

Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii
ČLS JEP,
sekce lékařské parazitologie
ve spolupráci
se Společností infekčního lékařství ČLS JEP
a
Českou parazitologickou společností

seminář

Oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy

Praha 1.3.2005 Lékařský dům ČLS JEP, Sokolská 31, Praha 2

Seminář sponzoruje firma BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

**Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP,
sekce lékařské parazitologie
ve spolupráci
se Společností infekčního lékařství ČLS JEP
a
Českou parazitologickou společností**

pořádají
společný seminář na téma

**„OPORTUNNÍ A OPOMÍJENÉ
PROTOZOÁRNÍ STŘEVNÍ NÁKAZY“**

dne 1. března 2005 ve 13.30 hodin
ve velké posluchárně Lékařského domu ČLS JEP, Sokolská 31, Praha 2

Program:

1. *prof. RNDr. Jiří Vávra, Dr.Sc., RNDr. Oleg Ditrich, CSc.*
Lidské střevní mikrosporidie
2. *RNDr. Eva Nohýnková, PhD.*
Bičíkovec *Dientamoeba fragilis* – opomíjený patogen lidského střeva
3. *prof. MVDr. Břetislav Koudela, CSc.*
Izosporóza a sarkocystóza v humánní a veterinární praxi
4. *RNDr. Věra Tolarová, CSc.*
Co víme o cyklosporóze
5. *RNDr. Oleg Ditrich, CSc., Ing. Martin Kváč, PhD.,
RNDr. Dana Květoňová*
Kryptosporidióza: rizika pro imunokompetentní a imunodeficitní jedince
6. *Ing. Martin Kváč, PhD., RNDr. Dana Květoňová,
RNDr. Oleg Ditrich, CSc.*
Kryptosporidie a životní prostředí

Koordinátor: RNDr. Věra Tolarová, CSc.
Sponzorem je firma BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Lidské střevní mikrosporidie

Prof. RNDr. Jiří Vávra, DrSc., RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Parazitologický ústav AV ČR, České Budějovice
a Katedra parazitologie Biologické fakulty Jihočeské univerzity, České Budějovice.

Co jsou mikrosporidie?

Mikrosporidie jsou obligátní, vnitrobuněční parazité živočichů, včetně člověka. Lze je považovat za jedny z nejdokonaleji adaptovaných organismů pro vnitrobuněčný parazitizmus, jak o tom svědčí jejich životní cyklus (mimo odolné spory jsou všechna stadia životního cyklu intracelulární), infekční mechanismus (spora funguje jako injektor infekčního zárodku) a vlastnosti molekulárně biologické a biochemické (redukce genomu, přítomnost transporterů umožňujících získávání živin z hostitelské buňky).

Mikrosporidie dnes. Mikrosporidie byly donedávna považovány za samostatný kmen prvoků (Protozoa), dnes víme, že to jsou protisté (= jednobuněčné pravým buněčným jádrem vybavené organismy) odvozené od říše hub (Fungi), nebo houbám blíže příbuzní. Od jakých houbových organismů jsou mikrosporidie odvozeny však není známo.

Lidské mikrosporidie. Mikrosporidií bylo dosud popsáno asi 1200 druhů, řazených do více než stovky morfologicky charakterizovaných druhů. Těžiště jejich výskytu je u hmyzu a korýšů, ale vyskytují se prakticky ve všech živočišných kmenech. Spektrum mikrosporidií parazitujících u člověka je velmi omezené: člověk sdílí část mikrosporidií s ostatními savci (rody *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*), část lidských mikrosporidióz je způsobena mikrosporidii oportunisty z náhodných nákaz, které jsou většinou inaparentní (imunokompetentní jedinci), nebo patentní (imunodeficientní jedinci) (rody *Brachiola*, *Trachipleistophora*, *Pleistophora* aj.).

Lidské střevní mikrosporidie. V lidském střevním traktu se může vyskytnout řada mikrosporidií, jednak těch, které tam pravidelně parazitují, jednak náhodně pocházejících z kontaminované potravy, nebo těch, jež jsou důsledkem systémové infekce mikrosporidii, které se typicky ve střevním traktu nevyskytují. Pravidelnými obyvateli střevního traktu jsou jen 2 mikrosporidie: *Enterocytozoon bienewisi* a *Encephalitozoon intestinalis*.

Enterocytozoon bienewisi (druhové jméno je genitiv od jména Bieneux, obyvatele Haiti, ze kterého byla mikrosporidie poprvé izolována) je parazitem enterocytů duodena, jejunu, vzácně epitelu žlučových cest (a úplně vzácně epitelu dýchacích cest či dalších tkání při systémové infekci). *Enterocytozoon* je mikrosporidie velmi charakteristická a dobře rozeznatelná v biopsiích zpracovaných pro pozorování v elektronovém mikroskopu. Její vývojová stadia jsou typicky umístěna těsně nad jádrem enterocytu. Jsou to nejprve jednojaderné útvary, rychle dospívající v mnohjaderná kulovitá plasmodia, ve kterých se velmi brzy objevuje materiál budoucích organel spory v podobě denzních tubicovitých agregátů. Mnohjaderné plasmodium se nakonec rozpadne na velké množství spor (možná až kolem 60ti), které mají charakteristickou ultrastrukturální stavbu: polové vlákno tvoří 6 závitů umístěných ve dvou paralelních trojicích. Spory jsou velmi drobné (1.6 x 1.0 μm), tenkostěnné. To, že *Enterocytozoon* tvoří budoucí organely spory již během časného vývoje plasmodia, je evidentně dáno selekčním tlakem. Infikované enterocyty jsou totiž rychle vylučovány do střevního obsahu (3-4 dny?). Tam se spory uvolní a ihned injikují zárodky mikrosporidie do dalších buněk střevního epitelu.

Encephalitozoon intestinalis (původně popsán pod rodovým jménem *Septata*) infikuje rovněž enterocyty, ale také makrofágy lamina propria, fibroblasty a buňky endotelu lamina propria. Může diseminovat do řady dalších tkání i mimo zažívací trakt či způsobit infekce systémové. V biotickém materiálu pozorovaném v elektronovém mikroskopu je tato mikrosporidie opět relativně lehce rozeznatelná. Spora je velká asi 2.2 x 1.2 μm, má 5-7 závitů polového vlákna v jedné řadě. Vývojová stadia leží v buňce ve velké vakuole, nedokonale rozdělené nedokonalými fibrilárními septy (viz původní rodové jméno) na nepravidelné komůrky v nichž leží jednotlivá vývojová stadia a spory. Přes schopnost tvořit septa v růstové vakuole, je tato mikrosporidie velmi příbuzná (jak dokazuje molekulární biologie) ostatním dvěma druhům mikrosporidií, které infikují člověka: *Encephalitozoon cuniculi* a *E. hellem*. Ty sice mají jinou typickou tkáňovou specifitu, ale rovněž se mohou objevit ve tkáních (napadají hlavně makrofágy) zažívacího traktu. Odlišení všech třech druhů r. *Encephalitozoon* je možné pouze elektronovou mikroskopií (odliší *E. intestinalis* od *E. cuniculi* a *E. hellem*), nebo molekulárně biologicky či pomocí monoklonálních protilátek.

Způsob infekce.

Nákaza oběma jmenovanými střevními mikrosporidii je kontaminativní. Obě mikrosporidie se mimo lidí vyskytují i v řadě savčích hostitelů. Přítomnost spor ve vodě lze dokázat pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Jsou tedy střevní mikrosporidie působilé *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon intestinalis* zoonosy? Na tuto otázku není možné jednoznačně odpovědět. *E. bieneusi* se vyskytuje v řadě genotypů v širokém hostitelském spektru (člověk, hovězí dobytek, prase, kočka, řada divokých zvířat). Zvláště prasečí genotypy jsou blízké lidským (96-99% podobnost) a tak mezidruhový přenos není vyloučen. Že je možný, dokazuje úspěšný přenos lidského izolátu *Enterocytozoon* na prase. *Encephalitozoon intestinalis* se zatím vyskytuje v jediném genotypu, který mimo člověka byl nalezen u domácích zvířat: oslů, psů, prasat a koz. Je tedy pravděpodobné, že člověk a jeho domácí zvířata si mohou tuto mikrosporidii vyměňovat. Dokládá to případ afrických goril, které jsou v místech, která sdílejí s člověkem *E. intestinalis* nakaženy.

Diagnostika.

Obě mikrosporidie lze v klinickém materiálu (stolice, tkáňové biopsie, post mortem histologický materiál) diagnostikovat řadou metod, jejichž výběr záleží na vybavení laboratoře a zkušenostech personálu. Základem molekulárních metod je amplifikace příslušného úseku DNA pomocí více nebo méně specifických primerů, následovaná většinou restrikční analýzou, umožňující genotypizaci. Restrikční analýza je stále častěji nahrazována sekvenací příslušné části DNA. Citlivost se udává asi 3-100 spor na 0.1g materiálu ze stolice. Transmisní elektronová mikroskopie má samozřejmě menší záchytnost, ale umožňuje nejen přesné určení patogena, ale i určení relativní četnosti výskytu ve tkáňovém vzorku. Třetí metodou výběru je imunodiagnostika, hlavně nepřímá imunofluorescence používající polyklonální rodově specifické, či monoklonální, druhově specifické protilátky (v případě diagnostiky rodu *Encephalitozoon* a potřeby odlišit *E. intestinalis* od *E. cuniculi* a *E. hellem*). Prakticky v každé laboratoři lze pak použít další dvě metody: barvení spor histologickými barvivy a značení spor látkami udělujícími chitinové vrstvě ve sporovém obalu fluorescenci. Obě metody za předpokladu použití zkušeným laboratorním personálem a odečtu preparátu imersním objektivem dávají výsledky jen o málo méně citlivé než metoda PCR. K barvení nátěru ze stolice, či tkáňových roztěrů se v podstatě používají tyto metody: "Weberův modifikovaný Trichrom" a jeho různé modifikace, Gramova metoda (spory mikrosporidií jsou Gram+), Loefflerova alkalická methylenová modř, "Quick-Hot Gram-Chromotrope" a kombinované barvení Trichromem a methylenovou modří. Velmi technicky snadné je fluorescenční označení spor roztokem optického zjasňovače Calcofluor nebo Uvitex (podobný je Fungafluor pro mykologickou diagnostiku). Tyto zjasňovače se vážají na chitin ve sporovém

obalu (ale také na celulosu ve střevním obsahu). Metoda je nenáročná, rychlá a zkušenému diagnostikovi umožní orientační diagnosu během několika minut. Je však bezpodmínečně nutné mít s fluorescenční detekcí zkušenosti, zvláště to platí o diagnostice *Enterocytozoon*, kde spory mají velikost bakterií. Optické zjasňovače umožňují spolehlivé odlišení kvasinek, které nemají v buněčné stěně chitin (ten je pouze v jizvách po pučení).

Patologie.

Obě jmenované střevní mikrosporidie se vyskytují převážně u imunokompromitovaných jedinců. V případě infekce virem HIV je to ve stadiu klinického AIDS, kdy počet CD4+ T lymocytů klesá pod 200 mm³. Výskyt mikrosporidií je obvykle doprovázen dlouhotrvajícím průjmem, ale to nemusí být pravidlem. Současné úspěšné léčení HIV infekcí, které zlepšuje imunologický status nemocných vede k omezení výskytu mikrosporidiových infekcí. Střevní mikrosporidie se ovšem vyskytují i u imunokompetentních lidí, ale zde buď unikají pozornosti, nebo jsou diagnostikovány jako původci přechodného průjmového onemocnění, na př. u navrátilců z oblastí s nízkým hygienickým standardem.

Terapie.

Infekce *Encephalitozoon intestinalis* je možno léčit albendazolem nebo jemu podobnými benzimidazolovými preparáty. Účinným místem zásahu léčiva je molekula beta-tubulinu, která díky specifické konfiguraci (aminokyseliny glutamin v poloze 198 a fenylalanin v poloze 200) je léčivem zasažena. *Enterocytozoon* je na albendazol málo citlivý, i když i tato mikrosporidie je léčivem zasažena, jak dokumentují změny v ultrastruktuře. Perspektivním lékem enterocytozoonosy je fumagilin (antibiotikum z *Aspergillus fumigatus*, používané včelaři pro léčbu včelí nosematosy), který je však relativně toxický. Proto se zkoušejí jeho deriváty. Slibným léčivem je dle literárních údajů nitazoxanid.

Kdy je na místě vyšetřovat materiál na střevní mikrosporidie? Pravděpodobnost mikrosporidiové infekce je samozřejmě větší u imunodeficitních pacientů, a to nejen HIV pozitivních. Nezapomínejme na příjemce transplantátů, pacienty s vyoperovanou slezinou, pacienty po chemoterapii, těžké alkoholiky apod. U těchto pacientů bychom k vyšetření na střevní mikrosporidie měli přistoupit při dlouhotrvajících nekrvavých vodnatých průjmech, které mohou být spojeny s výrazným úbytkem váhy popřípadě úplnou kachektizací. U imunokompetentních pacientů je sice pravděpodobnost pozitivního nálezu mnohem nižší, ale přesto by měli být na mikrosporidie vyšetřeni při vodnatých průjmech, při kterých nebyl laboratorně potvrzen jiný původce (enteropatogenní bakterie, virus, prvok) nebo při kterých selhává obvyklá terapie, např. antibiotiky.

Jaký materiál vyšetřovat? Pro diagnostiku střevních mikrosporidií je pochopitelně základním materiálem pro vyšetření stolice. Při podezření na disseminovanou infekci je rozumné přidat močový sediment, sputum apod.

Jak vzorek uchovat? Odpověď na tuto otázku není jednoduchá, záleží na možnostech a vybavení laboratoře, na možnostech zaslat vzorek do specializované laboratoře či na perspektivě dalšího využití vzorku. V každém případě je dobré počítat s tím, že by výsledek mohl být velmi zajímavý a pro jistotu ponechat více materiálu uchovaného různými způsoby.

1. **Nefixovaný vzorek uchovaný v lednici:** Spory mikrosporidií jsou velmi odolné a i ve vzorku stolice vydrží živé po dlouhou dobu. Takto uschovaný vzorek lze použít k pokusu izolovat původce v buněčné kultuře, zhotovit z něj nátěry nebo případně fixovat později kteroukoliv metodou. Skladování nefixovaného vzorku má samozřejmě své limity, pozdější nález mikrosporidiových spor velmi ztíží zejména pomnožení houbových organismů (kvasinky, „plísň“). Proto je velmi žádoucí omezit dobu skladování či transportu nefixovaného vzorku na minimum popřípadě přidat směs antibiotik/antimykotik (např. SIGMA) v koncentraci podle příbalového letáčku.

2. **Koncentrace mikrosporidií v nefixovaném vzorku pomocí sedimentace:** Jde o alternativu předchozího způsobu, která zmenšuje výsledný objem při případném zasílání vzorku a šetří antibiotika/antimykotika, pokud je míníme přidat. Jde o modifikaci mertiolát-formaldehydové koncentrační metody (M.I.F.C., viz dále), při které je základní roztok i Lugolův roztok nahrazen vodou .
3. **Fixace etanolem:** Nejvhodnější fixace pro izolaci DNA, následnou amplifikaci částí genů a jejich sekvenování. Spočívá ve smísení vzorku s alkoholem tak, aby výsledná koncentrace byla blízká 70-80%.
4. **Fixace formaldehydem:** Takřka univerzální fixace vhodná pro pozdější barvení nebo pro následnou koncentraci spor pro vyšetření pomocí elektronového mikroskopu. Izolace DNA z takto fixovaných vzorků je krajně obtížná a kultivace původce nemožná. Fixace spočívá ve smísení vzorku s roztokem formaldehydu („formalín“) tak, aby výsledná koncentrace byla 4%. S výhodou lze formalín zaměnit za zásobní roztok M.I.F.C.

Doporučený postup při vlastním vyšetřování: Jako screening doporučujeme použít vyšetření barvením optickými zjasňovači, pomocí kterého můžeme vyloučit negativní vzorky. Velmi výhodné je použít pozitivní kontrolu (např. uschované spory *Encephalitozoon* sp. z kultury nebo starší pozitivní vzorek) pro srovnání velikosti i odstínu fluorescence. Spory *E. bieneusi* jsou snadno přehlednutelné, je dobré si uvědomit, že jsou ještě menší než *Encephalitozoon* spp.

Vzorky, u nichž screeningové vyšetření posílilo podezření na mikrosporidie je vhodné vyšetřit buď pomocí přímé imunofluorescence nebo pomocí kombinace alespoň dvou barvicích metod (např. Weberovo a Gramovo barvení). Monoklonální i polyklonální protilátky s různým stupněm specificity si dosud diagnostické laboratoře připravují samy; brzy by měly být dostupné komerčně.

Je-li přítomnost mikrosporidií prokázána, zbývá determinovat druh původce. Umožní to především transmisní elektronová mikroskopie. U vzorků ze stolice se osvědčila fixace koncentrovaného sedimentu oxidem osmičelým a následné smísení s tuhoucím agarem. S malými kousky agaru se pak při zpracování zachází stejně, jako když jde o kousky tkáně. Spory koncentrované sedimentací se dosud používají i pro izolaci DNA a determinaci pomocí molekulárních metod. Ty se velmi rychle zdokonalují a v dohledné době umožní snadnou a rychlou přímou diagnostiku mikrosporidií ve stolici, s vynecháním předchozích kroků.

Návody a pracovní postupy:

Koncentrace nativních spór sedimentací:

Přibližně 1 ml stolice zředit v 6 ml vody, slít přes gázu (odstranění hrubších částic, přidat 6 ml dietyléteru, zazátkovat, důkladně protřepat a centrifugovat 2 min při 1 500 otáčkách za minutu. Uvolnit prstencem na rozhraní éter – voda a supernatant slít. Sediment možno použít ke kultivaci, k izolaci DNA nebo po nafixování na sklíčko k barvení.

Koncentrace fixovaných spor sedimentací (= zjednodušená metoda M.I.F.C.):

Totéž jako předchozí, místo vody použít 5 ml zásobního roztoku M.I.F. a 1 ml Lugolova roztoku.

Zásobní roztok M.I.F.:

500 ml vody, 50 ml formalínu (= 40% roztok formaldehydu), 400 ml 0.1% roztoku mertiolátu sodného (=0.4 g/ 400 ml 96% ethanolu), 10 ml glycerolu

Lugolův roztok: 1g krystalického jódu, 2 g jodidu draselného (KJ), 100 ml vody

Barvení optickými zjasňovači:

Tenký nátěr stolice fixovat methanolem (2 min. – do zaschnutí). Převrstvit 0.1% roztokem projasňovače (Calcofluor, Uvitex, Fungafluor) a 0.1% roztokem Evansovy modře. Po 10 min. opláchnout a prohlížet fluorescenčním mikroskopem (excitační filtr 400 – 500 nm, bariérový filtr 510 – 530 nm). Spory (ale i jiný materiál obsahující chitin či celulosu!) září jasně modrobíle.

Barvení Weberovým modifikovaným trichromem:

Tenký nátěr stolice fixovat 5 min. v methanolu. Barvit 90 min v roztoku chromotropu. Krátce opláchnout v kyselém alkoholu, v 96% alkoholu a odvodnit. Lze prohlížet přímo i montovat do trvalého preparátu.. Spory mikrosporidií zbarveny jasně červeně.

Modifikovaný roztok chromotropu:

6 g Chromotrope 2R, 0.15 g Fast green, 0.7 g kyselina fosfowolframová. Reagencie rozmíchat v 3 ml ledové kyseliny octové a po 30 min. zředit 100 ml destilované vody.

Dientamoeba fragilis – opomíjený patogen lidského střeva

RNDr. Eva Nohýnková, PhD.

Oddělení tropické medicíny FN Na Bulovce a I.LF UK v Praze

Dientamoeba fragilis je patogenní trichomonáda, která osidluje lumen tlustého střeva člověka. O patogenitě tohoto neobvyklého bičíkovce existuje dostatek důkazů zejména v souvislosti s opakovanými případy vymizení klinických obtíží u pacientů po odléčení infekce *D. fragilis* jako jediného možného původce (Johnson et al 2004). I přesto někteří autoři při výčtu parazitů gastrointestinálního traktu stále dientaméby opomíjejí a v řadě zemí není tento patogen vůbec zahrnován do diferenciálně diagnostické rozvahy při chronických průjmech.

Cílem tohoto příspěvku je proto shrnout dostupné informace o biologii parazita *Dientamoeba fragilis* a o klinice, diagnostice a epidemiologii jím působených nálezů, a tím znovu upozornit na patogenitu tohoto organismu a povzbudit tak zájem o něj jak ze strany kliniků, tak ze strany diagnostikujících laboratoří

Organismus. *Dientamoeba fragilis*, kterou v roce 1918 popsali Jeppsová a Dobell ze stolice šesti britských válečných veteránů a jednoho zdravého britského civilisty, byla původně zařazena mezi střevní améby. Až podrobné srovnávací morfologické studie dientaméb pěstovaných *in vitro* naznačily jejich příbuznost k trichomonádám, jmenovitě k *Histomonas meleagridis*, střevnímu parazitu drůbeže patogennímu pro krůty (Dobell 1940). Dobell odhalil zejména přítomnost centrodesmózy, fibrily spojující jádra v buňce dvojjaderných dientaméb, později identifikované jako extranukleární mitotické vřeténko charakteristické pro trichomonády. Příbuznost dientaméb k trichomonádám poté prokázalo studium ultrastruktury (Camp et al 1974) a nakonec potvrdily molekulárně fylogenetické studie založené na kompletní sekvenci genu pro malou podjednotku rRNA (Silberman et al 1996). Dientaméby lze proto považovat za trichomonády neobvyklé tím, že nemají bičíky.

Neobvyklost dientaméb však spočívá i v tom, že ačkoliv jsou – jako jiní střevní prvoci – vylučovány se stolicí do vnějšího prostředí, netvoří odolná stádia – cysty. Jediným vývojovým stádiem dientaméb jsou málo odolné trofozoity, které na vzduchu rychle hynou. Je proto nasnadě, že způsob přenosu dientaméb se musí od ostatních střevních prvoků člověka lišit.

Kulovité trofozoity zpravidla měří 7–12 μm , jejich velikost však může být velmi variabilní (3,5–22 μm). Jsou buď jednojaderné, převažují ale (60–80%) dvojjaderné formy, které jsou výsledkem protražované mitózy (telofáze). Jádra jsou kulatá a obsahují několik (obvykle 4–8) centrálně uložených chromatinových granul, z nichž jedno bývá větší než ostatní, periferní chromatin chybí. Buňka dientaméb má velmi redukovanou stavbu, z níž však je jasně patrná příbuznost k trichomonádám (parabasální aparát, extranukleární mitotické vřeténko, microbodies obdané dvěma membránami odpovídající hydrogenosomům), chybí však mikrotubulární skeletální struktury (axostyl, pelta), kinetosomy či jiný typ centriol. Organizační centra mikrotubulů mitotického vřeténka jsou napojena na parabasální fibrily. Cytoplasma obsahuje glykogenová zrna a množství sekundárních lysosómů. Mitochondrie rovněž chybí.

Klinický obraz.

Symptomatické nákazy *D.fragilis* se vyskytují u dětí i u dospělých. Hlavními příznaky jsou intermitentní průjem a bolest břicha, často spojené s nevolností, zvracením, plynatostí a schváceností. Průjem může být vodnatý až řídký, bez příměsí krve. Nákaza má obvykle chronický průběh, akutní forma (popisovaná jako akutní průjem, eosinofilní kolitida nebo akutní apendicitida) je mnohem vzácnější. Chronická nákaza bývá doprovázena periferní eosinofilií, která je výrazně častější u dětí než u dospělých. Při symptomatických nálezích dětí se pohybuje mezi 30–50 %. Její příčina objasněná není. *D.fragilis* vyvolává průjmy rovněž u pacientů s AIDS, u kterých je nákaza spojována i s dalšími klinickými projevy (pruritus, kolitida, alergická kolitida). Ačkoliv prevalence nákazy u HIV pozitivních osob je ve srovnání s HIV negativními vyšší, průběh nákazy u imunodeficitních pacientů se nezdá být těžší.

Patologie.

Informace o patologických projevech nákazy jsou poměrně vzácné a často i protichůdné. Opírají se o histopatologické nálezy v odoperovaných apendixech a o výsledky sigmoidoskopie u pacientů s prokázanou nákazou. Protichůdné jsou zejména nálezy v apendixech. Zatímco ve starších studiích jsou popisovány změny ve stěně apendixu včetně fibrózy v pojivové tkáni submukózy, které jsou spojovány s iritací stěny a zánětovými změnami při chronické přítomnosti dientaméb v lumen, v rozsáhlé studii z České republiky Červa et al (1991) žádné histopatologické změny v apendixech za přítomnosti dientaméb nezaznamenali. Naopak zánětové změny na sliznici rekta a sigmoidea jsou u pacientů infikovaných dientamébami popisovány relativně často, obvykle s obrazem mírné chronické proktitidy (Oeckert 1990).

Diagnostika.

Nákaza *D.fragilis* by měla být diferenciatně diagnosticky zvažována u všech pacientů trpících chronickou bolestí břicha, průjmy, plynatostí, nadýmáním a neobjasněnou periferní eosinofilií. Především způsob odběru materiálu a jeho doprava do laboratoře ale v řadě případů záchyt dientaméb předem vylučují.

Laboratorní diagnostika.

Mikroskopický a kultivační průkaz. Detekce *Dientamoeba fragilis* zcela závisí na odběru materiálu, na použité vyšetřovací metodě a na počtu vyšetřovaných stolic.

Dientaméby jsou velmi citlivé na pokles teploty (a díky předpokládanému anaerobnímu metabolismu pravděpodobně také na vzdušný kyslík): při pokojové teplotě rychle ztrácejí životaschopnost, odumírají, a tím se pravděpodobnost jejich záchytu rychle snižuje. Stolice pro průkaz dientaméb proto musí být vyšetřena čerstvá co nejrychleji po defekaci (ideální je dnes již neprováděný odběr rektální rourkou), v žádném případě nesmí být uložena do lednice.

V čerstvé stolici lze dientaméby prokázat mikroskopicky (a) v nativním preparátu a (b) na vlhkém fixovaném roztěru barveném Heidenheinovým železitým hematoxylinem nebo trichromem (Gömöri), a kultivačně. Naopak pro záchyt jsou zcela nevhodné běžně užívané koncentrační metody (Faust): dientaméby tvořící cysty jsou v roztocích používaných ke koncentraci okamžitě destruovány. V **nativním preparátu** lze jemné, často vakuolizované kulovité trofozoity dientaméb identifikovat pomocí tupých až hranatých nepravidelně vytvářených panožek. Jádra se nebarví Lugolovým roztokem. Na **trvalých barvených preparátech** je vodítkem morfologie jádra a přítomnost dvojjaderných buněk, jejichž jádra mohou být navzájem propojena tenkou fibrilou (extranukleární mitotické vřeténko,

centrodesmóza) barvitelnou jak hematoxylinem, tak trichromem. Přítomnost spojovací „fibrily“ je jednoznačným průkazem *D.fragilis*. **Kultivace** je nejcitlivější metodou záchytu (Windsor et al 2003) a měla by být rutinní součástí koprologického vyšetření při chronickém průjmu. Záchyt *in vitro* je podmíněn životaschopností dientaméb. Je proto vhodné čerstvou stolicí před inokulací do media nejprve inkubovat 10–20 minut při 37 °C. K izolaci lze použít dvoufázové medium podle Dobell a Laidlaw nebo komplexnější Robinsonovo medium (Clark a Diamond 2002), vždy obohacené sterilní suspenzí rýžového škrobu.

Záchyt dientaméb se výrazně zvyšuje s počtem vyšetřených vzorků. Při vyšetření jednoho vzorku se pohybuje mezi 18–54 %, při vyšetření tří vzorků se zvýší až o 30 % (Hiatt)

PCR. Recentně byly publikovány dvě práce, zaměřené na PCR diagnostiku nákazy. Pro přímý průkaz DNA *D.fragilis* ze stolice metodou jednokrokové PCR byly navrženy primery DF1 (5'CTC ATA ATC TAC TTG GAA CCA ATT3') a DF4 (5'TTA TAG TTT CTC TTA TTA GCC CC3') (Peek et al 2004) resp. DF400 (5'TAT CGC AGG TGG TAA TGA CC3') a DF1250 (5'CAT CTT CCT CCT GCT TAG ACG3') (Stark et al 2005), které amplifikují oblast 400–1250 resp. 100–761 SSU rDNA *D.fragilis*. Jako výchozí materiál pro extrakci DNA autoři doporučují nefixovanou stolicí uchovávanou buď zmraženou (–20 °C, 1 týden) nebo maximálně 48 hodin při 4 °C. Ze stolice skladované delší dobu nebo fixované (SAF) se specifickou DNA prokázat nezdařilo.

Epidemiologie.

Nákazy *D.fragilis* jsou rozšířeny celosvětově s výrazně vyšší prevalencí u dětí než u dospělých a u žen než u mužů. Díky malé znalosti parazita a chybně prováděné laboratorní diagnostice ale počty nakažených osob zdaleka neodpovídají skutečné prevalenci. Podle některých studií jsou počty osob infikovaných dientamébami srovnatelné s nákazou giardiemi nebo dokonce vyšší. Víceleté studie zaměřené na detekci střevních parazitů udávají 4–30 %. U dětí (6–9 let) je vyšší výskyt spojen se špatnou osobní hygienou při větším nahloučení dětí, u dospělých je častější výskyt v hromadných zařízeních zvl. pro mentálně postižené nebo v uzavřených semikomunálních skupinách. Je zajímavé, že nákazy střevními prvky, kteří tvoří cysty, se u dětí koncentrují v jiných věkových skupinách (3–5 let). Rovněž jsou vzácné ko-infekce dientaméb s jinými střevními prvky, což obojí může svědčit o specifických faktorech přenosu *D.fragilis*.

Přenos.

Není pochyb o tom, že k přenosu dientaméb dochází alimentární cestou, a to fekálně-orálním způsobem. Přesto není mechanismus přenosu zcela objasněn. Poměrně častý výskyt nákazy je v příkrém kontrastu k absenci tvorby odolných cyst. Trofozoity dientaméb navíc nevydrží životaschopné ani několik hodin ve stolici uchovávané při pokojové teplotě, okamžitě hynou ve vodě, hynou v roztocích simulujících žaludeční šťávu a pokusy nakazit lidské dobrovolníky a primáty trofozoity z *in vitro* kultur podávanými per os skončily nezdarem. Tudíž přenos dientaméb vodou či potravou kontaminovanou lidskými výkaly nebo přímý fekálně orální přenos je víc než nepravděpodobný.

Analogicky k přenosu blízkého příbuzného patogena *Histomonas meleagridis* navrhl Dobell již v roce 1940, že by i k přenosu dientaméb mohla sloužit vajíčka nějakého helminta-vektora. Tím hypotetickým vektorem se na základě řady nepřímých důkazů stal roup dětský *Enterobius vermicularis* a jeho vajíčka. I když jednoznačný přímý důkaz stále chybí, jde, jak vyplývá z řady nepřímých důkazů, o vysoce pravděpodobný způsob přenosu: prostřednictvím vajíček roupů vyloučených osobou s prokázanou infekcí *D.fragilis* se dientamébami nakazil lidský dobrovolník, ve vajíčkách roupů byly ameboidní trofozoity připomínající dientaméby prokázány, histologicky byla prokázána statisticky významná ko-infekce appendixu roupou a dientamébami.

Literatura

1. Camp RR, Mattern CFT, Honigberg BM (1974). A study of *Dientamoeba fragilis* Jepps and Dobell. I. Electronmicroscopic observations of binucleate stages. II. Taxonomic position and revision of the genus. *J Protozool* 21: 69-82
2. Clark CG, Diamond LS (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 15: 329-341
3. Červa L, Schrottenbaum M, Kliment V (1991). Intestinal parasites: A study of human appendices. *Folia Parasitol* 38: 5-9
4. Dobell C (1940). Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. X. The life-history of *Dientamoeba fragilis*: Observations, experiments, and speculations. *Parasitology* 32: 417-461
5. Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG (2004). Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin Microbiol Rev* 17: 553-570
6. Oeckert G (1990). Symptomatology, pathology, epidemiology, and diagnosis of *Dientamoeba fragilis*, p.394-410. In BM Honigberg (ed). *Trichomonads parasitic in humans*. Springer Publ..
7. Peek R, Reederker FR, Van Gooll T (2004). Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. *J Clin Microbiol* 42: 631-635
8. Silberman JD, Clark CG, Sogin ML (1996). *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads. *Mol Biochem Parasitol* 76: 311-314
9. Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J (2005). Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *Int J Parasitol* 35: 57-62
10. Windsor JJJ, MacFarlane L, Hughes-Thapa G. et al. (2003). Detection of *Dientamoeba fragilis* by culture. *Br J Biomed Sci* 60: 79-83

Izosporóza a sarkocystóza v humánní a veterinární praxi

Prof. MVDr. Břetislav Koudela, CSc.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Parazitologický ústav AV ČR, České Budějovice

Izosporóza

Izosporóza je parazitární onemocnění, jehož původcem jsou kokcidie rodu *Isospora*. Kokcidie patří do kmene Apicomplexa, jehož zástupci jsou vesměs vnitrobuněční parazité. Jejich stádia jsou vybavena tzv. apikálním komplexem, který jim umožňuje průnik do hostitelské buňky. Kokcidie jsou veterinárně významní parazité řady hostitelů a patří mezi ně především zástupci rodu *Eimeria* (původci kokcidiózy drůbeže, králíků a přežvýkavců); mezi kokcidie patří také kryptosporidie (původci průjmových onemocnění zvířat i člověka) a původce toxoplazmózy vícehostitelská kokcidie *Toxoplasma gondii*.

Pro kokcidie je typický vývoj zahrnující fázi nepohlavního množení (merogonii), po které následuje pohlavní fáze vývoje (gametogonie), jejíž výsledkem jsou oocysty, které opouštějí hostitele. Ve vnějším prostředí prodělávají oocysty další vývoj, tzv. sporulaci, po které jsou infekční pro nového hostitele. Morfologie vysporulovaných oocyst je základním kritériem zařazení kokcidií do rodu. Rod *Isospora* je charakterizován dvěma sporocystami v oocystě a v každé sporocystě jsou přítomni čtyři sporozoiti. U zástupců rodu *Isospora*, u kterých jsou sporocysty vybaveny „zátkou“ (tzv. Stiedovým tělískem), probíhá celý vývoj v jednom specifickém hostiteli. U izospor, u kterých jsou sporocysty bez „zátky“ se předpokládá, že vedle vývoje ve specifickém hostiteli, může vývoj zahrnovat i paratenického hostitele. Vývoj izospor v paratenickém hostiteli neprobíhá a vývojová stádia v podobě sporozoitů v paratenickém hostiteli pouze přežívají. Pokud specifický hostitel pozře paratenického hostitele, vývoj izospor probíhá obdobně jako pozření infekčních oocyst. Někteří autoři doporučují pro druhy, které využívají paratenické hostitele, rodové označení *Cystoisospora* nebo *Levinia*.

V současnosti je popsáno kolem 400 druhů rodu *Isospora*, přičemž většina z nich byla popsána pouze na základě morfologie oocyst bez znalosti vývojového cyklu. Klinická onemocnění způsobená izosporami byla popsána u člověka a sajících selat. Vzácněji jsou popisovány klinické izosporózy masažravců.

Kokcidie rodu *Isospora* u lidí

U člověka byly popsány tři druhy izospor: *I. natalensis*, *I. chilensis* a *I. belli*, přičemž pouze poslední jmenovaná je považována za validní. Rozšíření druhu *I. belli* je celosvětové, ale její výskyt je více popisován v subtropických a tropických oblastech a jako země s nejvyšší prevalencí humánní izosporózy jsou uváděny Mexiko, Brazílie, Haiti, země rovníkové Afriky, Střední Východ a země jihovýchodní Asie. V evropských zemích jsou ojediněle popisovány autochtonní izosporózy a většina případů jsou importované infekce. Potvrzují to také výsledky sledování humánní izosporózy v České republice. Za posledních 10 let byly u nás popisovány 1 až 3 případy izosporózy ročně a vždy se jednalo o importované infekce.

Kokcidie *I. belli* způsobuje u imunokompetentních pacientů závažné onemocnění, které může mít až fatální průběh. Izosporóza probíhá jako průjmové horečnaté onemocnění spojené

s dehydrací a úbytkem hmotnosti. Izosporóza může mít také chronický průběh s proměnlivými klinickými příznaky a oocysty se mohou vyskytovat ve stolici po dobu měsíců až roků. V literatuře je popsán případ vylučování oocyst *I. belli* po dobu 10 let. Experimentální infekce dobrovolníků potvrdila klinický průběh izosporózy u spontánně infikovaných. Průjem a horečky se objevily u dospělých dobrovolníků 8. den po pozření oocyst a první oocysty byly detekovány ve stolici dobrovolníků za 10 dní a vylučování oocyst bylo pozorováno v průměru po dobu 38 dní. Klinický průběh izosporózy je závažnější u dětských pacientů.

Prevalence izosporózy u imunodeficitních pacientů je vyšší a *I. belli* je zahrnována mezi původce oportunních onemocnění. Počátkem 90. let minulého století byla prevalence izosporózy u AIDS pacientů v rozmezí 1 až 9 %, v současnosti je nižší v důsledku cílené chemoprolaxe (trimethoprim-sulfamethoxazol). Diagnostika izosporózy je založena na průkazu typických oocyst ve stolici klasickými koprologickými flotačními metodami. Vyšší citlivost je uváděna při vyšetřování nátěrů stolice metodami IFAT, při využití autofluorescence oocyst v UV světle a při využití molekulárních metod.

Izosporóza sajících selat

Kokcidie *Isoospora suis* je v současnosti považována za závažného enteropatogena pro sající selata. Způsobuje průjemové onemocnění sajících selat ve stáří 2 až 3 týdnů. Izosporóza sajících selat je onemocnění s vysokou morbiditou především v chovech moderní technologií. Moderní technologie s velkým počtem vnímavých zvířat na omezeném prostoru umožňuje snadné šíření onemocnění a v některých chovech se průjemové onemocnění způsobené kokcií *I. suis* vyskytuje u všech selat do odstavu. Mortalita izosporózy je nízká, ale ekonomická závažnost izosporózy sajících selat je vysoká. Na základě experimentálních infekcí bylo zjištěno, že hmotnost selat ve stáří 4 týdnů (tj. v období odstavu) je o 1,2 kg nižší než u selat neinfikovaných. Diagnostika izosporózy selat je založena na posouzení charakteru průjemového onemocnění, průkazu oocyst *I. suis* v trusu selat a na patologickém nálezu. Izosporóza sajících selat je onemocnění, kterému lze předcházet důkladnou asanací prostředí chovů prasat a individuální aplikací antikokcidik selatům v průběhu prvního týdne stáří.

Sarkocystóza

Kokcidie rodu *Sarcocystis* jsou vícehostitelští protozoární parazité, jejichž vývoj zahrnuje definitivního hostitele a mezihostitele. V definitivním hostiteli probíhá vývoj ve střevě a v mezihostiteli jsou vývojová stádia lokalizována ve formě cyst ve svalové tkáni = sarkocysty. Definitivní hostitel (masožravec, všežravec) se nakazí pozřením svaloviny se sarkocystami. Sarkocysty byly poprvé pozorovány Miescherem v roce 1843 ve svalovině myši. V roce 1865 byly popsány podobné útvary ve svalovině prasete jako „Miescherovy váčky“, které byly později označeny druhovým názvem *Sarcocystis miescheriana*. Následovaly popisy obdobných útvarů ve svalovině jiných hostitelů, ale stále nebylo jasné taxonomické zařazení sarkocyst a jejich biologie. Teprve v 70. letech minulého století byl objasněn vývojový cyklus sarkocyst a do současnosti bylo popsáno několik stovek druhů sarkocyst, přičemž u většiny z nich je také znám kompletní vývojový cyklus. Sarkocysty jsou hostitelsky specifické parazité, a proto bylo navrženo názvosloví, při kterém by druhové jméno sarkocyst ukazovalo na mezihostitele a definitivního hostitele. Tak například název *S. bovicanis* byl navrhován pro druh, jehož svalové cysty se nacházejí ve svalovině skotu a jsou infekční pro psa. Tento koncept se neosvědčil, protože časem byly popsány rozdílné druhy se stejnými definitivními hostiteli a mezihostiteli a užitečnost takto navrhovaného názvosloví se stala relativní. Některé druhy sarkocyst mají velký význam ve veterinární praxi. Jako příklad závažného onemocnění způsobeného sarkocystami lze uvést problematiku nervového onemocnění koní způsobené druhem *S. neurona*.

Kokcidie rodu *Sarcocystis* u lidí

Sarkocystózu lidí lze posuzovat ze dvou pohledů. V prvním případě je člověk definitivním hostitelem a probíhá u něho střevní onemocnění po konzumaci tepelně neopracovaného masa. Svalová sarkocystóza lidí je vzácným onemocněním a dlouho se předpokládalo, že svalová sarkocystóza lidí je způsobena pouze druhem *S. lindemanni*. Podrobné studium svalových cyst prokázalo, že se jedná o více druhů sarkocyst, avšak vývojové cykly druhů, pro které je člověk v roli meziphostitele, nejsou doposud objasněny.

Je pouze několik studií, které se zaměřily na sledování prevalence střevní sarkocystózy lidí. Výsledky těchto studií však prokázaly, že v Evropě je prevalence střevní sarkocystózy vyšší než na jiných kontinentech. V České republice je střevní sarkocystóza každoročně diagnostikována v jednotlivých případech a zpravidla se jedná o importované infekce. Ze studií je zřejmé, že zásadní vliv na prevalenci mají stravovací zvyklosti vyšetřovaných lidí. Ve studii provedené koncem 80. let minulého století na Slovensku mezi vietnamskými pracovníky byla zjištěna celkem 14 případů (1,1% prevalence) a byla prokázána souvislost s konzumací syrového masa. Nejvíce poznatků o klinickém průběhu střevní sarkocystózy pochází z německé studie, při které dobrovolníci konzumovali syrové vepřové maso se sarkocystami druhu *S. suihominis*. Klinické symptomy v podobě bolestí břicha, zvracení, ztíženého dýchání a průjmu se objevily do 48 hodin po pozření masa se sarkocystami. Tyto příznaky odezněly po 2 dnech a za 5 až 12 dní začalo vylučování sporocyst ve stolici dobrovolníků. Specifická terapie na střevní sarkocystózu není stanovena, neboť ve většině případů dojde k samovyléčení.

Případy svalové sarkocystózy jsou velmi vzácné a většina případů pochází ze subtropických a tropických oblastí. V odborné literatuře je popsáno celkem 46 případů svalové sarkocystózy na základě histopatologického vyšetření. Nejvíce informací o svalové sarkocystóze pochází z popisu malé epidemie akutní svalové sarkocystózy u 7 amerických vojáků v Malajsii. Onemocnění se projevovalo horečkou, svalovými bolestmi, pruritem a tvorbou podkožních nodulů. Dále byla zjištěna eosinofilie, zvýšená sedimentace a vysoké aktivity CPK a LDH. Sarkocysty byly prokázány histologickým vyšetřením biopsie lopatkových svalů.

Izosporóza a sarkocystóza jsou v podmínkách střední Evropy velmi vzácnými parazitózami. Vzhledem ke globalizaci a hojnému cestování do oblastí s vyšší výskytem těchto parazitů je třeba zahrnout tyto parazitózy mezi sledované importované infekce.

Co víme o cyklosporóze

RNDr. Věra Tolarová, CSc.

parazitologické oddělení Zdravotního Ústavu se sídlem v Praze
NRL pro diagnostiku střevních parazitóz

Historie.

V osmdesátých a devadesátých letech minulého století se v odborném tisku začaly objevovat články, popisující ve stolici osob trpících vleklými průjmy zvláštní kulovité útvary, které autoři popisovali jako „cyanobacterium-like“, „coccidium-like“ nebo „cryptosporidium-like“ tělíska. Ashford v roce 1979 pozoroval tyto organizmy u tří pacientů z oblasti Papua Nová Guinea a nazval je „Isospora-like coccidia“. Podobné nálezy byly zaznamenány i u pacientů z Nepálu, Mexika, Peru či Haiti. Detailní morfologický popis, taxonomické zařazení mezi Apicomplexa a název druhu *Cyclospora cayetanensis* však přinesly až práce Ortegy z let 1992–1994, které byly prováděny na univerzitě v Limě, nesoucí jméno peruánského profesora Cayetano Heredia, po němž *Cyclospora* dostala své druhové jméno. Molekulárně biologickými metodami, prováděnými od roku 1996, byla potvrzena těsná příbuznost druhu *Cyclospora cayetanensis* s kokciidii rodu *Eimeria*.

Cyklosporóza je onemocnění člověka, způsobené prvokem *Cyclospora cayetanensis* a člověk je jediným hostitelem tohoto druhu. Podobný organizmus však byl pozorován již v roce 1870 Eimerem ve střevě krtků a rod *Cyclospora* byl popsán roku 1881 Schneiderem. V roce 1902 pak Schaudinn studoval vývojový cyklus *Cyclospora caryolytica* ve střevním epitelu krtka. Cyklospory byly nalezeny i u opic. V roce 1993 u šimpanzů, v roce 1996 u paviánů v Tanzánii a v roce 1999 byly izolovány tři nové druhy z opic v Etiopii. Charakterizace jejich genomů ukazuje na vzájemně velmi těsnou příbuznost i na blízkou příbuzenskou vazbu s *Cyclospora cayetanensis*. V současnosti je známo sedmáct druhů tohoto rodu převážně u hmyzožravců, hlodavců, plazů i primátů.

Vývojový cyklus. Člověk se nakazí potravou, nejčastěji zeleninou, nebo ovocem, méně často přímo vodou, kontaminovanou oocystami cyklospor. Oocysty jsou kulovité, 8–10 µm velké útvary, kryté na povrchu 63 nm silným vnějším fibrilárním obalem, pod nímž je buněčná stěna o tloušťce 50 nm. Vnitřek oocysty je vyplněn granulemi, které jsou jen málo světlolomné, což ztěžuje mikroskopickou diagnostiku. K tomu, aby se staly pro člověka infekčními, musejí oocysty prodělat určitou část vývoje (sporulace) ve volném prostředí. Vysporulované oocysty obsahují dvě sporocysty, uvnitř každé z nich jsou dva rohličkovité sporozoity. Pokud se oocysta dostane do zažívacího traktu vhodného hostitele, pohyblivé sporozoity se v tenkém střevě uvolní a napadají enterocyty v apikální části mikroklků jejunu. Uvnitř parazitoformní vakuoly, uložené v supranukleární části buňky, se uskuteční první fáze nepohlavního dělení, při kterém se z merontů uvolňuje 8–12 merozoitů, které napadají další buňky střevního epitelu. Ve druhé fázi nepohlavního dělení vznikají 4 merozoity. V následné sexuální části vývoje cyklospor dochází postupně ke tvorbě mikro- a makrogamet. Po oplodnění je vývojový cyklus dokončen tvorbou tlustostěnných kulovitých oocyst, které vycházejí z těla hostitele se střevním obsahem. Mohou dosahovat koncentrace 10^2 – 10^4 oocyst/g stolice, většinou jich však bývá méně.

Biologie

Oocysty jsou klidová stádia, určená k přečkání nepříznivých vnějších podmínek. Z těla vycházejí jako nevysporulované, tedy neinfekční útvary. Podmínky, za kterých oocysty cyklospor v přírodě dozrávají a sporulují, nejsou dosud dobře známy. Usuzuje se však, že životaschopnost a odolnost oocyst vůči vnějším podmínkám i vůči působení dezinfekčních roztoků a herbicidů je, stejně jako u kryptosporidií, vysoká. Běžně užívané koncentrace těchto prostředků neovlivňují průběh sporulace a oocysty jsou schopny po omezenou dobu přežívat i při teplotě $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Předpokládá se, že k tomu, aby se oocysty staly infekčními v prostředí zvýšené koncentrace atmosférického kyslíku, je zapotřebí několika dnů, týdnů až měsíců. V některých pokusech trvala sporulace při teplotě $22\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ celkem 8–14 dnů, ale při nízké teplotě kolem $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ se doba sporulace prodloužila až na 4–6 měsíců. In vitro lze sporulaci vyvolat uchováváním oocyst ve 2,5 % roztoku dvojjodnanu draselného po dobu několika dnů. Tímto způsobem lze dosáhnout sporulace u 20–80 % oocyst. Ruptura stěny zralé oocysty a uvolnění sporozoitů se pak vyvolá mechanickým tlakem a působením trávicích enzymů.

Možnosti studia cyklospor, zejména ověřování životaschopnosti a infekitivity oocyst jsou velmi omezeny tím, že se dosud nedaří přenést nákazu na experimentální zvířata, ani kultivovat a pěstovat cyklospory na tkáňových kulturách. O infektivitě oocyst a o podmínkách, za kterých si, během sporulace jak v přírodě, tak v in vitro pokusech, oocysty dokáží udržet svou schopnost usídlit se a vyvolat onemocnění u nového hostitele, se proto zatím mnoho neví. Oocystami *Cyclospora cayetanensis* se nepodařilo nakazit opice, které jinak hostí vlastní druhy cyklospor, lidským však geneticky velmi těsně blízkých. V poslední studii z roku 2004 se nepodařilo nakazit ani skupinu sedmi dobrovolníků, i když infekční dávky se pohybovaly od 200 do 49 000 vysporulovaných oocyst *Cyclospora cayetanensis*.

Klinika

Inkubační doba cyklosporózy se udává průměrně sedm dnů (1–11 dnů). Nákaza může probíhat asymptomaticky, nebo jen s mírnými příznaky, zejména u osob z endemických oblastí, které onemocnění prodělaly opakovaně. Neimunní osoby však trpí většinou dlouhodobými vodnatými průjmy (typické je střídání období průjmů se zácpou), anorexií, nauseou, zvracením, bolestí ve svalech, úbytkem váhy (0,9–3,6 kg), někdy bývá nákaza provázena malabsorbci D-xylózy. Příznaky trvají několik dnů, až několik měsíců, po léčbě rychle ustupují. U některých pacientů byl pozorován fenomén samovyléčení (self-cure). U imunodeficitních osob nákaza probíhá déle a má vážnější průběh. V oblastech s vyšším výskytem cyklosporózy jsou nakaženy nejčastěji děti ve věku 1–2 roky, ale u dětí mladších než půl roku se nákaza prakticky nevyskytuje.

Histologický obraz má charakter akutního, nebo chronického zánětu střevní sliznice, narušení střevního epitelu s částečnou atrofií mikrokloků a hyperplazií krypt. Okolní tkáň je infiltrována lymfocyty. Nákaza nezanechává na střevní sliznici stopy trvalého poškození.

Léčba

Na léčbu cyklosporózy byl již v roce 1993 úspěšně použit kotrimoxazol (trimethoprim-sulfamethoxazol), komerční preparáty Biseptol, Septrin, Bactrim aj. U bakterií spočívá účinek kombinace těchto dvou chemoterapeutik v inhibici dvou postupných kroků v syntéze folátů. U dospělých pacientů se podává 160 mg trimethoprimu a 800 mg sulfamethoxazolu dvakrát denně sedm dní, účinnost se udává 95 %. U imunodeficitních pacientů se dávky zvyšují a doba podávání prodlužuje až na deset dní. Děti starší než dva měsíce dostávají dávku 5–8 mg/kg váhy trimethoprimu a 25–40 mg/kg váhy sulfamethoxazolu dvakrát denně sedm dní. Alternativním lékem v případě alergie na sulfonamidy je ciprofloxacin, v dávce 500 mg/10 dní. Účinnost tohoto preparátu je však pouze 75 %.

Diagnostika

Přímý průkaz parazita mikroskopickými metodami je vždy v diagnostice onemocnění nejcennější, předpokládá však značnou zkušenost odečítajícího. Cyklospory ve stolici lze detekovat v nativních preparátech, či pomocí koncentračních flotačních nebo sedimentačních metod. Při mikroskopickém hodnocení je nutno používat zvětšení minimálně 400x, protože při menším zvětšení oocysty, i když jsou poměrně velké, splývají s pozadím. Osvědčily se metody diferenčního barvení nátěrů ze stolice, založené na odlišném zbarvení oocyst a pozadí (modifikovaný Ziehl-Nielsen, barvení dle Miláčka, barvení safraninem). Pro tato barvení je charakteristické, že některé oocysty cyklospor zůstávají neobarvené. Ve fluorescenčním mikroskopu při použití excitačního filtru 330–365 nm (450–490 nm) můžeme pozorovat autofluorescenci oocyst, kdy na modrém (zeleném) pozadí září bíle vnější obal oocyst. Tato vlastnost je typická také pro kokcidie rodu *Isoospora*, ty se však od cyklospor liší velikostí i tvarem. Molekulárně biologické metody se v rutinní diagnostické praxi příliš neuplatňují.

Metody detekce oocyst cyklospor ve vnějším prostředí

Nejčastějším vehikulem, které představuje nebezpečí možné nákazy pro člověka, je především znečištěná potrava, případně voda. Dosud byly popsány pouze dvě epidemie způsobené kontaminací pitné vody, zato však velké množství hromadných nákaz způsobených kontaminovanou zeleninou, nebo ovocem. Izolace oocyst z prostředí je velmi obtížný proces. Množství oocyst, zejména ve vodě, je velmi nízké a proto se musí filtrovat množství vody přesahující objem sto litrů. Izolace patogenního agens se provádí postupně řadou kroků spočívajících v koncentraci, čištění, detekci a příp. provedení testu sporulace k ověření životaschopnosti oocyst. Oocysty se vychytávají pomocí speciálních filtrů, nebo se koncentrují flokulací za použití koagulantů. Mikroskopická detekce je vzhledem k přítomnosti značného množství detritu i jiných organismů ztížena. Výťažnost těchto metod je velmi nízká a tak v řadě případů hromadných nákaz cyklosporózou se oocysty cyklospor nepodaří z podezřelých potravin izolovat vůbec a rozhoduje se pouze na základě epidemiologických metod sledování možných cest a zdrojů nákazy. Jako perspektivní se však začínají ukazovat selektivní metody molekulárně biologické (PCR), které se mohou dobře uplatňovat v prostředí, kde se vyskytuje velmi mnoho balastních látek i řada jiných patogenních i nepatogenních organismů. Jejich nevýhodou je nemožnost rozlišení vysporulovaných, tudíž infekčních oocyst od oocyst nevysporulovaných. Pomocí PCR reakce je možno detekovat až 10 oocyst/100g bazalky a 40 oocyst/100 g malin, u listového salátu je udávána citlivost nižší, kolem 1000 oocyst/100 g. Kvantitativní metoda real-time PCR dokonce pracuje s detekcí v řádu jedné oocysty v 5 μ l vzorku.

Molekulárně biologické metody

K diagnostickým účelům, i ke studiu fylogenetické příbuznosti cyklospor s taxonomicky nejbližšími kokcidiemi rodu *Eimeria*, byla poprvé použita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) v roce 1996. U eukaryotických organismů se k druhovému rozlišení i k molekulárně evolučním studiím používá analýza genů malé podjednotky ribozomální DNA (18S ssrDNA), která obsahuje vedle velmi konzervativních úseků i vysoce variabilní oblasti, umožňující specificky rozeznat rozdíly mezi jednotlivými skupinami organismů. Výsledkem analýzy DNA z *Cyclospora cayatanensis* metodou „nested“ PCR za použití primerů CYCF1E a CYCR2B v prvním a CYCF3E a CYCR4B ve druhém kroku, byl produkt o velikosti 294 bp. Produkt o stejné velikosti však byl získán i analýzou DNA některých druhů rodu *Eimeria*, takže k rozlišení ampliconů bylo nutno použít další metodu (RFLP), využívající specifickou vlastnost enzymu restriční endonukleáza MnlI štěpit získaný amplicon dále na fragmenty, lišící se u obou skupin organismů v délce i počtu.

Stejného výsledku bylo dosaženo metodou ligace oligonukleotidů (OLA), při které se na amplikon navazují dva specifické oligonukleotidy: jeden značený biotinem a druhý digoxigeninem. Enzym DNA-ligáza spojí obě sondy pouze v případě úplné komplementarity. Biotinylovaný konec se naváže na streptavidin imobilizovaný na pevném povrchu mikrojamky, digoxigenin je pak detekován kolorimetricky. Těmito metodami se podařilo rozlišit rody *Cyclospora* a *Eimeria*, k rozlišení mezidruhových rozdílů to však nestačilo. V 2003 byly publikovány další práce, řešící tento problém pomocí jiných primerů a restričních endonukleáz, nebo použitím metody „multiplex PCR“ se směsí primerů, lišících se pouze v 1–2 nukleotidech na 3' konci primeru (SNP). Metoda prováděná za velmi striktních reakčních podmínek umožňuje rozlišit velmi jemné rozdíly zatím mezi čtyřmi druhy rodu *Cyclospora*, u kterých je známá sekvence genů pro malou podjednotku ribozomální RNA (*Cyclospora cayetanensis* z člověka a *Cyclospora cercopithecii*, *Cyclospora colobi* a *Cyclospora papionis* z opic). Při hledání původce epidemií cyklosporózy ve vzorcích vody nebo potravin je tato specifická nutná vzhledem k možné kontaminaci množstvím jiných organismů. Sekvenční analýza amplifikovaných fragmentů DNA byla poprvé použita při epidemii průjmového onemocnění v Missouri (USA) v roce 1999, kde se podařilo i mikroskopicky prokázat cyklospory v bazalce, použité při přípravě kuřecího salátu. V roce 2000 v Philadelphii (USA) onemocnělo cyklosporózou 54 osob po konzumaci svatebního dortu zdobeného malinovým krémem. I zde se, pomocí metody sekvenace amplifikovaných fragmentů DNA prokázalo, že malinový krém obsahoval DNA *Cyclospora cayetanensis*.

Epidemiologie

V endemických oblastech výskytu cyklosporózy, kterými jsou hlavně střední a jižní Amerika (např. Guatemala, Peru, Haiti), jihovýchodní Asie (např. Nepál, Indonézie), Papua-Nová Guinea, ale i některé africké státy (např. Nigerie, Tanzanie) se prevalence výskytu pohybuje od několika procent do několika desítek procent. Např. u dětí v Peru je udáváno 6–18 %, velmi často asymptomatických nálezů. Onemocnění má výrazně sezónní charakter a je těsně spjato s obdobím dešťů. Importované případy, které jsou popisovány nejen v USA, Kanadě a Austrálii, ale i v řadě evropských zemí (**tabulka 1**) kopírují často sezónní charakter onemocnění podle země původu nákazy. Ale i ve vyspělých zemích jsou ojediněle (méně než 0,5 %) diagnostikovány autochtonní případy cyklosporózy. V České republice bylo v letech 1997–2004 diagnostikováno celkem šestnáct importovaných případů onemocnění cyklosporózou (**tabulka 2**), většinou provázených typickými klinickými příznaky.

Největší pozornost je však v tisku věnována epidemiím, které se každoročně opakují v USA a Kanadě a které jsou způsobeny potravinami, zejména zeleninou a ovocem, kontaminovanými oocystami cyklospor (**tabulka 3**). Jen v letech 1996 a 1997 bylo zaznamenáno celkem 2944 případů, ale odhaduje se, že ve skutečnosti nákazu prodělalo mnohem více osob. Nejčastěji uváděným vehikulem jsou maliny, importované do USA a Kanady v jarních měsících, především z Guatemaly, kde v tomto období sezónní výskyt cyklosporózy vrcholí. Teprve přijetím velmi přísných opatření ohledně importu, ale i hygienických a provozních podmínek na plantážích, kde se maliny pěstují, včetně filtrace závlahové vody, se počet případů, za které byly zodpovědné guatemalské maliny, snížil. Stále se však objevují další druhy ovoce (borůvky), či zeleniny (mnoho druhů hlávkového salátu, listy bazalky), které působí hromadné epizody, i když s menším počtem nakažených osob. V roce 2004 bylo např. v Pensylvánii zachyceno minimálně 40 laboratorně diagnostikovaných a spolu souvisejících případů cyklosporózy. Epidemiologickým šetřením se prokázalo, že oocysty cyklospor byly importovány opět z Guatemaly, tentokrát na mladých luscích hrášku, které byly v syrovém stavu přidávány do těstovinového salátu. Případy hromadných onemocnění však nezůstávají omezeny jen na USA a Kanadu. V prosinci roku 2000 se

nakazilo 34 osob v jedné restauraci v jihovýchodním Německu pravděpodobně salátem, připraveným z různých druhů zeleného a červeného hlávkového salátu a ochuceného petrželovou a cibulovou natí. Čerstvá zelenina byla dovezena z jižní Francie a jižní Itálie. Při pohledu na pulty supermarketů plné roztodivného ovoce a zeleniny, importovaného z nejrůznějších koutů naší planety a na restaurace nabízející kulinářské speciality z celého světa, je jen otázkou času, kdy se možná i u nás objeví epidemie cyklosporózy. Je třeba abychom byli i my, jak laboratorní pracovníci v diagnostických laboratořích, tak i epidemiologové v terénu připraveni takové případy odhalovat a řešit.

Literatura

- ALFANO-SOBSEY E.M., EBERHARD M.L., SEED J.R., WEBER D.J., WON K.Y., NACE E.K., MOE C.L. (2004). Human challenge pilot study with *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 726-728
- ANONYMOUS. (2004). Outbreak of cyclosporiasis associated with snow peas- Pennsylvania, 2004. *MMWR* 53:876-877
- ASHFORD R.W. (1979). Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 73: 497-500
- CURRY A., SMITH H.V. (1998). Emerging pathogens: *Isospora*, *Cyclospora* and *Microsporidia*. *Parasitology* 117: S143-S159
- DÖLLER P.C., DIETRICH K., FILIPP N., BROCKMANN S., DREWECK C., et al. (2002). Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerg. Infect. Dis.* 8:992-994
- EBERHARD M.L., DASILVA A.J., LILLEY B.G., PIENIAZEK N.J. (1999). Morphologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from Ethiopian monkeys: *C. cercopithecii sp.n.*, *C. colobi sp.n.*, and *C. papionis sp.n.* *Emerg. Infect. Dis.* 5: 651-658
- EBERHARD M.L., ORTEGA Y.R., HANES D.E., NACE E.K., QUY D. et al. (2000). Attempts to establish experimental *Cyclospora cayetanensis* infection in laboratory animals. *J. Parasitol.* 86: 577-582
- EBERHARD M.L., PIENIAZEK N.J., ARROWOOD M.J. (1997). Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121: 792-797
- HERWALDT B.L. (2000). *Cyclospora cayetanensis*: A review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clin. Infect. Dis.* 31: 1040-1057
- HO A.Y., LOPEZ A.S., EBERHART M.G., LEVENSON R., FINKEL B.S., DASILVA A.J. et al. (2002). Outbreak of cyclosporiasis associated with imported raspberries, Philadelphia, Pennsylvania, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 8:783-788
- LOPEZ A.S., DODSON D.R., ARROWOOD M.J., ORLANDI P.A., DASILVA, A.J. et al. (2001). Outbreak of cyclosporiasis associated with basil in Missouri in 1999. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1010-1017
- MADICO G., GIMAN R.H., MIRANDA E., CABRERA L., STERLING C.R. (1993). Treatment of *Cyclospora cayetanensis* in Peruvian children. *Clin. Infect. Dis.* 24: 977-981
- MILÁČEK P., VÍTOVEC J. (1985). Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia parazitologica* 82:50
- ORLANDI P.A., CARTER L., BRINKER A.M., DASILVA A.J., et al. (2003). Targeting single-nucleotide polymorphisms in the 18S rRNA gene to differentiate *Cyclospora* species from *Eimeria* species by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4806-4813

- ORTEGA Y.R., GILMAN R.H., STERLING C.R. (1994). A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. *J. Parasitol.* 80: 625-629
- RELMAN D.A., SCHMIDT T.M., GAJADHAR A., SOGIN M., CROSS J. et al. (1996). Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that is closely related to *Eimeria* species. *J.Infect.Dis.* 173: 440-445
- SHIELDS J.M., OLSON B.H. (2003). *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasiti coccidian. *Int.J. for Parasitology* 33: 371-391
- SOAVE R. (1996). *Cyclospora*: An overview. *Clin.Infect.Dis.* 23:429-437
- TOLAROVÁ V., NOHÝNKOVÁ E., SUCHÁNKOVÁ E. (2000). Firsr cases of *Cyclospora cayetanensis* infections imported to the Czech Republic. (VII European Multicolloquium of Parasitology. Poznan Poland 2000). *Acta Parasitol.* 45: 213

Tabulka 1: Evropské země referující o importovaných případech cyklosporózy

země	země původu	rok publikace
Belgie	Indonézie	1995
Česká republika	viz tab.2	2000
Holandsko	Sri Lanka, j.Amerika, jv Asie	1993
Irsko	jv. Asie	1996
Itálie	jv. Asie, j.Amerika	1994,1998
Německo	Singapur, Jáva, Bali	1997
Španělsko	Gabun, Turecko, Indie, Sri Lanka	1995
Švýcarsko	jv. Asie	1999,2001
Velká Británie	jv. Asie	1996

upraveno podle J.M.Shields a B.H.Olson, Int. J. for Parasitology, 33,2003

Tabulka 2: Počet případů cyklosporózy importovaných do České republiky 1997-2004

rok	počet případů	země původu
1997	6	Mexiko
1998	1	Nepál
1999	1	Guatemala
	1	Vietnam
2000	1	Indonézie
2001	1	Indonézie
	1	jižní Asie
	1	Pakistán
2002	0	
2003	1	jihovýchodní Asie
	1	Asie
2004	0	

upraveno podle ročních hlášení laboratoří

Tabulka 3: Nejdůležitější epidemie cyklosporózy 1990-2004

rok	země	vehikulum	počet případů	země původu
1990	USA	voda nebo potrava	21	?
1995	USA	maliny	70	?
1996	USA	maliny	1465	Guatemala
1997	USA, Kanada	salát, maliny, borůvky, bazalka,	1479	Guatemala, Peru
1998	USA, Kanada	maliny, ovoce	332	Guatemala
1999	USA, Kanada	maliny, borůvky, bazalka	222	Guatemala
2000	USA	maliny	54	Guatemala
2000	Německo	hlávkový salát, nat'ová zelenina	34	j. Francie, j. Itálie
2004	USA	lusky hrášku	40	Guatemala

upraveno podle J.M.Shields a B.H.Olson, Int. J. for Parasitology, 33,2003

Kryptosporidióza: rizika pro imunokompetentní a imunodeficitní jedince

RNDr. Oleg Ditrich, CSc., Ing. Martin Kváč, PhD., RNDr. Dana Květoňová

Parazitologický ústav AV ČR, České Budějovice

Co je to kryptosporidióza a kam dnes patří kryptosporidie?

Kryptosporidióza je onemocnění způsobené kryptosporidii - jednobuněčnými parazity rodu *Cryptosporidium*. Dříve byly kryptosporidie řazeny do blízkosti eimerií mezi Coccidia, dnes víme, že jsou více příbuzné gregarinám. Spolu s kokciemi a také např. s malarickými plasmodii patří do kmene Apicomplexa, který je příbuzný obrněnkám a nálevníkům (skupina Alveolata). Na rozdíl od ostatních Apicomplex nebyl u kryptosporidií jednoznačně prokázán apikoplast (zbytek plastidu získaného během fylogeneze od endosymbionta), i když bylo nalezeno minimálně 7 genů pravděpodobně z apikoplastu pocházejících. Další minimálně 24 genů pochází pravděpodobně z prokaryotického endosymbionta. Kryptosporidie mají silně redukovaný zbytek mitochondrie. Zařazení kryptosporidií mimo kokcie není vlastně žádná novinka: potvrdilo původní Tyzzerův názor (Tyzzer 1907, 1910), který pojmenoval rod podle „neodlišitelné nebo chybějící spory v oocystě“ a zdůraznil, že se tím od kokcií liší (i když jej ke kokciím přiřadil). V rámci rodu *Cryptosporidium* lze rozlišit dvě výrazné skupiny druhů, první s menšími oocystami a s afinitou ke střevu (k enterocytům) a druhou s většími oocystami a s afinitou k žlučedním žlázám.

Životní cyklus kryptosporidií.

Kryptosporidie se šíří fekálně-orálním transportem. Nejlépe je probádaný cyklus druhu *C. parvum*; životní cykly ostatních druhů jsou však stejné nebo velmi podobné. Po excystaci spolknutých oocyst adherují uvolnění sporozoiti k hostitelským buňkám, vnikají do nich a mění se v trofozoity. Na rozdíl od kokcií se však nezanořují do cytoplasmy, zůstávají pod buněčnou membránou v parazitoformní vakuole a promíňují do lumen střeva. Také způsob vniknutí do enterocytu je odlišný od vnikání jiných parazitických protozoí do buněk: nevyskytuje se tu typická invaginace hostitelské plasmatické membrány, známá např. u malarických plasmodií, u toxoplasmy nebo eimerií. Kryptosporidie způsobí změny v mikrovilech enterocytů; ty se prodlužují, obklopí sporozoit a vzájemně splynou, čímž kryptosporidii uzavřou v parazitoformní vakuole. Tuto intracelulární-extracytoplasmatickou lokalizaci si kryptosporidie zachovávají s velmi krátkými přestávkami strávenými v lumen po celou dobu endogenní fáze životního cyklu. Kryptosporidie mají takzvanou „feeder“ organelu, které se dříve (jak napovídá jméno) přisuzovala zásadní úloha pro příjem živin; dnes se o tom pochybuje a funkce organely zůstává nejasná. Trofozoiti se nepohlavně dělí merogonií; výsledkem jsou meronti I. typu obsahující 8 merozoitů. Po uvolnění napadají meronti další buňky a tato část cyklu se buď několikrát opakovaně opakuje, nebo vznikají meronti II. typu obsahující pouze 4 merozoity. Z nich v procesu gametogonie vznikají makrogamonty a mikrogamonty se 16 pohyblivými mikrogametami. Vzniklé makrogamety a mikrogamety po uvolnění do lumen splývají, vzniká zygota a z ní oocysta s jednou tetrazoickou sporocystou. Přibližně pětina oocyst (u druhu *C. parvum*) je tenkostěnných, obklopených pouze sérií jednotkových membrán. Tenkostěnné oocysty nejsou schopny přežít ve vnějším prostředí a slouží k infekci dalších úseků trávicího traktu. Sporozoity z nich uvolněné spolu s merozoity

infikují v krátké době celé jejunum a terminální ileum. Naopak čtyři pětiny oocyst jsou dobře vybaveny pro přežití v nepříznivých podmínkách: mají vnější vrstvu z kyselého glykoproteinu, střední lipoproteinovou a vnitřní glykoproteinovou vrstvu. Tyto silnostěnné oocysty slouží k infekci dalších hostitelů, sporulují ještě ve střevě původního hostitele, takže jsou ihned schopné infekce. Ačkoliv většina zdrojů uvádí delší časové úseky, podle současných poznatků trvá celý vývojový cyklus 12 – 14 hodin. Každý ze 4 sporozoitů v oocystě má haploidní jádro s 8 chromozomy. Ty obsahují 10,1-10,4 miliónů párových bází DNA s nepočitelnými introny. Cytoplasma obsahuje přibližně tisíc kopií od každé ze dvou typů dvouvláknové RNA pocházející z viru čeledi Partitiviridae.

Patogenita a virulence kryptosporidií.

O skutečnosti, zda jsou kryptosporidie schopny hostitele vůbec infikovat, se rozhoduje v prvních fázích interakce sporozoitů (nebo merozoitů) s hostitelskou buňkou, tedy při adhezi a případné internalizaci. Na obou procesech se podílí řada faktorů souhrnně nazývaných determinanty virulence. Jde například o adhezní proteiny podobné lidskému trombospodinu (TRAP C-1 a TRAP C-2), sporozoitový protein bohatý cysteinem (SCRP), glykoproteiny (CSL a gp900) a specifické lektiny. Cysteinové a serinové proteázy a argininová aminopeptidáza se podílejí na internalizaci, ale svou roli hrají již při excystaci. Po adhezi sporozoitů zahajují epiteliální buňky produkci cytokinů, které aktivují rezidentní fagocyty. Aktivované fagocyty pak produkují histamin, serotonin, adenosin, prostaglandiny a několik dalších rozpustných faktorů, které v první řadě tlumí zánětlivé procesy ve střevě. Navíc tyto látky jednak zvyšují sekreci vody a chloridových iontů střevní sliznicí, jednak inhibují absorpční schopnost střeva. Buňky střevní sliznice tak jsou poškozovány přímo (tj. přímý následek invaze kryptosporidie do buňky a její množení v ní) i nepřímo (poškození neinfikovaných buněk T-buňkami zprostředkovaným zánětem, důsledkem je atrofie klků a hyperplazie krypt). Kryptosporidie dále inhibují apoptózu hostitelských buněk a naopak ji indukují u okolního neinfikovaného epitelu. Tlumení zánětu a ovlivňování apoptózy umožňuje delší přežívání kryptosporidií ve střevní sliznici. Produkce toxinů kryptosporidiemi je občas předpokládána, ale nebyla dosud jednoznačně prokázána.

Snížená resorpční schopnost střeva se projevuje vodnatými průjmy. U **imunokompetentních jedinců** po krátké prepatentní periodě (4–6 dní, při vysoké infekční dávce 3 dny) nastupuje patentní perioda (6–18 dní); perioda vodnatých průjmů je o něco kratší (4–10 dní v typických případech) a dojde k samovolnému vyléčení. Kromě průjmů se v různé míře přidávají další příznaky: kolikové bolesti břicha, nauzea, vomitus, flatulence, zvýšená teplota, nechutenství až anorexie a váhový úbytek. U některých jedinců může infekce proběhnout bez patentních příznaků.

U **imunodeficitních jedinců** bývá průběh onemocnění odlišný. Rozdíl se projevují již na buněčné úrovni: v mnohem větší míře je kolem infikovaných buněk pozorována zánětlivá infiltrace. Patentní perioda se prodlužuje na mnoho týdnů i měsíců a v tomto období se střídají fáze s průjmy s relativně klidnými fázemi, kdy jsou kryptosporidie přítomny ve formované stolici. Onemocnění je chronické a nejeví tendenci k samovolnému vyléčení, naopak, často diseminuje do dalších orgánů. V první řadě se šíří do dalších úseků zažívacího traktu, směrem kraniálním (duodenum, žaludek, jícen) i kaudálním (caecum, colon, rectum). Dále postihuje sliznice žlučovýchodů, vývody pankreatu a dýchací trakt. Průběh onemocnění závisí na stupni imunodeficiency, u těžkých případů, např. u pacientů s rozvinutým AIDS (počet CD4+ lymocytů ≤ 200 v 1 mm^3 krve) dochází ke generalizaci a ke smrti následkem metabolického rozvratu.

Epidemiologie kryptosporidiózy.

Velmi významným epidemiologickým faktorem je hostitelská specificita a od ní se odvíjející možnost přenosu z jednoho hostitelského druhu na jiný. O epidemiologii kryptosporidiózy lze proto hovořit pouze v souvislosti s vnitrorodovou a vnitrodruhovou variabilitou a změnami v jejich hodnocení, které byly umožněny zavedením molekulárně biologických metod. Většina starších údajů se vztahuje k druhu *Cryptosporidium parvum* sensu lato a často jde o informace týkající se několika druhů s odlišným hostitelským spektrem. Pojmenovat správně jednotlivé druhy kryptosporidií není jednoduché: je třeba se řídit Mezinárodním kodexem zoologické nomenklatury, ale zároveň se musíme smířit se skutečností, že v mnoha případech tu není splněna podmínka uschovaného a dostupného typového materiálu. Jeden příklad za všechny: druh *C. parvum* byl popsán ze střeva myši a dnes nevíme, zda šlo o dnes známý myší genotyp specializovaný na hlodavce nebo zda šlo o tzv. bovinní genotyp s nízkou hostitelskou specificitou schopný infikovat různé druhy savců (včetně myši). Pokud považujeme genotypy specializované na jednotlivé hostitele za druhy (což považujeme!), měl by při první z výše popsaných alternativ být druh *C. parvum* zachován pro druh z myši a druh s širokou hostitelskou specificitou by měl nést jméno *C. bovis*. Aniž bychom chtěli a mohli zacházet do podrobností této komplikované problematiky (zájemce odkazujeme na pravidelně aktualizovanou webovou stránku dr. Šlapety: <http://www.mujweb.cz/www/iroger/crypto/>), uvádíme přehled platných druhů, které mohou infikovat člověka.

Cryptosporidium hominis Morgan-Ryan, Fall, Ward, Hijjawi, Sulaiman, Fayer, Thompson, Olson and Xiao, 2002

Druh specializovaný na člověka (doneslávně označovaný jako genotyp I, případně lidský genotyp). Kromě člověka byl vzácně nalézán u opic, jehňat, dugonga; experimentálně byl přenesen na opice, jehňata a gnotobiotická prasata. Experimentální přenos na laboratorní hlodavce, šelmy a kůzlata se nezdařil. Pro člověka je velmi virulentní, s vysokým potenciálem interhumánního přenosu. Byl identifikován jako původce rozsáhlých epidemií z vody včetně té největší (Milwaukee v r. 1993). Na našem území je vzácný, častější je v západní Evropě (např. v Británii) a v USA. O rozšíření v tropech (tedy na území s nejvyšší prevalencí kryptosporidiózy) chybějí informace. Představuje velké riziko pro imunokompetentní i imunodeficitní jedince.

Cryptosporidium parvum Tyzzer, 1912

Zahrnuje především takzvaný genotyp II (bovinní) a dosud řadu genotypů, které jsou k tomuto druhu řazeny ze setrvačnosti, ale které jistě budou brzy popsány jako samostatné druhy. Po jejich oddělení zůstane *C. parvum* sensu stricto, druh s nejširším hostitelským spektrem: infikuje kopytníky, hlodavce, zajíce, primáty včetně člověka, šelmy a pravděpodobně i další řády. Experimentálně byly infikovány tímto druhem i ptáci. Oocysty tohoto druhu byly (společně s oocystami *C. hominis* a oocystami tří dalších dosud nepojmenovaných genotypů) opakovaně nalézány v trusu bernešek – v tomto případě není jasné, zda jde o pasáž oocyst zažívacím traktem. Kvůli snadnému experimentálnímu přenosu (velké množství oocyst lze získat z infikovaného telete a lze jimi infikovat laboratorní hlodavce) je *C. parvum* nejlépe prozkoumaný druh a týká se jej většina informací o imunitní odpovědi, biochemických cyklech apod. Tento druh je velmi častý na našem území, je rozšířený v chovech hospodářských zvířat. Převažuje mezi izoláty získanými z člověka, častý je zejména u dětí. Oocysty tohoto druhu jsou přítomny ve většině povrchových vodních zdrojů, vyskytují se i v hlubinných zdrojích. Představuje relativně velké riziko pro imunokompetentní i imunodeficitní jedince.

Cryptosporidium meleagridis Slavin, 1955

Jde o ptačí druh popsáný původně z krocana, ale zahrnuje i tzv. genotyp III izolovaný z lidí. Experimentálně lze přenést na laboratorní hlodavce, králíky a telata. Byl izolován

(spolu s dalšími druhy) při menších epidemiích z vody ve Velké Británii. Představuje riziko pro imunokompetentní i imunodeficitní jedince.

Cryptosporidium felis Iseki, 1979

Druh specializovaný na kočky, ale nalezený též u hovězího dobytka, myšice, imunodeficitních i imunokompetentních lidí. Kromě originálního popisu z japonských koček (není vyloučeno, že se týkal jiného druhu) se další nálezy vztahují k mnohem podrobnějšímu popisu z Austrálie (Sarget et al. 1998). I když se jinak podobá druhu *C. parvum*, signifikantně se od něj liší menšími oocystami. Pravděpodobně představuje riziko pro imunokompetentní i imunodeficitní jedince, vzhledem k malému počtu dosavadních údajů je jeho míru obtížné posoudit.

Cryptosporidium canis Fayer, Trout, Xiao, Morgan, Lal and Dubey, 2001

Původně tzv. psi (canine) genotyp byl později popsán jako samostatný druh. Kromě psů nalezen u medvěda, imunosuprimovaných lidí (AIDS, léčba kortikoidy) a imunokompetentních dětí. Experimentálně přenesen na tele, ale neinfekční pro myš. U tohoto druhu existuje vnitrodruhová variabilita: genotyp z lidí se liší od liščího a psiho genotypu. *Cryptosporidium canis* pravděpodobně představuje určité riziko pro imunodeficitní i imunokompetentní jedince.

Cryptosporidium suis Ryan, Monis, Enemark, Sulaiman, Samarasinghe, Read, Buddle, Robertson, Zhou, Thompson, Xiao, 2004

Dosud poslední popsaná střevní kryptosporidie. Dříve byla popisována jako „porcine“ genotyp I. Vyskytuje se u prasat a byla nalezena u imunodeficitních pacientů. Genotypem podobná kryptosporidie byla zjištěna také u kalifornských syslů, ta však pravděpodobně představuje samostatný druh. *Cryptosporidium suis* pravděpodobně představuje určité riziko pro imunodeficitní pacienty.

Cryptosporidium muris (Tyzzer, 1907) Tyzzer, 1910

Žaludeční kryptosporidie infikující především hlodavce (myš, potkan, zemní veverka), ale nalezená též u velblouda, damana a imunodeficitních a imunokompetentních lidí. Experimentálně byl tento druh přenesen na různé druhy myšovitých, na morčata, králíky, kočky a psy. Vzhledem k nízké patogenitě není riziko lidských infekcí závažné.

Cryptosporidium andersoni Lindsay, Upton, Owens, Morgan, Mead and Blagburn, 2000

Žaludeční kryptosporidie infikující především skot, dále byly nalezeny u zubra, velblouda, sviště, pravděpodobně i u gazely a byly prokázány i u pacienta trpícího AIDS. Experimentálně lze infikovat pískomily.

Můžeme předpokládat, že v blízké budoucnosti budou na základě genotypů popsány nové druhy kryptosporidií, které by mohly infikovat imunodeficitní pacienty.

Výše uvedené poznatky ovlivnily představy o epidemiologii kryptosporidiózy. Antropozoonotický přenos sice existuje, ale interhumánní přenos hraje též závažnou roli, zvláště v zemích, kde převažuje *C. hominis*. Rozsáhlá epidemiologická studie ve Velké Británii zabývající se sporadickými případy kryptosporidiózy (nebyly zahrnuty epidemie z vody) zjistila poměr *C. hominis/C. parvum* 1,5. Pro *C. hominis* byla zjištěna pozitivní korelace s cestováním do zahraničí a s výměnou plen dětem mladším pěti let. Překvapivě i pro *C. parvum* byla zjištěna nejsilnější korelace s cestováním do zahraničí a s kontaktem s osobou trpící průjmem, teprve na třetím místě byl kontakt s dobyt看em, následovaný pomocí dětem pod 5 let používat záchod a pitím vodovodní vody. Naopak silně negativní korelace byla zjištěna s požíváním syrových rajčat a syrové zeleniny. V menší studii kryptosporidiózy ve Švýcarsku bylo toto onemocnění odhaleno jako příčina 5,5 % dětských průjmů a poměr *C. hominis/C. parvum* byl 11 : 3. Dvanáctiletá studie sporadických případů kryptosporidiózy z USA, ve které ještě nebyly druhy kryptosporidií rozlišovány, zjistila následující rizikové faktory: cestování do zahraničí, kontakt s dobyt看em, kontakt s dětmi (2–11 let) trpícími

průjmy, a plavání ve sladké vodě. I tato studie označuje požívání syrové zeleniny za protektivní (sic!). Studie z Nového Zélandu odhalila téměř rovnoměrné zastoupení obou druhů, přičemž *C. hominis* převažovalo ve městě a incidence vrcholila na podzim a *C. parvum* převažovalo na venkově s vrcholem na jaře. Studie navíc zjistila kryptosporidie podobné *C. canis* u dvou nepříbuzných dětí.

Dosud nejrozsáhlejší studie kryptosporidiózy imunodeficitních pacientů byla uskutečněna v Limě (Peru). Bylo v ní vyšetřeno 13 937 vzorků od 2 672 HIV pozitivních pacientů. U 354 pacientů byly nalezeny kryptosporidie s druhovým zastoupením: *C. hominis* 67,5 %, *C. meleagridis* 12,6 %, *C. parvum* 11,3 %, *C. canis* 4,0 %, *C. felis* 3,3 % a *C. suis* 0,5 %.

Na našem území je situace odlišná: dosud nebyla zaznamenána epidemie z vody a je u nás mnohem méně HIV pozitivních pacientů a z tohoto důvodu nemáme tak velké počty genotypizovaných izolátů z lidí. Jednoznačně však převažuje *C. parvum*, druh *C. hominis* byl zjištěn jen ojediněle a další druhy u nás z člověka izolovány nebyly, i když se na našem území vyskytují.

Pokud jde o identifikaci původců epidemií kryptosporidiózy z vody, převažuje *C. hominis*, na druhém místě je opět *C. parvum* a na třetím *C. meleagridis*. Nejsou výjimkou ani případy, že se na epidemii podílejí 2 nebo 3 druhy. Celkově je tedy voda nejzávažnějším rizikovým faktorem a nejvýznamnějším zdrojem kontaminace vody jsou splašky obsahující lidské fekálie (zpětně tak byla po deseti letech vyhodnocena i epidemie v Milwaukee) a teprve na druhém místě trus zvířat. V souhrnných člancích se opakují též informace o jiných médiích (ovocné mošty, mléko, mléčné výrobky, siláž atd.); původní práce o nich mají často anekdotický charakter a i v těch případech, kdy byly jako zdroj kryptosporidiózy skutečně odhaleny jde o malé počty, téměř zanedbatelné s počty kryptosporidiózy z vody. Nemusí vždy jít o vodu pitnou: např. v roce 2000 proběhla v Ohiu epidemie kryptosporidiózy (původce *C. hominis* i *C. parvum*), která postihla 700 lidí a hlavní rizikový faktor bylo plavání v bazénu. V poslední době je též zdůrazňován význam mořské vody: kryptosporidie v ní relativně dlouho přežívají a rizikovým faktorem může být buď koupání, nebo požívání mořských živočichů, zejména mlžů. Ti jsou účinní filtrátoři, kteří na žábrách oocysty kryptosporidií zachycují, a přitom jsou konzumováni často syroví.

Terapie a tlumení kryptosporidiózy.

U imunokompetentních pacientů se používá symptomatická léčba, především rehydratace organismu. O specifické terapii se sice občas diskutuje, ale jednak dosud spolehlivá specifická léčba neexistuje, jednak v době stanovení diagnózy většinou již příznaky onemocnění samovolně končí. Složitější je situace u imunodeficitních pacientů. I zde lze průběh ovlivňovat především symptomy (hydratace, doplňování elektrolytů). Imunoterapie (podávání hyperimunního colostru, hyperimunních žloutků) sice vede k oddálení diseminace, ale vzhledem k náročnosti a ceně se nepoužívá v širokém měřítku. Nejlepších výsledků se dosahuje léčbou samotné HIV infekce (antiretroviróvá terapie), při které se udržuje stav imunitního systému dlouhodobě na přijatelné úrovni. Objevují se informace o léčebných účincích nitazoxanidu, množství jiných preparátů, o kterých se v minulosti s podobnými nadějami psalo, nás nutí k určité skepsi. Zajímavou možností je použití tzv. probiotických bakterií při tlumení případně léčbě kryptosporidiózy. Metabolity *Lactobacillus acidophilus* a *L. reuteri* snižují infektivitu *C. parvum* a *C. hominis in vitro*, podávání těchto laktobacilů telatům redukuje počty oocyst v jejich trusu a existuje již zpráva o úspěšné léčbě chronické kryptosporidiózy u imunosuprimovaného pacienta pomocí laktobacilů. Další slibná metoda tlumení kryptosporidiózy byla vyzkoušena u telat a spočívá v perorální vakcinaci oocystami *C. parvum* ozářenými γ zářením, po které se vyvinula protektivní imunita. Jako u všech infekcí s fekálně-orálním transportem i u kryptosporidiózy spočívají hlavní způsoby jejího

tlumení v hygienických opatřeních, v dalším šíření kanalizace a v režimu čištění odpadních vod. Cílem těchto opatření je zamezit kontaminaci povrchových vod splašky obsahujícími lidské i zvířecí fekálie.

Kdy je na místě vyšetřovat materiál na kryptosporidie?

Je to stejné jako v případě střevních nikrosporidií s tím rozdílem, že je mnohem pravděpodobnější výskyt u imunokompetentních pacientů, zejména u dětí. Determinace původce tu neovlivní terapii, ale má význam pro odhalení zdroje a v důsledku tedy i pro ochranu dalších lidí před infekcí. Zvláště hromadný výskyt průjmových onemocnění by mohl být epidemií kryptosporidiózy – je rozumné s touto možností předem počítat.

Jakými metodami vyšetřovat?

S výjimkou velmi zkušených odborníků diagnostikujících kryptosporidie často, nedoporučujeme vyšetření nativních preparátů (ani supernatantů z flotace, glycerinových preparátů apod.). To vedlo v minulosti k mnoha omylům a falešně pozitivním výsledkům. Doporučujeme buď jednoduché barvení nátěru stolice (methylviolet podle Miláčka a Vítovce nebo modifikované Ziehl-Nielsonovo barvení) nebo použití komerčně dostupných imunodiagnostických testů (IFAT nebo ELISA). Existují i diagnostické molekulární testy, při kterých se rovnou determinuje původce, je však třeba je kombinovat: univerzální test rozlišující všechny druhy zatím neexistuje.

Jak uchovávat oocysty pro další vyšetření?

Odolné oocysty kryptosporidií přežijí krátkodobé skladování v nefixovaném stavu, nejlépe v lednici. Živé oocysty skladujeme dlouhodobě v roztoku dvojchromanu draselného, buď koncentrované nebo přímo ve stolici. Takto uchovaný materiál lze použít třeba k infekčním pokusům, avšak není vhodný k molekulární identifikaci (dvojchroman inhibuje PCR a jen obtížně jej lze odstranit). Koncentrované oocysty (po flotaci na sacharózovém, percolovém nebo cesiumchloridovém gradientu) lze dlouhodobě skladovat v roztoku antibiotik/antimykotik nebo je fixovat alkoholem.

Kryptosporidie a životní prostředí

Ing. Martin Kváč, PhD., RNDr. Dana Květoňová, RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Parazitologický ústav AV ČR, České Budějovice

Podobně jako u jiných infekcí šířených fekálně-orálním transportem, je i u kryptosporidií významným epidemiologickým faktorem schopnost klidových stádií (v tomto případě oocyst) odolávat vlivům vnějšího prostředí. Oocysty kryptosporidií jsou velmi odolné vůči nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí a spolu se zachováním dlouhodobé životaschopnosti a infekivity představují vážné nebezpečí infekce. V současné době neexistuje souhrnná práce zabývající se vlivem činitelů vnějšího prostředí na inaktivaci oocyst kryptosporidií. Přestože se většina autorů zabývá pouze některým z činitelů vnějšího prostředí, lze si vytvořit komplexní představu o vlivu prostředí na přežívání oocyst kryptosporidií.

Oocysty kryptosporidií jsou z těla hostitele vylučovány spolu s trusem. Ve studiích zabývajících se působením trusu na životaschopnost oocyst *C. parvum* bylo zjištěno, že při uložení trusu ve tmě při 4 °C zůstává po 25 týdnech 40 % oocyst životaschopných a 10 % oocyst přežívá déle než 400 dní (Robertson et al. 1992, Jenkins et al. 1997). Ve venkovním prostředí však nezůstává trus tak dlouhou dobu kompaktní a vlivem hnilobných procesů a především působením povětrnostních podmínek (teplota a vodních srážky) dochází k jeho rozkladu a uvolnění oocyst do půdy, případně povrchových vod.

Schopností oocyst *C. parvum* přežít v půdách o různé zrnitosti a při různých teplotách se zabývali Jenkins et al. (2002). Z výzkumu těchto autorů vyplynulo, že nejdéle přežívají oocysty v půdách s vyšším podílem jílu a tedy s vyšší retenční schopností vody (oocysty jsou málo odolné proti vyschnutí). Druhým souvisejícím faktorem byl podíl písku, se stoupajícím podílem písku v půdě a stoupající teplotou okolí byly oocysty rychleji inaktivovány. Výsledky Jenkinse et al. (2002) jsou souhrnně uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Vliv půdy o různé zrnitosti a teploty půdy na přežívání oocyst kryptosporidií

Teplota	Složení půdy		
	2 % písku, 29 % jílu, 69 % hlíny, org. uhlík 2,6 %	33 % písku, 50 % jílu, 16 % hlíny, org. uhlík 2,3 %	80 % písku, 14 % jílu, 6 % hlíny, org. uhlík 1,8 %
	Odhadnutá 99 % inaktivace <i>C. parvum</i> oocyst (dny)		
4 °C	2302	622	336
20 °C	4063	2302	1096
30 °C	2228	690	634

Vlivem dešťových srážek jsou oocysty z půdy vyplavovány do povrchových vod. Množství takto odplavených oocyst je ovlivněna sklonem půdy, vegetační kryt a intenzita dešťových srážek. Vegetační kryt výrazně omezuje vyplavování oocyst. V tabulce 2 je uveden vliv intenzity dešťových srážek a vegetace na vyplavování oocyst kryptosporidií do povrchových vod.

Tabulka 2. Procento odplavení oocyst *C. parvum* při různé intenzitě dešťových srážek při různém sklonu půdy (1,5 až 4,5%).

Povrch půdy	Intenzita dešťových srážek po dobu 44 minut	
	25,4 mm/h	63,5 mm/h
Procento odplavených oocyst		
S vegetací	0,6 až 1,7 %	0,8 až 27,2 %
Bez vegetace	4,4 až 14,5 %	5,3 až 59 %

Přežívání oocyst *C. parvum* v různých typech vod a při definované teplotě bylo studováno Robertsonem et al. (1992). Oocysty *C. parvum* skladované ve tmě v říční vodě při teplotě 4 °C byly z 99 % inaktivovány za 25 týdnů. Stejný výsledek byl i při použití vodovodní vody. Naopak oocysty *C. parvum* uskladněné v deionizované vodě a v mořské vodě za shodných podmínek vykazovaly pouze 67 %, respektive 44 % inaktivaci po 25 týdnech uskladnění. Výzkum zabývající se znečištěním a kontaminací mořských vod ukázal, že pobřežní vody jsou kontaminované oocystami kryptosporidií (fekální znečištění – člověk, domácí a hospodářská zvířata), které jsou filtrovány a koncentrovány v tělech měkkýšů, jejichž konzumací (nedostatečně tepelně upravené) dochází k infekci lidí a mořských savců (Fayer et al. 2004). Z našich experimentů vyplynulo, že oocysty *C. parvum* po jednom roce skladování ve tmě při 4 °C v deionizované vodě zůstávají z více než 50 % životaschopné a plně infekce schopné. Naopak oocysty *C. andersoni* byly za stejných podmínek rychle inaktivovány (80 % inaktivace po 6 měsících) a po devíti měsících skladování již nebyly infekční pro modelová zvířata (pískomilové *Meriones unguiculatus*).

Povrchové zdroje používané v našich podmínkách pro úpravu pitné vody jsou vesměs kontaminovány životaschopnými oocystami kryptosporidií. Z převažujícího genotypu II *C. parvum* mezi typizovanými izoláty z povrchových vod usuzujeme, že hlavním zdrojem kontaminace jsou s vysokou pravděpodobností zemědělské podniky, především chovy skotu. Absence epidemií kryptosporidiosis z vody na našem území může souviset se vzácností výskytu *Cryptosporidium hominis* u nás. O frekventovaných kontaktech naší populace s kryptosporidiovými antigeny svědčí častá přítomnost specifických protilátek v sérech dárců krve, zjištěná našimi spolupracovníky z SZÚ.

Jako nevhodný indikátor pro stanovení výskytu kryptosporidií se ukázal dříve doporučený výskyt *Clostridium perfringens*. Nepovažujeme za vhodné, aby se na přítomnost kryptosporidií vyšetřovaly pouze vzorky vody pozitivní na *Clostridium*.

Naopak velmi slibnou metodou usnadňující stanovení oocyst kryptosporidií na lokalitě je vyšetření výplachu žaber přítomných mlžů. Pro případné rutinní použití bude nutné tuto metodu standardizovat. Oocysty kryptosporidií jsou účinně zachycovány na žábrách mlžů (*Bivalvia*), kteří žijí na většině lokalit, sloužících jako zdroj surové vody pro úpravu na vodu pitnou. Nálezy na žábrách pozitivně korelují se záchytem kryptosporidií ze vzorků vod pomocí klasické primární filtrace v našich zařízeních pro odběr vzorků. Vyšetření žaber relativně malého vzorku mlžů by mohlo nahradit mnohonásobně časově i finančně náročnější zkoumání velkého objemu vod. Použití tohoto indikátoru navíc umožňuje nejen zmapování okamžitého stavu, ale vypovídá o situaci v delším časovém úseku.

Nejvýznamnějším technologickým krokem pro odstranění oocyst při úpravě pitné vody je dosud písková filtrace. Rizikovým krokem této metody je především diskontinuita při praní filtrů a při opětovném zafiltrování. Recyklace prací vody je možná pod podmínkou kontroly přítomnosti oocyst kryptosporidií. Do budoucna je třeba rozvíjet moderní účinné metody odstraňování či devitalizace kryptosporidií, jako je membránová filtrace či ošetření vody UV

zářením. Simulace slunečního UV záření mělo na oocysty ve vodním prostředí pouze částečný inaktivační účinek. Při expozici UV záření o vlnové délce 280 - 320 nm po dobu 4 hodin a při laboratorní teplotě byly oocysty *C. parvum* z 60 % inaktivovány. Avšak společně s působením tepla (45 °C, simulace slunečního záření v rovníkových oblastech) byly oocysty již po 2 hodinách expozice 100 % inaktivovány a nebyly infekční pro neonatální myši (vlastní výsledky). Některé mikroorganismy (včetně kryptosporidií) mají opravný mechanismus, který může opravit poškozenou DNA. Pro deaktivaci takovýchto organismů je podle mnohých studií nutné dosáhnout alespoň dávky záření 40 mJ.cm⁻². Rochelle et al. 2004 uvádějí, že průměrná dávka 7,6 mJ/cm⁻² má 99,9% inaktivační účinek na oocysty kryptosporidií.

Všechny vlivy popsané výše v textu jsou dle našeho názoru vlivy sekundárními. Hlavním a nejvýznamnějším faktorem, který ovlivňuje schopnost oocyst kryptosporidií přežít ve vnějším prostředí je teplota a snad právě proto je jedním z nejvíce probádaných inaktivačních faktorů. V tabulce 3 je uveden vliv různých teplot potřebných k inaktivaci oocyst *C. parvum*.

Souvisejícím problémem je sekundární kontaminace potravin oocystami kryptosporidií. Pokud dojde na jatkách ke kontaminaci masa jsou oocysty *C. parvum* během standardního postupu uskladnění masa z 90.6% inaktivovány (rychlé zchlazení na -20 °C během 60 hod.; skladování při -20 °C, 21 dní; temperování 48 hod. na -3 °C a uskladnění při 0 °C 10 hod.) (McEvoy et al. 2004). Oocysty v jogurtové kultuře zůstávají při 4 °C životaschopné minimálně 8 dní (Deng et al. 1999).

Tabulka 3. Vliv teploty na inaktivaci oocyst *C. parvum*

	Teplota	Expozice (čas)	Infektivita	Citace
Teploty pod bodem mrazu	-196 °C	10 minut	-	Sherwood et al. 1982
	-70 °C	1 hodina	-	
	-20 °C	8 hodin	+	
	-20 °C	1 den	-	Fayer et Nerad 1996
	-15 °C	1 den	+	
	-15 °C	1 týden	-	
	-10 °C	1 týden	+	
Teploty nad bodem mrazu	4 °C	> 1 rok	+	Archer et al. 1993
	15 °C	9 měsíců	+	Jenkins et al. 2003
	18 °C	> 6 týdnů	+	Freire-Santos et al. 1999
	45 °C	20 minut	-	Anderson 1985
	50 - 55 °C	5 minut	-	Blewett 1989
	60 °C	5 minut	-	Anderson 1985
	72,5 °C	1 minuta	-	Fayer 1994
	121 °C	10 minut	-	Archer et al. 1993

Závěr

Z výše uvedeného je zřejmé, že oocysty kryptosporidií, zejména střevních druhů (*C. parvum* je nejčastěji studovaný druh), jsou velmi dobře přizpůsobeny k dlouhodobému přežívání ve vnějším prostředí při současném zachování infekčnosti. Člověk se nejčastěji infikuje oocystami kryptosporidií kontaktem zvíře-člověk nebo člověk-člověk a pozřením kontaminovaného jídla nebo vody. Zdrojem infekce je nejčastěji kontaminovaná pitná voda. V mnohem menší míře byly jako zdroje lidských infekcí zjištěny nepasterizované mléko, jogurty, tepelně neupravené masné výrobky, zelenina nebo mošty. Kontaminované potraviny a voda uchovávané v chladničce představují velké riziko infekce (Smith 1993, Millard et al. 1994, Laberge et al. 1996).

Nejvýznamnější faktor ovlivňující životaschopnost a infektivitu oocyst je teplota a největšího inaktivačního účinku lze dosáhnou při teplotách pod $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nad $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ při dostatečné době expozice.

Dále z výzkumů vyplývá, že střevní druhy kryptosporidií jsou mnohem lépe přizpůsobeny k dlouhodobému přežívání v nepříznivých podmínkách vnějšího prostředí než druhy žaludeční. To je jedním z důvodů, proč jsou tyto druhy kryptosporidií nejčastější příčinou kryptosporidiózy u lidí.

Literatura u autorů