 vzorků od pacientů z terénu, docházejících na terapii ambulantně.

K mikroskopickému vyšetření stolice byly použity tyto metody: koncentrační metoda M.I.F.C. k průkazu vývojových stadií prvoků, barvicí metoda Miláček-Vítovec, která slouží k diagnostice oocyst kryptosporidií ve stolici a Calcofluor, která je určena k detekci mikrosporidií. Molekulární diagnostika byla založena na PCR a restrikci produktu. Metoda PCR prokázala přítomnost mikrosporidií u 1 pacienta z 20.

Následná sekvenace a fylogenetická analýza diagnostikovala *Encephalitozoon cuniculi*. *Encephalitozoon cuniculi* byl detekován u pacienta z terénu. Výskyt mikrosporidií u alkoholiků je 5 %.

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 16. 8. 2010

OBSAH	5
Úvod	7
1. Současný stav	8
1.1 Parazitismus.....	8
1.2 Oportunní parazitismus.....	9
1.3 Parazitální infekce.....	9
1.3.1 Obrana hostitelského organismu proti parazitární infekci.....	9
1.3.1.1 Nespecifická imunita.....	10
1.3.1.2 Specifická imunita.....	10
1.4 Závislost na alkoholu	10
1.5 Mikrosporidie.....	12
1.6 Kryptosporidie.....	15
1.7 Isospora belli.....	17
1.8 Cyclospora cayetanensis.....	18
1.9 Toxoplasma gondii.....	19
1.10 Pneumocystis jiroveci.....	22
1.11 Entamoeba histolytica.....	22
1.12 Giardia intestinalis.....	23
1.13 Strongyloides stercoralis.....	24
2. Cíl práce a hypotézy	26
2.1 Cíl práce.....	26
2.2 Hypotézy.....	26
3. Metodika	26
3.1 Charakteristika sledovaného souboru.....	26
3.2 Odběr vzorků.....	27
3.3 Metody parazitologického vyšetření.....	27
3.3.1 Mikroskopické vyšetření stolice.....	27
3.3.1.1 M.I.F.C.....	27
3.3.1.2 Barvení dle Miláčka-Vítovce.....	28
3.3.1.3 Barvení Calcofluorem.....	29
3.3.2 Molekulární diagnostika.....	30

3.3.2.1	Izolace DNA ze vzorku stolice.....	30
3.3.2.2	Polymerázová řetězová reakce	33
3.3.2.3	Gelová elektroforéza	35
3.3.2.4	Extrakce z gelu.....	36
4.	Výsledky	38
4.1	Mikroskopické vyšetření stolice.....	38
4.1.1	Výsledky vyšetření stolice koncentrační sedimentační metodou....	38
4.1.2	Výsledky vyšetření stolice barvením dle Miláčka a Vítovce.....	38
4.1.3	Výsledky vyšetření stolice barvením Calcofluor.....	38
4.1.4	Nálezy mikrosporidií metodou PCR.....	39
4.1.5	Vyhodnocení výsledků sekvenace a fylogenetické analýzy.....	39
4.1.6	Výsledky vyšetření sledovaného souboru jednotlivými metodami..	40
5.	Diskuze	41
6.	Závěry	45
7.	Literatura	46
8.	Klíčová slova	59

Úvod

Oportunní paraziti jsou organismy, kteří mohou vyvolat závažné 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

Parazit neboli cizopasník je organismus, jenž získává živiny z hostitele, jednoho či více. Obvykle dochází k poškození hostitele (Rohde, 2005).

Parazitismem označujeme soužití dvou organismů, hostitele a parazita.

Existuje několik typů soužití organismu a hostitele. Symbióza je definována jako vztah dvou organismů, kdy organismy nemohou bez sebe existovat, zahrnuje komensalismus, forézu, mutualismus (Volf et al., 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 al., 2007). Endoparazity lze dělit na střevní, krevní, dutinové a tkáňové. Toto rozčlenění je na základě napadeného orgánu (Bednář, 1999).

Parazitické organismy lze dělit 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 al., 2007, Bednář, 1999). Permanentní paraziti setrvávají v hostiteli i celý život (Volf et al., 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).

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). Mezi nejrozšířenější parazitózy v našich podmínkách patří toxoplasmóza, giardióza, ojediněle amebóza a kryptosporidióza, více informací na webové adrese www.szu.cz.

Vybraná parazitární onemocnění v ČR v letech 2001-2009 znázorňuje Tab. 1.

Tab. 1: Vybraná parazitární onemocnění v ČR v letech 2001-2009

Diagnóza	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Anebóza	21	25	29	18	15	20	9	9	11	5
Giardióza	254	362	216	172	102	92	141	90	79	47
Kryptosporidióza	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0
Toxoplasmóza	670	516	646	455	319	347	328	231	248	221

(www.szu.cz)

1.3 Parazitární infekce

Parazitární infekce mohou být způsobeny prvoky, červy, členovci (Göpferová et al., 2006). Většina parazitárních infekcí je dlouhodobými chronickými procesy. 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).

1.3.1 Obrana hostitelského organismu proti parazitární infekci

Přežití prvoků je závislé na dostupnosti substrátu. 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.

V první linii dochází k uplatnění fyzikálně-chemických bariér v sliznici trávicího traktu. Muciny a mucinové molekuly mají podíl na adhezi a invazi hostitelské buňky. Hostitelské muciny brání usídlení parazitů. Paraziti secernující enzymy degradující mucin, překonají 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. Humorální složku tvoří alternativní cesta aktivace komplementu, jenž vyvolají povrchové vrstvy protozoí (Overath et Aebischer, 1999).

1.3.1.2 Specifická imunita

Subpopulace Th1 zprostředkuje buněčnou imunitní odpověď proti intracelulárním parazitickým protozoím. IL-2, IL-12, TNF-beta a INF-gama jsou vylučovány přednostně. Subpopulace Th2 zprostředkuje humorální imunitní odpověď, u které dochází k produkci IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 a TNF- α (Jíra, 2009).

U intestinálních nákaz se uplatňuje slizniční imunitní systém. Imunitní buňky tvoří CD4+ a CD8+ T buňky, B, 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 40 g alkoholu denně u žen, u mužů 40 – 60 g denně. Poškození zdraví fyzického nebo psychického je výsledkem nadměrné konzumace alkoholu, tedy škodlivé konzumace. Zde se množství alkoholu pohybuje u žen okolo 40 g na den, u

mužů okolo 60 g denně. Závislost na alkoholu je definována jako soubor fyziologických, behaviorálních a kognitivních fenoménů, kdy požívání alkoholu je pro jedince prioritou nad vším ostatním.

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.

Alkohol narušuje imunitní systém, což může způsobit zvýšenou vnímavost k určitým infekcím, tuberkulózy, pneumonie a HIV (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).

Abúzus alkoholu je spojen se sníženou produkcí protilátek a snížením aktivity makrofágu, často je také provázen proteinovou malnutricí a poklesem imunity (Treno et al., 2008, Gyongi , 1997)

Alkohol zasahuje do funkce buněk a molekul, které jsou součástí imunitního systému, inhibuje funkci buněk pohlcovat a ničit mikroorganismy, jež napadají organismus. Ovlivňuje produkci a signalizaci molekul, které koordinují imunitní odpověď organismu (Gyongi, 1997).

Alkohol má vliv na zánětlivou odpověď organismu, může ovlivnit jak sekvenci, tak úroveň této odpovědi. Dochází k redukci schopnosti lymfocytů proliferovat a diferenciovat po aktivaci antigenem. Můžeme pozorovat zvýšené množství protilátek v krvi, protože B-lymfocyty produkují protilátky a je tedy zvýšen počet protilátek i těchto buněk. Jsou zasaženy také cytokiny, jejich produkce a funkce (Treno et al., 2008, Gyongi , 1997). U alkoholiků dochází k expanzi CD57 + T buněk (Song et al., 2001). Ke zvýšení IgE v séru, ale odpovědné mechanismy nejsou známy. Produkce IgE je závislá na B-ly stimulaci a na některých cytokinech, především IL-4 a IL-13, T-ly jsou významně sníženy u pacientů s alkoholickou hepatitidou nebo cirhózou. Pokles T buněk v periferní krvi naznačuje základní poškození buněčně zprostředkované odpovědi vůči alkoholickému onemocnění jater (Bernstein, 1974). Akutní příjem alkoholu inhibuje

aktivitu DC buněk, tedy antigen-prezentující funkci buňky (Szabo et al., 2004). Zneužívání alkoholu vede ke změnám neutrofilů a makrofágů.

Chronická pití alkoholu způsobuje zvýšení střevní propustnosti, což vede k abnormalitám ve střevní epiteliální vrstvě. Zvýšená propustnost usnadňuje průnik bakterií přes střevní bariéru. Bakterie se dostanou do mizních uzlin a portálního oběhu, to může způsobit sepsi (Moss, 2005).

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 mitochondrie, Golgiho aparát a bičinky (Corradi et Keeling, 2009).

Mikrosporidie se intenzivně množí v cytoplasmě hostitelské buňky. 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. Z každé buňky parazita vzniká spora, 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 al., 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, zejména u osob s poruchami imunity (de Souza et Garcia-Zapata, 2006). Byly objeveny jako původci infekčního onemocnění u již zmíněných pacientů s AIDS, avšak také u příjemců transplantovaných orgánů, dětí, cestovatelů, osob nosících kontaktní čočky, starších osob (Didier, 2005). Infikují široké spektrum organismů (Windsor, 1997). Spóry mikrosporidií jsou běžně v životním prostředí. Patogenní pro člověka byly nalezeny ve vodě (Weis, 2001).

Organismus se brání mikrosporidiím imunitní odpovědí typu Th1 (Mathew 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 al., 2007).

Enterocytozoon bieneusi náleží do rodu *Enterocytozoon*. Rod *Enterocytozoon* je typický svým překotným vývojem (Volf et al., 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 jejuna, též sigmoideum, rektum, vzácně i epitel žlučových cest, vyvolává dlouhodobé průjmy (Šerý et Bálint, 1998, 31). Parazit poškozují enterocyty a uvolněné spory se dostávají do stolice. Výskyt byl zaznamenán u imunokompromitovaných osob, u pacientů s AIDS, osob s neurologickými poruchami (Canning et Hollister, 1990, Sak et al., 2008). Multiorgánová mikrosporidiióza *Enterocytozoon 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 identifikována u osob s počtem buněk CD4+ < 100 buněk/ml, stejně jako *E. intestinalis* (Okhuysen,

2001). Diseminovaná infekce může projevit při hodnotě $CD4+ < 50$ buněk/ mm^3 (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 objeveny 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 konečniku. Změny se projevují atrofií, prodloužením krypt, fúzí klků (Černý et al., 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). Parazit je schopen diseminovat do plic, ledvin. 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 $CD4+ 382$ 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).

1.6 Kryptosporidie

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

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

Životní cyklus kryptosporidií je monoxenní (Bushen et al., 2006).

Sporozoiti se mění na merozoity, kteří jsou situováni parazitoformní vakuole pod buněčnou membránou enterocyty, jde tedy o intervilózní lokalizaci (Elliot et Clark, 2000).

Rozměry oocyst jsou v rozmezí 3-6 μm . Oocysty excystují v lumen tenkého střeva, obsahují čtyři infekční sporozoity. Sporozoit vytvoří intracelulární, ale extracytoplasmatickou parazitoformní vakuolu, která dá vznik trofozoitu a merontu. Během nepohlavního rozmnožení v průběhu první merogonie dojde k rozpadu na 8 merozoitů. Poté může dojít k druhé merogoni, během které vznikají čtyři merozoity, nebo ukončení reprodukce. V případě druhé merogonie, merozoity vyzrají v mikrogamety a makrogamety. Splnutím mikrogamety a makrogamety vzniká zygota, z které se mohou vyvinout tenkostěnné oocysty nebo silnostěnné oocysty (Bushen, 2006).

Kryptosporidie považujeme za příčinu průjemových 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

et al., 2008). Způsobují gastroenteritidu, závažnost onemocnění závisí na místě infekce, imunitním stavu jedince (Chalmers et Davies, 2010). Inkubační doba se pohybuje v rozmezí od 2 do 10 dnů (Alcantara et al., 2000).

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).

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, kde je spolehlivost záchytu < 10 oocyst (Morgan et Thompson, 1998).

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

Kryptosporidióza 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 kokcidie (Jíra, 2009)

Životní cyklus *C. parvum* prochází několika fázemi.

Cryptosporidium parvum se nezanořuje do cytoplasmy, ale je od ní odděleno přichytnou ploškou, jež představuje intracelulární kompartment v apikální oblasti enterocyty. 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 (Jíra, 2009). Energetický metabolismus kryptosporidií je závislý na glykolýze.

Z tofozoitů 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 enviromentálních vlivů (Okhuysen et Larusso, 2002). 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 parazitoformní vakuole, tím si udržují svou infekčnost (Jíra, 2009).

Tento intracelulární prvok je příčinou průjmu u lidí a zvířat po celém světě (Denf et al., 2003). Inkubační doba má rozmezí 5 - 21 dnů (Černý et al., 2008). *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 kryptosporidióza manifestuje v chronický průjem s dehydratací a malabsorpcí (Černý et al., 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, 2001). 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, 2001).

1.7 Isospora belli

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

Sporulace probíhá ve střevě hostitele i ve vnějším prostředí, tedy endogenně i exogenně. Endogenní formy lze najít v enterocytech lemujících klky tenkého střeva.

Nákaza má chronický charakter způsobený opakováním merogonie a gametogonie ve střevě. Vysporulované oocysty mají elipsovitý tvar s kuželovitými

póly, měří 20 – 33 x 10 – 1 µm (Restrepo et al., 1987). Asexuální i sexuální formy lze najít u nemocných s AIDS také v epitelu žlučových cest. Diseminované formy lze najít v lymfatických uzlinách, játrech, slezině jako tkáňové cysty. V tkáňové cystě se obvykle nachází 1 zoit (Lindsay et al., 1997). Nákaza se šíří fekálně-orální cestou, ale též vodou (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 (Jíra, 2009). U imunokompromitovaných jedinců se izospóra chová jako oportunní parazit, napadá střevní stěnu, působí chronické průjemy, nauzeu, dehydrataci, malabsorpční syndrom (Jíra, 2009). Může se objevit eozinofilie (Jíra, 2009).

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 ve 14 %, u 98 % se vyskytoval chronický nebo akutní průjem. U 81,25 % osob byl počet CD4+ buněk < 200/mm³ (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 (Muller 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. 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).

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 al., 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 recidivami (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 al., 2008, 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 mezihostitele, které mohou představovat teplokrevní obratlovci včetně člověka. Nepohlavní fáze probíhá nejčastěji u mezihostitelů, ale také u konečných hostitelů (Jíra, 2009).

Vegetativní toxoplazmová forma je trofozoit, velikosti 4 - 7 x 1,5 - 4 μm. Trofozoiti se množí endodygonií. Při vzniku dvou dceřiných buněk označujeme proces jako endodygonický. Nepohlavně se množící formy po určité době vytvoří tkáňovou cystu (pseudocystu) (Jíra, 2009). Pseudocysty se uplatňují při přenosu toxoplasmózy z postiženého zvířete na člověka, konzumací nedostatečně tepelně upraveného masa (Černý et al., 2008). *Toxoplasma gondii* proniká do makrofágů pomocí fagocytózy (Grimmwood et al., 1996). Tkáňová cysta je klidovou formou kulovitého nebo vejčitého tvaru, velikosti 300 μm. Na povrchu tkáňové cysty je membrána odolná vůči tlaku a působení trávicích tekutin jako je kyselina solná, pepsin, trypsin. Obsahem jsou cystozoiti, se schopností přežít mimo tělo živého hostitele až 14 dní, v případě teplotních podmínek od + 8 °C až +10 °C (Radke et al., 2003).

Izosporová, pohlavní fáze probíhá v enterocytech konečného hostitele, tedy kočkovité šelmy (Jíra, 2009). Paraziti se vyvíjejí v enterocytech. Schizonti mají granulární, bazofilní cytoplasmu. Schizonti vytvoří merozoity. Ke splnutí gamet, dochází v hostitelské buňce ještě před vytvořením stěny oocyst (Ferguson, 2002). Sporulace trvá 1 - 5 dnů. Vysporulovaná oocysta izosporového typu měří 14 x 11 μm (Ferguson, 1979).

Nákaza se šíří alimentární a fekálně-orální cestou, kapénkovou infekcí, oděrkami v kůži po manipulaci s infekčním materiálem (Jíra, 2009). Při nákaze těhotné ženy mohou toxoplazmata proniknout placentou a napadnout plod (Havlík et al., 2002).

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 byla zjištěna pozitivita toxoplazminového testu celkem u 32,1 % (Jíra et Rosický, 1983). 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 (Zitek, 1998).

Obrana organismu proti *T. gondii* je zajištěna vrozenou imunitou, tedy neutrofily a trombocyty. Toxoplazmózy mohou penetrovat do neutrofilu, tím unikají fagocytóze. Takto infikované neutrofily 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 ve formě tkáňové cysty celoživotně 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	únnavový 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 pyrimatamium se sulfoamidem (Havlík et al., 2002).

1.10 *Pneumocystys jiroveci*

Pneumocystys jiroveci je z molekulárně fylogenetického hlediska kvasinková houba ze skupiny Hemiascomycotina (řád Pneumocystidales) (Volf, 2007). *Pneumocystis jiroveci* má dvě životní formy, trofozoit a cysta. Obě můžeme nalézt v infikované plicní tkáni (Garcia et Bruckner, 1997). Tento parazit je hlavní původce oportunních nákaz u pacientů s AIDS (Gerberding, 1998).

P. jiroveci vyvolává pneumocystózu. Množí se na povrchu epitelu vystýlajícího plicní alveoly. U hostitele s imunodeficitem mohou buňky zaplnit plicní sklípky a způsobit smrt hostitele (Volf et al., 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 ve spojení s AIDS u homosexuálů (Černý et al., 2008). Pneumocystóza se může objevit u starších dětí nebo dospělých při poklesu CD4+ buněk pod 200/mm³ (Garcia et Bruckner, 1997).

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

1.11 *Entamoeba histolytica*

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

Entamoeba histolytica má 2 životní formy. Trofozoity formy magna představuje invazivní stadium, je protaženého tvaru, velikosti 20 - 40 μm (Clark et Roger, 1995). Forma minuta měří 10-16 μm, vyskytuje se mimo epizody průjmu, uvádí se, že jde o neinvazivní prekurzor cysty. Cysta představuje klidovou životní formu, má kulovitý tvar, měří 8 - 20 μm. Podle stupně zralosti cysta obsahuje 1 - 4 jádra. Rozlišujeme několik stadií, precysta, cysta, metacysta (Ghosh et al., 1999).

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 ochranou 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).

Amebóza 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).

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

1.12 *Giardia intestinalis*

Bičíkovce *G. intestinalis* řadíme do kmene Metamonada, třídy Trepomonadea řádu Diplomonadida, (Jíra, 2009).

Přísátí prvoka k střevní sliznici umožňuje přísavný disk (Volf et al., 2007). Giardie se mezi hostiteli přenáší kontaminovanou vodou s odolnými cystami velikosti 8 - 12 x 7 - 10 μm (Smith et Paget, 2007). *Giardia intestinalis* potřebuje k dokončení svého životního N-acetylgalaktosamin pro obalení cyst (Monk et al., 2005).

Giardie žije v duodenu a horní části jejunu. Diseminovat může do žlučníku a žlučovodu. U velmi silných infekcí se zvyšuje sekreční činnost, dochází tedy k nadprodukci hlenu (Jíra, 2009).

Imunodeficitní pacienti prodělávají onemocnění velmi těžce. Parazit postihuje častěji děti (Smith et Paget, 2007). U dospělé populace je onemocnění nejčastěji mezi 20. a 40. Rokem. Většinou se jedná o rodiče postižených dětí. V České republice se

ročně objevuje okolo 100 případů giardiózy (Göpferová et al., 2006). Infekční dávka je 25 - 100 cyst (Smith et Paget, 2007). Objevuje se názor, že lidé s krevní skupinou A mají větší predispozice k nákaze. Osoby s krevní skupinou 0 jsou odolnější. *Giardia intestinalis* je střevním prvokem, jenž je častým původcem cestovatelských průjmů (Okhuysen, 2001).

Nákaza je přenosná fekálně-orální cestou (Okhuysen, 2001). *G. intestinalis* lze detekovat i ve vodě. Při studiu zdrojů pitné vody v jižním Rusku a Bulharsku bylo z celkového množství 166 vzorků různého původu (povrchová voda, voda z kohoutku, odpadní voda) 9,6 % pozitivních na *Giardii* a 18,1 % na *Cryptosporidium*. *G. intestinalis* byla zjištěna i ve vodě balené (Karanis et al., 2006). *Giardia* je nejčastěji se vyskytující lidský střevní prvok po celém světě. Klinické projevy onemocnění se pohybují od asymptomatické infekce až po průjem s malabsorpcí (Roy et al., 2005). Inkubační doba je 6 – 21 dní (Okhuysen, 2001). Lamblióza je nejčastěji v rozvinutých zemích. V Indonésii je prevalence až 43 %. Rozšíření je spojeno s nízkou úrovní socioekonomických a sanitárních podmínek. Vysoká incidence lambliózy je u postižených s imunodeficiencí (Jíra, 2009).

Při parazitologické diagnostice v Bratislavě, v letech 1995-1999, byla nákaza zjištěna u zdravých dětí předškolního věku v 9,9 %, školního věku v 8,6 %, u hendikepovaných dětí 14,6 % až 16,5 % (Totková, 2002), v roce 2005 byla lamblióza diagnostikována v ČR (Jíra, 2009).

Nejčastější výskyt je v Severní Americe a Evropě (Vanacova et al., 2003).

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

1.13 *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 al., 2007). *S. 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 filarimorfni 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 0,4 mm, zpravidla parazituje na sliznici jejunu (Černý et al., 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 et al., 2008). Infekce *Strongyloides stercoralis* postihuje 50-100 milionů lidí na celém světě (Marty et. al., 2005).

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 et al., 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 et al., 2008).

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo shromáždit materiál (stolice) pacientů závislých na alkoholu a vyšetřit 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 alkohol se neodráží na výskytu oportunních parazitů.

3. Metodika

3.1 Charakteristika sledovaného souboru

Sledovaný soubor se skládal z 20 vzorků stolice. Z celkového množství dárců byli 4 dárce (20 %) 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. Zbýlých 16 (80 %) osob závislých na alkoholu bylo z terénu, převážně z oblasti Moravy. Pacienti závislí na alkoholu z terénu, jsou léčeni ambulantně v psychiatrické ordinaci. Všichni dárce byly starší 18 let. Věk všech pacientů byl od 20 let do 70 let. Věkové rozmezí pacientů Psychiatrické léčebny Červený Dvůr bylo od 25 let do 59 let. U pacientů z terénu bylo věkové rozmezí 20 až 70 let. Sledovaný soubor tvořili muži i ženy, pohlaví však zveřejnilo jen několik z nich.

V průběhu výzkumu bylo osloveno několik léčeben. Na spolupráci však přistoupila jen Psychiatrická léčebna Červený Dvůr. Odmítnutí bylo zdůvodněno nedostatkem času institucí, hospitalizací pacientů v deliriu, agresivními pacienty,

spolupráce by byla velmi obtížná. Množství materiálu odráží také neochotu pacientů účastnit se vyšetření oportunních parazitů.

Odběr vzorku byl anonymní, pacienti uvedli pouze věk na štítek jímž byla označena sběrová zkumavka. Převážně se jednalo o stabilizované pacienty, kteří již nekonzumují alkohol.

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

3.2 Odběr vzorků

K vyšetření jsem použila vzorky nativní stolice. Vzorky stolice byly odebrány do sběrových nesterilních nádob. Odběr 4 vzorků se uskutečnil v Psychiatrické léčebně Červený Dvůr. Ostatní vzorky byly odebrány od terénních pacientů z různých lokalit.

Vzorky byly před zpracováním uchovány v chladu, transport probíhal pomocí přenosného chladicího 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.

Koncentrační metoda 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.

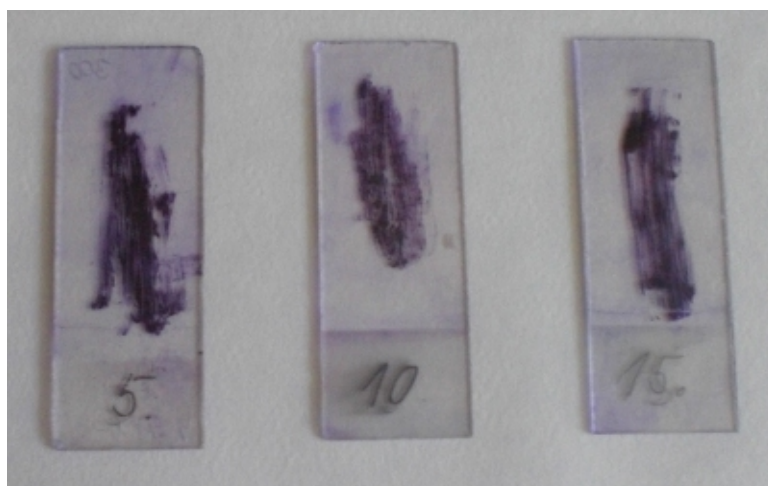
Pracovní roztoky:

- 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.

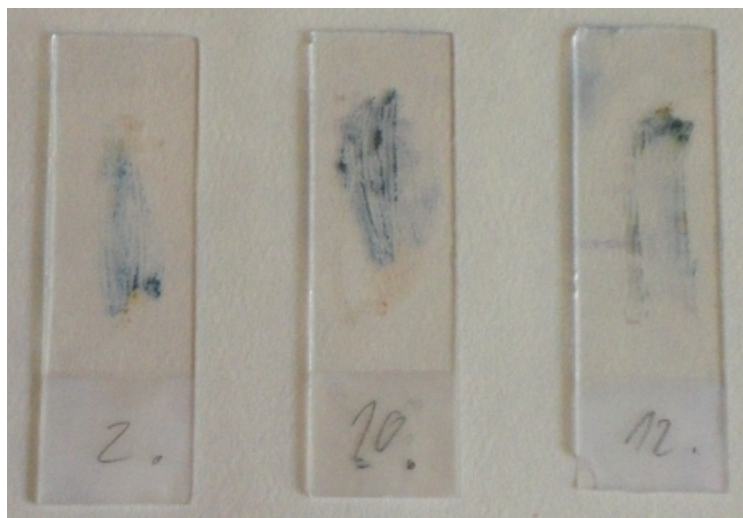
Pracovní roztoky:

- 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 kitu QIAamp DNA Stool.

Pracovní postup:

1. Do eppendorfky navázat 180 – 200 mg (velikost hrášku) vzorku stolice.

2. Přisypat skleněné kuličky o průměru 0,5 mm.
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 eppendorfky, znovu centrifugovat 3 minuty při max. rychlosti.
11. Napipetovat 15 µl proteinase K do čisté mikrozkušavky a přidat 200 µl supernatantu.
12. Přidat 200 µl Buffer AL, vortexovat 15 s.
13. Inkubovat 10 minut při 70 °C v inkubačním bloku.
14. Přidat 200 µl 96 % etanolu, vortexovat.
15. Přepipetovat lyzát na QIAamp kolonu opatřenou sběrnou zkumavkou, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti.
16. Přidat 500 µl Buffer AW1, centrifugovat 1 minutu při max. rychlosti, vyměnit sběrnou zkumavku.
17. Přidat 500 µl Buffer AW2, centrifugovat 3 minuty při max. rychlosti.
18. Přenést kolony na čistou mikrozkušavku, napipetovat 200 µl Buffer AE 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 eppendorfky

3.3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metodou PCR je možno získat velké množství kopií určitého úseku molekuly DNA pomocí primerů.

Celkový objem reakční směsi pro každou PCR byl 25 μ l (Tab. 2). Byly provedeny dvě sady PCR s různými sety primerů, jedna pro průkaz přítomnosti *E. bienensii* 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. bienensii*.

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

Roztok	Objem (μ l)
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 bienensii*

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:

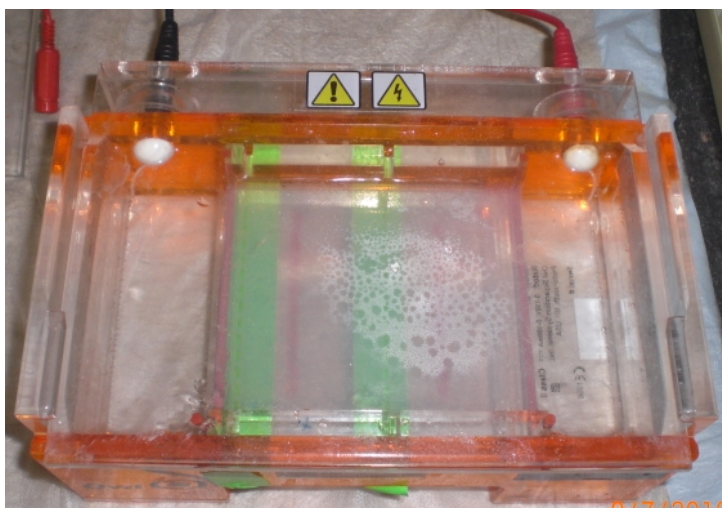
1. 50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
2. Agaróza
3. Ethidium bromid
4. 100 bp DNA ladder

Pracovní postup:

1. Agarozu s TAE pufrum rozehtát v mikrovlnné troubě.
2. Ochladit pod tekoucí vodou.
3. Připipetovat 1 pl Erbe, aby výsledná koncentrace byla 0,5 $\mu\text{g/ml}$.
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 μ l 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.



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 lab. 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.
13. Inkubovat 1 minutu a poté centrifugovat 1 minutu při max. g.

4. Výsledky

4.1 Mikroskopické 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).

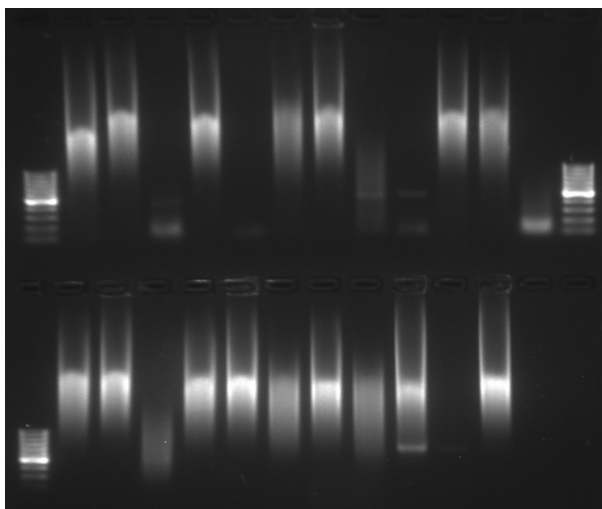
Tab.5 : Výsledky vyšetření stolice barvením Calcofluor

Číslo vzorku	Hodnocení	Číslo vzorku	Hodnocení
1	-	11	-
2	-	12	-
3	-	13	-
4	-	14	-
5	-	15	-
6	-	16	-
7	-	17	+
8	-	18	-
9	-	19	-
10	-	20	-

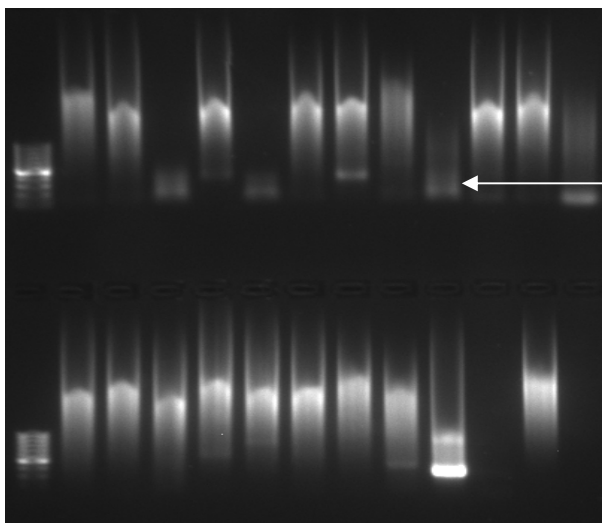
Tento nález však nebyl potvrzen metodou PCR. Neshoda byla pravděpodobně způsobena záměnou mikrosporidií za kvasinky nebo jiné střevní parazity, kteří pod UV světlem fluoreskují totožně.

4.1.4 Nález mikrosporidií metodou PCR

Pomocí PCR bylo vyšetřeno všech 20 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: Výsledek gelové elektroforézy (*Enterocytozoon bienusi*)



Obr. 10: Výsledek gelové elektroforézy (*Encephalitozoon spp.*)

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	Molekulární vyšetření
1	Pevná	-	-	-	-
2	Pevná	-	-	-	-
3	Pevná	-	-	-	-
4	Pevná	-	-	-	-
5	Pevná	-	-	-	-
6	Pevná	-	-	-	-
7	Pevná	-	-	-	+
8	Pevná	-	-	-	-
9	Pevná	-	-	-	-
10	Pevná	-	-	-	-
11	Pevná	-	-	-	-
12	Pevná	-	-	-	-
13	Pevná	-	-	-	-
14	Pevná	-	-	-	-
15	Pevná	-	-	-	-
16	Pevná	-	-	-	-
17	Měkká	-	-	+ Nepotvrzeno	-
18	Pevná	-	-	-	-
19	Pevná	-	-	-	-
20	Pevná	-	-	-	-

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. Kryptosporidióza se daleko častěji vyskytuje ve spojení s AIDS (Denf et al., 2003). V Indonésii byla kryptosporidióza diagnostikována u 4,9 % HIV / AIDS pacientů (Kurniawan et al., 2009). Dříve byla diagnostikována kryptosporidióza až u 60 % AIDS pacientů (Fleming, 1990). Toto vypovídá o zlepšující se účinku terapie HIV/ AIDS HAART. K přenosu kryptosporidií dochází alimentární cestou. Riziko přenosu kontaminovanou vodou je závažným globální problém (Carey, 2004). V Nizozemsku bylo množství oocyst rodu *Cryptosporidium*, které bylo vyloučeno čistírnou vod 85 % (Medema, 2001). Celý sledovaný soubor pobývá v dobrých hygienických podmínkách, riziko nákazy kontaminovanou potravou nebo vodou je malé. Pacienti Psychiatrické léčebny Červený Dvůr jsou navíc pravidelně kontrolováni praktickým lékařem.

Přítomnost mikrosporidií byla prokázána u 1 vzorku. 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. 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 (5 %) 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 mikrosporidióze.

Mikrosporidie jsou patogenem jak pro člověka tak i pro zvířata. *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I, který byl v našem případě detekován u jednoho pacienta ve věku 45 let se nejčastěji vyskytuje u králíků, psů a šelem. Označuje se 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). *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 cuniculi* I byl také izolován u 6 AIDS pacientů ve Švýcarsku (Rossi et al., 1998). *Encephalitozoon* byl též deteková v souvislosti s idiopatickou CD4+ T-lymfopenie a v pokročilém stadiu lidské imunodeficiency (Kodjikian et al, 2005). Z imunologického hlediska je nejlépe prostudovaným druhem *E. cuniculi* (Salát et Braunfuchsová, 2002). *Encephalitozoon cuniculi* způsobuje následující onemocnění, hepatitidu, zánět pobřišnice, zánět ledvin, encefalitidu, urethritis, zánět vedlejších nosních dutin, keratokonjunktivitidu, cystitidu a průjem (Weiss et Schwartz, 1993).

Enterocytozoon bieneusi je nejčastějším původcem lidské mikrosporidie. *Enterocytozoon bieneusi* je častým gastrointestinálním parazitem u AIDS pacientů (Velasquez et al., 1999). V Portugalsku dosáhl výskyt *E. bieneusi* 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. bieneusi* 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. bieneusi* (Černá, 2010). V roce 2008 byly mikrosporidie detekovány s prevalencí 100 % u drogově závislých, konkrétně druh *E. bieneusi* (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 a rozsahu 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 naze mikrosporidii. Dle získaných informací o sledovaném souboru nikdo netrpěl průjmovým onemocněním, které je velmi často

přítomno u mikrosporidiových nálezů (Didier, 2004). Při hovoru s ošetřujícím lékařem v Psychiatrické léčebně Červený Dvůr bylo zjištěno, že pacienti jsou bez větších zdravotních problémů. Pacienti z terénu pobývají v dobrých hygienických podmínkách. 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 rozsáhlejší soubor pacientů. 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 (5 %).
- 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. Acosta, NA., Morales, JL., Guio, YL., Álvarez, NC., Foronda, P., Florez, JA., Izquierdo, F., Díaz, NB., 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
2. Adler, P., Wood, SJ., Lee, YC. (1995): High affinity binding of *Entamoeba histolytica* lectin to polyvalent N-acetylgalactosamidines. *J Clin Microbiol* 270: 5164-5171
3. Adler, M., Wacker, R., Niemeyer, CM. (2003): A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 240-250
4. Alcantara, CS., Yang, CH., Steiner, TS. (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
5. 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
6. Bednář, M. *Lékařská mikrobiologie*, Praha: Marvil 1999. 588s.
7. Beran, J., Vaništa, J. *Základy cestovního lékařství*, Praha: Galén. 2006. 288s. ISBN 80-7262-435-0
8. Bergendahl, V., Glaser, BT., Burgess, RR. (2003): A fast Western blot procedure improved for quantitative analysis by direct fluorescence labeling of primary antibodies. *J Immunol Meth* 277: 117-125
9. 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
10. Bernstein, IM., Williams, RC., Webster, KH., Strickland, RG. (1974): Reduction in circulating T lymphocytes in alcoholic liver disease. *Lancet* 304:488-490

11. Blanshard, C., Shanson, DC., Gazzard, BG. (1997): Pilot studies of azitromycin, letrazuril and paromycin in the treatment of cryptosporidiosis. *Int J STD AIDS* 8: 124-129
12. Boldorini, R., Tosoni, A., Mazzuco, G. (1996): Intracellular protozoan infection in small intestinal biopsies of patients with AIDS. *Pathol Res Pract* 192: 249-259
13. Brenier-Pinchart, MP., Pelloux, H., Derouich-Guergoug, D. (2001): Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol* 17: 292-296
14. Bucharová E., (2009): *Střevní paraziti u uživatelů drog*. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
15. Bunout, D. (1999): Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition* 15: 583-589
16. Bushen, OY., Lima, AAM., Guerrant, RL. (2006): Cryptosporidiosis. *Trop Infect Dis* : 1003-1014
17. Canning, EU., Hollister, WS. (1990): *Enterocytozoon bienersi* (Microspora): prevalence and pathogenicity in AIDS patients. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 84: 181-186
18. Carey, CM., Lee, H., Trevors, JT. (2004): Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Wat Res* 38: 818-862
19. Carreno, DP., Martin, DS., Barta, JR. (1999): *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res* 85: 899-904
20. 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
21. Clark, CG., Roger, AJ. (1995): Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Nat Acad Sci* 92: 6518-6521

22. Comin, CE., Santucci, M. (1994): Submicroscopic profile of *Isospora belli* enteritis in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Ultrastruct Pathol* 18: 473-482
23. Corradi, N., Keeling, PJ. (2009): Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biol Rev* 23: 1-8
24. Černá, L. (2010): *Oportunní paraziti u pacientů geriatrických zařízení*. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
25. Černý, Z., et al. *Infekční nemoci Jak pečovat o pacienty s infekčním onemocněním*, Brno: NCO NZO, 2008. 284s. ISBN 978-80-7013-480-1
26. de Górgolas, M., Fortés, J., Guerrero, MLF: (2001): *Cyclospora cayentanensis* cholecystitis in patient with AIDS. *Ann Intern Med* 134: 166
27. de Souza, ES., Garcia-Zapata, MT. (2006): Laboratory diagnosis of opportunistic intestinal parasites with emphasis on human microsporidiosis, in Goiania-Go. *Trop Med* 39: 560-564
28. Denf, M., Rutherford, MS., Abrahamsen, MS. (2003): Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*. *Adv Drug Deliver Rev* 56: 869-884
29. Denkers, EY. (1996): A *Toxoplasma gondii* Superantigen: Biological effects and implications for the host-parasite interaction. *Parasitol Today* 67: 362-366
30. Deplazes, ES., Mathis, A., Baumgartner, R. (1996): Immunologic and molecular characteristic of *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patient with keratokonjunktivitis. *J Infect Dis* 163: 617-621
31. Didier, ES. (2005): Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94: 61-76
32. Didier, ES., Stovall, ME., Green, LC., Brindley, PJ., Sestak, K., Didier, PJ. (2004): Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 126: 154-166
33. Ebrahimzadeh, A., Bottone, EJ. (1996): Persistent diarrhea caused by *Isospora belli*: therapeutic response to pyrimethamine and sulfadiazine. *Diag Microbiol Infect Dis* 26: 87-89

34. Elliot, DA., Clark, DP. (2000): *Cryptosporidium parvum* induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface. *Infect Immun* 68: 2315-2322
35. Fatoohi, AF., Cozon, GJ., 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
36. Ferenčík, M. *Imunitní systém*, Praha: Grada. 2005. 235s. ISBN 80-247-1196-6
37. Ferguson, DJP. (2002): *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol* 18: 355-359
38. Ferguson, DPJ., Birch-Andersen, A., Siim, JCHR. (1979): Ultrastructural studies on the sporulation of oocyst of *Toxoplasma gondii*. *Acta Path Microbiol Scand Sect B* 87: 253-260
39. Filip M. B. Ferreir, FMB., Bezerra, L., Santos, MBG., Bernardes, RMA., Avelino, I. (2001): Intestinal microsporidiosis: a current infection in HIV-seropositive patients in Portugal. *Microbes Infect* 3:1015-1019
40. Fleming, AF. (1990): Opportunistic infections in AIDS in developed and developing countries. *Trans Roy Soc Trop Med* 84: 1-6
41. Forthal, DN., Guest, SS. (1984): *Isoospora belli* enteritis in three homosexual men. *Amer J Trop Med Hyg* 33: 1060-1064
42. Fournier, S., Liguory, O., Santillana-Hayat, M., Guillot, E., Sarfati, C., Dumoutier, N., Molinaa, JM., Derouin, F. (2000): Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *Immunol Med Microbiol* 29: 95-100
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, LS., Bruckner, DA., *Diagnostic medical parasitology*, Washington: ASM PRESS, 1997. 937s.
45. Garweg, JG., 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, JA. (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. Georges, E., Rabaud, C., Amiel, C., Kurès, L., Guedenet, JC., Allamagny, E., May, T., Canton, P. (1998): *Enterocytozoon bienewisi* multiorgan microsporidiosis in a HIV-infected patient. *J Infect* 36: 223-225
49. Gerberding, JL. (1998): Nosocomial Transmission of Opportunistic Infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 19:574-577
50. 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
51. Ghosh, SK., 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
52. Göpferová, D., Pazdiora, P., Dáňová, J. *Epidemiologie (obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí)*, 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006. 298s. ISBN 80-246-1232-1
53. Grimwood, J., Mineo, JR., Kasper, LH. (1996): Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infect Immun* 64: 4099-4104
54. Gyongyi, S. (1997): Alcohols Contribution to Compromised Imunity. *Alcohol Health Res World* 21: 30-36
55. Havlík, J. *Infekční nemoci*, 2.vydání. Praha: Galén, 2002. 186s. ISBN 80-7262-173-4
56. Hollister, WS., Canning, EU. (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
57. Hořejší, V. *Základy imunologie*, Praha: Triton, 2005. 279 s. ISBN 80-7254-686-4
58. Hucks, SJ., Theodoropoulos, G., Carrington, SD. (2000): The role of mucins in host-parasite interactions. Part I – protozoan parasites. *Parasitol Today* 16: 476-481

59. Chalmers, RM., Davies, AP. (2010): Clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol* 124: 138- 164
60. Chanon, JY., Miselis, KA., Minnis, LA. (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
61. Chen, XM., Larusso, NF. (2000): Mechanism of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 118: 368-379
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 toxoplazmosy*. 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, DL. 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, SA., Jenkins, M., Okhusyen, PC. (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, NJ., 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. Kovacs, JA., Masur, H. (2009): Evolving Health Effects of *Pneumocystis*. *JAMA* 24: 2578-2584
71. Kurniawan, A., Karyadi, T., Dwintasari, SW., Sari, IP, Yuniastuti, E., Djauzi, S., Smith, HV. (2009): Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 103: 892-898
72. Kodjikijan, L., Garweg, JG., 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
73. Krejsek, J., Kopecký, O. *Klinická imunologie*, Hradec Králové: NUCLEUS HK. 2004. 941s ISBN 80-86225-50-X
74. 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
75. Lindsay, DS., Dubey, JP., Blagburn, BL. (1997): Biology of *Isoospora spp.* from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 10: 19-34
76. Lindsay, DS., Dubey, JP., Toivio-Kinnucan, MA.(1997): Examination of extraintestinal tissue cysts of *Isoospora Belli*. *J Parasitol* 83: 620-625
77. Lono, A., Kumar, FS., Chye, TT. (2010): Prevalence of microsporidia in an indigenous Orang Asli community in Pahang, Malaysia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 104: 214-218
78. Lores, B., López-Miragaya, I., Arias, C., Fenoy, S., Torres, J., del Aguila, C. (2002): Intestinal Microsporidiosis Due to *Enterocytozoon bienersi* in Elderly Human Immunodeficiency Virus–Negative Patients from Vigo, Spain. *Clin Infect Dis* 34:918–921
79. Mačák, J., Mačáková, J. *Patologie*, Praha: Grada. 2004. 347s. ISBN 80-247-0785
80. Marty, FM., Lowry, CM., Rodriguez, M., Milner, DA., Pieciak, SW., Sinha, A., Fleckenstein, L., Baden, LR. (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. Medema, GJ., Schijven, JF. (2001): Modelling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. *Wat Res* 35: 4307-4316
 85. Miller, CM., Boulter, NR., Ikin, RJ., Smith, NC. (2007): The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 39: 23-39
 86. Mok, MTS., Tay, E., Sekyere, E., Glenn, WK., Bagnara, AS., Edwards MR. (2005): *Giardia intestinalis*: Molecular characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase. *Gene* 357: 73-82
 87. Molina, JM., 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, UM., Thompson, RC. (1998): PCR detection of *Cryptosporidium*: the way farward? *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, HS., Aosai, F., Norose, K. (2000): *Toxoplasma gondii* Hsp70 as danger signal in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Cell Stress Chaperon* 5: 328-335

93. Okhuysen, PC. (2001): Traveler's Diarrhea Due to Intestinal Protozoa. *Clin Infect Dis*:110-114
94. Overath, P., Aebischer, T. (1999): Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens. *Parasitol Today* 15: 325-332
95. Pavia, CS., La Mothe, M., Kavangh, M. (2004): Influence of alcohol on antimicrobial immunity. *Biomed Pharmacother* 58: 84-89
96. Pavlásek, I. (1991): Využití glycerinu při detekci oocyst *Cryptosporidium parvum* a *C. baileyi* v trusu savců a ptáku. *Vet Med* 36: 255-256
97. Peters, M., Bienzle, U. (1981): Amöbenleberabszess. *Inter Prax* 21: 679-688
98. Pierce, K., Huston, C.D. (2009): .Protozoan, Intestinal. *Encycloped Microbiol*: 696-705
99. Pollok, RCG., Farthing, MJ., Bajaj-Ellitt, M. (2001): Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology* 120: 99-107
100. Okhuysen, PC., Chappell, CL. (2002): *Cryptosporidium* virulence determinants- where we are yet? *Int J Parasitol* 32: 517-525
101. Que, X., Brinen, LS., Perkins, P. (2002): Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Molec Biochem Parasitol* 119:23-32
102. Quintela, AG., Antón, OE., Barrio, E., Vidal, C., Lojo, S., Pérez, LF., Gude, F. (1999): Serum cytokines and increased total serum IgE in alcoholics. *Ann Allergy Asthma Immunol* 83: 61-67
103. Radke, JR., Guerini, MN., Jerome, MN. (2003): A change in the premitotic period of cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma Gondii*. *Molec Biochem Parasitol* 131: 119-127
104. Restrepo, C., Macher, AM., Radany, EH. (1987): Disseminated extraintestinal isosporiasis in patient with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Path* 87: 536-542
105. Rohde, K. *Marine parasitology*, Collingwood: CSIRO. 2005. 565s.

106. Rossi, P., La Rosa, G., Ludovisi, A., Tamburrini, A., Gomez Morales, MA., Pozio, E. (1998): Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *Int J Parasitol* 28: 1361-1366
107. Rossignol, JF., Ayoub, A., Ayers, MS. (2001): Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis* 184: 103-106
108. Roy, S., Kabir, M., Stroup, SE., Mondal, D., Houpt, ER. (2005): *Giardia* Assemblage A Infection and Diarrhea in Bangladesh Rashidul Haque. *J Infect Dis* 192: 2171-2173
109. Rubík, I., Tolarová, V. (1997): Problematika kokcidiových infekcí (*Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis*) v České Republice. *14. Pečenkovy epidemiologické dny* : 74-75
110. Saito, H., Ishii, H. (2004): Recent understanding of immunological aspects in alcoholic hepatitis. *Hepato Res* 30: 193-198
111. Sak, B., Kváč, M., Hanzlíková, D., Cama, V. (2008): First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 153: 3-4
112. Salát, J., Braunfuchsová P. (2002): *Encephalitozoon cuniculi* a *Encephalitozoon intestinalis* - původci oportunních infekcí. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1: 26-30
113. Sepkowitz, KA. (2002): Opportunistic Infections in Patients with and Patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Dis* 34:1098-1107
114. Shabbir, S. *Foodborne Diseases*, New Jersey: Humana Press. 2007. 531. ISBN 978-1-59745-501-5 (Online)
115. Siddiqui, AA., Berk, SL. (2001): Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Clin Infect Dis* 33: 1040-1047
116. Sifuentes-Osorio, J., Porrás-Cortés, G., Bendall, RP. (2003): *Cyclospora cayetanensis* infection in patient with and without AIDS: biliary diseases as another clinical manifestation. *Appl Environ Microbiol* 69: 4662-4669
117. Shabbir, S. *Foodborne Diseases*, New Jersey: Humana Press. 2007. 531. ISBN 978-1-59745-501-5 (Online)

118. Smith, HV., Paton, CA., Mtambo, MMA. (1997): Sporulation of *Cyclospora* sp. oocyst. *Appl Environ Microbiol* 63: 1631-1632
119. Song, K., Coleman, RA., Albert, C., Ballas, ZK., Waldschmidt, TJ., Mortari, F., LaBrecque, DR., Cook. R. (2001): High priority communication TH1 cytokine response of CD57+ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease. *Alcohol* 24: 155-167
120. 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-absolutne>
121. Subauste, CS., Wessendarp, MJ. (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
122. 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
123. Šerý, V., Bálint, O. *Tropická a cestovní medicína*, Praha: MEDON. 1998. 569s. ISBN 80-902122-4-7
124. Tetley, L., Brown, SM., McDonald, V. (1998): Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology* 144: 3249-3255
125. Tolarová, V. (2005): Co víme o cyklospóze. Oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy. Seminář Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP a dalších. Praha: 13-19
126. Totková, A., Klobušický, M., Valent, M. *Lekárská parazitologie*, Martin: 2008. 400s. ISBN 978-80-8063-263-2
127. Treno, AJ., Ponicki, WR., Remer, LG., Gruenewald, PJ. (2008): Alcohol outlets, youth drinking, and self-reported ease of access to alcohol: A constraints and opportunities approach. *Alcohol Clin Exp Res* 32: 1372-1379

128. Tumwine, J., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Akiyoshi, DE., Buckholt, MA., Tzipori, S. (2002): *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Amer J Trop Med Hyg* 67: 299-303
129. van Gool, T., Biderre, C., Delbac, F., Wentink-Bonnema, E., Peek, R., Vivarès, CP. (2004): Serodiagnostic Studies in an Immunocompetent Individual Infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *J Infect Dis* 189: 2243-2249
130. van Hal, SJ., 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
131. Vanacova, S., Liston, DR., Tachezy, J., Johnson, PJ.(2003): Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 33: 235-255
132. Velasquez, JN., Carnevale, S., Labbe, JH., Chertcoff, A., Cabrera, MG., 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
133. Vivarès, CP., Gouy, M., Thomarat, F. (2002): Functional and evolutionary analysis of eukaryotic genome. *Curr Opin Microbiol* 5: 499-505
134. Volf, P., Horák, P., *Paraziti a jejich biologie*, 1.vydání. Praha: Triton, 2007. 318s. ISBN 978-80-7387-008-9
135. Walker, M., Kublin, JG., Zunt, JR. (2006): Parasitic Central Nervous System Infections in Immunocompromised Hosts: Malaria, Microsporidiosis, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis. *Clin Infect Dis* 42:115-125
136. Weiss, LM. (2001): Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop* 78: 89-102
137. Weiss, LM., Schwartz, DA. (1993): Microsporidiosis. *Trop Infect Diss*:1126-1140
138. Wells, CD., Arguedas, M. (2004): Amebic liver abscess. *South Med J* 97: 673-682

139. Widmer, G., Akiyoshi, D. (2010): Host-specific segregation of ribosomal nucleotide sequence diversity in the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* Infection. *Genet Evol* 10: 122-128
140. Windsor, JJ. (1997): Microsporidial infection in humans: current practice and developments in laboratory diagnosis. *Br J Biomed Sci* 54: 2216-221
141. Zajíčková, P. (2010): *Oportunní paraziti u pacientů s transplantáty a dalších imunosuprimovaných pacientů*. Bakalářská práce. Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
142. Zima, T. *Laboratorní diagnostika*, Praha: Galén 2002. 728s.
143. Zítek, K. (1998): *Prevence kongenitální toxoplasmózy*. *Čes Gynek* 63: 58-64

8. Klíčová slova

Oportunní paraziti

Mikrosporidie

Alkoholismus