

„SPRÁVY KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE

ISSN 1335-8219
EV 2992/09

Ročník XI.
Číslo 3/2011

Časopis

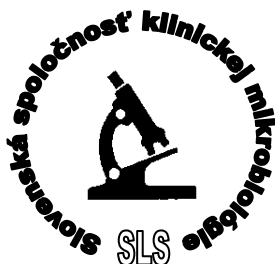
Slovenskej spoločnosti klinickej mikrobiológie

Slovenskej lekárskej spoločnosti

a

Sekcie klinickej mikrobiológie

Slovenskej lekárskej komory



Obsah:

- 1 Prihovor redakčnej rady
- 2-8 Akantamébová keratitída – infekcia amfizoickými meňavkami,
Mrva, M., Garajová, M, Ondriska, F.
- 9-15 Charakteristika výskytu mikrosporídií ako oportúnnych patogénov
u imunodeficientných pacientov, *Halánová, M., Čisláková, L.,
Valenčáková, A., Malčeková, B., Kalinová, Z., Pohorencová, A.*
- 16-24 Kryptosporidióza: u nás zriedkavá, ale závažná protozoárna
infekcia, *Valenčáková, A., Goldová, M., Halánová, M., Ravaszová,
P., Pohorencová, A.*

- 25-29 Zisťovanie prevalencie *Cryptosporidium* spp. u detí minoritnej skupiny obyvateľstva na východe Slovenskej republiky, *Ravaszová, P., Halánová, M., Goldová, M., Valenčáková, A., Pohorencová, A., Malčeková, B.*
- 30-34 Sérologická depistáž výskytu antimikrosporidiálnych protilátok u pacientov s rôznymi diagnózami, *Halánová, M., Čisláková, L., Adam, J.*
- 35-40 Skrining encefalitozoonózy u detí minoritnej populácie na východnom Slovensku *Malčeková, B., Valenčáková, A., Halánová, M., Luptáková, L., Ravaszová, P., Pohorencová, A.*
- 40 Oznam o presune odborného podujatia na SZU
- 41-52 Diagnostika *Pneumocystis jiroveci* v podmienkach rutinného laboratória, *Boldiš, V., Ondriska F., Kováč, L.*

Pokyny pre autorov :

Správy klinickej mikrobiológie uverejňujú pôvodné práce, metodické postupy, diskusné príspevky, informácie z odboru, správy a pod..

Príspevok píšete iba na jednej strane papiera na PC a zasielajte do redakcie e-mailom alebo poštou, v tom prípade aj v elektronickej verzii (CD, disketa). Píšete v slovenskom, českom, alebo anglickom jazyku, pôvodné práce v rozsahu najviac pätnásť strán formátu A5, v počítači typ písma Times New Roman, veľkosť 11, riadkovanie 1, zarovnanie do bloku (po oboch stranách). V rukopise používajte súvislý text bez predvolených odstavcov. Fotografickú dokumentáciu možno uverejniť až po jej schválení a posúdení v tlačiarni. Rukopis môže obsahovať prehľadné grafy a obrázky v čiernobielym prevedení. Príspevky musia byť stručné, štylisticky i jazykovo správne. Cudzí slová musia byť písané podľa slovníka cudzích slov. V nadpise autor uvedie plný názov pracoviska, z ktorého práca pochádza. Ak má práca viacerých autorov z viacerých pracovísk, uvedú sa všetci autori a všetky pracoviská. Citácie musia spĺňať požiadavky CSN 010197. Príspevky posielajte na adresu vedúceho redaktora alebo jeho zástupcu. Uveďte svoj e-mail, resp. telefón alebo fax, aby bola možná pružná komunikácia redakcie a autora. Pôvodné práce a prehľadné články (súborné referáty) sú recenzované. Všetky uverejnené príspevky sú nehonoranované.

SPRÁVY KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE

Vydávajú :

**Slovenská spoločnosť klinickej mikrobiológie,
Slovenskej lekárskej spoločnosti a
Sekcia klinickej mikrobiológie
Slovenskej lekárskej komory**

ako informačný bulletin pre svojich členov.

Redakčná rada :

doc. MUDr. Sylvia Bazovská, CSc., Bratislava

sylvia.bazovska@fmed.uniba.sk

RNDr. Jaroslav Bojňanský, Bratislava bojnansky@hpl.sk

MUDr. Rudolf Botek, Piešťany botek@laboratoria.sk

MUDr. Juraj Hanzen , Bratislava hanzen@hpl.sk

MUDr. Dušan Krkoška, CSc, Martin krkoska@mfn.sk

RNDr. D. Lacková, PhD, Levice dlackova@zoznam.sk

prof. MUDr. Anna Líšková, PhD, Nitra liskova@fnnitra.sk

doc. MUDr. Milan Nikš, CSc., Bratislava niks.m@gmx.at

doc. RNDr. František Ondriska, PhD, Bratislava ondriska@hpl.sk

MUDr. A. Petrovičová, CSc., Bratislava anna.petrovicova@szu.sk

RNDr. Martin Sojka, Bratislava martin.sojka1@gmail.com

Vedúci redaktor :

MUDr. A. Petrovičová, CSc., Bratislava

Zástupca vedúceho redaktora :

doc. MUDr. Milan Nikš CSc., Bratislava

Technický redaktor:

RNDr. Jaroslav Bojňanský, Bratislava

Adresa redakcie :

Oddelenie virológie

SZU, Limbová 12, 833 03 Bratislava

Vytlačila:

**Toto číslo bolo vydané s podporou
SEKCIE KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE
SLOVENSKEJ LEKÁRSKEJ KOMORY**

Príhovor redakčnej rady

Milí priatelia,

predkladáme Vám ďalšie číslo nášho časopisu. Je venované medicínsky významným prvkom. Ochorenia vyvolávané týmito agensmi obvykle (bohužiaľ) nestoja v popredí záujmu väčšiny klinických mikrobiológov, hoci – ako vyplýva z jednotlivých prezentovaných prác – nielen, že nie sú v súčasnosti ojedinelé, ale ich význam a výskyt aj v našich zemepisných podmienkach narastá. A rovnako narastajú naše možnosti kvalitne ich diagnostikovať. Domnievam sa preto, že uvítate túto problematiku a získate tak ďalšie potrebné poznatky pre svoju prácu.

Nadchádzajúce mesiace asi prinesú veľa nového do našej práce, ale o prijímaní nových zákonov resp. zmenách tých doterajších vás nevieme dostatočne aktuálne informovať, a to aj preto, že výroba časopisu od zadania do tlače po expedíciu je veľmi variabilná a nie je nami ovplyvniteľná. V auguste 2011 bol prijatý nový katalóg výkonov, ale zatiaľ je jeho použitie v praxi nejasné, nakoľko neobsahuje cenové relácie. Naviac zásadné pripomienky výboru SSKM k poslednej verzii katalógu neboli na MZ SR akceptované, nuž nám ostáva iba čakať, čo sa z toho vyklúje.

Aj tak vám všetkým prajem veľa elánu do práce, hodne úspechov a asi aj veľa trpezlivosti. No a krásne jesenné dni.

A. Petrovičová

Akantamébová keratitída – infekcia amfizoickými meňavkami

Martin Mrva¹, Mária Garajová¹, František Ondriska²

¹ Katedra zoológie, PRIF, Univerzita Komenského v Bratislave

² Oddelenie parazitológie, HPL s.r.o., Bratislava

Akantaméby (*Acanthamoeba* spp.) sú voľne žijúce jednobunkovce vyskytujúce sa v širokom spektre biotopov. Niektoré kmene (často termorezistentné) sú schopné invázie do tel živôčichov a človeka (1), pričom môžu spôsobovať až život ohrozujúce ochorenia: granulomatóznú amébovú encefalitídu (GAE), nazofaryngeálne a kutánne infekcie u imunosuprimovaných pacientov a bolestivé očné ochorenie akantamébovú keratitídu (AK) aj u imunokompetentných jedincov (3). Akantamébová keratitída (AK) je závažné ochorenie rohovky, prejavujúce sa silným devastujúcim zápalom ohrozujúcim zrak, ktoré bolo po prvý krát diagnostikované v sedemdesiatych rokoch minulého storočia vo Veľkej Británii a USA (5). Stúpajúci počet prípadov AK po celom svete je spôsobený najmä zvýšeným používaním kontaktných šošoviek a kozmopolitným výskytom akantaméb. V súčasnosti sa eviduje vyše 3000 prípadov prakticky z celého sveta (9).

Pôvodca ochorenia a jeho životný cyklus

V životnom cykle *Acanthamoeba* spp. rozlišujeme štádium trofozoita a cysty. Trofozoity veľké 10 – 40 µm sa vyznačujú nepravidelným a nestálym tvarom. Celý povrch bunky je pokrytý množstvom ihlicovitých akantopódií (3). V cytoplazme bývajú niekedy prítomné endosymbionty rôznych druhov patogénnych baktérií, napr. *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*. Akantaméby preto považujeme za ich významných rezervoárových hostiteľov a vektorov. Pri postupnom zhoršovaní

Prehľadové práce

životných podmienok trofozoity encystujú. Cysty s dvojvrstvovou stenou a veľkosťou okolo 10 – 20 μm sú vysoko rezistentné voči teplote, UV žiareniu a dezinfekčným zlúčeninám (6). Pri rýchlom nastúpení zhoršených životných podmienok môžu trofozoity prejsť do štádia pseudocysty, ktoré je odolné voči zriedeným roztokom niektorých organických rozpúšťadiel (4).

Termorezistentné kmene schopné množenia pri teplotách 37 °C a vyšších predstavujú riziko z epidemiologického hľadiska. Selektujú sa najmä v umelých biotopoch ako sú napr. bazény a kúpaliská so zvýšenou teplotou a v biotopoch silne zasiahnutých antropogénnou činnosťou (1,10).

Epidemiológia

Zdrojom infekcie pri korneálnej traume býva znečistenie poranenia kontaminovanou vodou s trofozoitmi akantaméb, prípadne prachom alebo pôdou s ich cystami (2). Za najčastejší spôsob infikovania rohovky sa však považuje zanesenie trofozoitov alebo cyst prostredníctvom kontaktných šošoviek z kontaminovaného úložného roztoku. Cysty akantaméb sú mimoriadne odolné voči dezinfekcii, chlórovaniu vody nepostačuje na ich elimináciu. Navyše, množstvo úložných roztokov na kontaktné šošovky má iba slabý cysticídny efekt a po dlhodobom používaní nemusí zabrániť excystácii akantaméb (12).

Infekciozita, patogenéza a imunita

AK bola zistená zväčša u imunokompetentných jedincov a nie je známa súvislosť s imunitným stavom pacienta. Adhéziu trofozoitov na epitel rohovky sprostredkuje manózu-viažúci proteín exprimovaný na pelikule trofozoita. Trofozoity invadujú do strómy, ktorú poškodzujú za vzniku zápalového procesu a stromálneho infiltrátu tvoreného polymorfonukleárnymi neutrofilmi. Fagocytujú

Prehľadové práce

hostiteľské bunky a proteolytickými enzýmami spôsobujú rozpad bunkových spojov (3). Prienik do hlbších vrstiev rohovky môže viesť až k jej perforácii. V ťažkých prípadoch môžu vyvolať neuritídu a nekrózu korneálnych nervov, zriedkavo až chorioretinitídu.

Primárnu ochranu pred akantamébami zabezpečuje lyzozým, laktoferín a sekrečný IgA v slznom filme, ktorý pravdepodobne bráni adhézii trofozoitov. Možnú predispozíciu na ochorenie naznačuje signifikantne znížená hladina IgA v sére viacerých pacientov s AK. Trofozoity akantaméb sú rezistentné na komplementom sprostredkovanú lýzu. Predpokladá sa, že významnú úlohu v kontrolovaní AK zohrávajú aktivované makrofágy a neutrofilie lokalizované v rohovke a spojovke (6).

Klinické prejavy

Symptómy AK sú spočiatku nešpecifické a môžu pripomínať bakteriálnu, mykotickú či herpetickú keratitídu, za ktoré býva často zamieňaná. Skorým prejavom je bolesť oka (sú však známe aj zriedkavé prípady bez bolestivých prejavov), nadmerné slzenie, fotofóbia, edém očných viečok. Bolesť sa postupne výrazne stupňuje, vzniká silný zápal rohovky a konjunktívna hyperémia. V stróme rohovky sa vytvára prstencovitý alebo menej často parciálny paracentrálny infiltrát tvaru polmesiaca alebo pásika, spôsobujúci nepriehľadnosť rohovky a zhoršenie vízu (2,7,11). Ďalším príznakom je absces v stróme, anteriórna uveitída a v ťažkých prípadoch perforácia strómy a skleritída. Pri neliečení hrozí oslepnutie. Ochorenie je unilaterálne, len veľmi zriedkavo sú napadnuté obe oči. Doposiaľ neboli opísané žiadne prípady, kde by sa ochorenie rozšírilo až do CNS (6).

Prehľadové práce

Diagnostika

Diagnostika je zväčša založená na rozpoznaní symptómov a priamom alebo kultivačnom dôkaze meňaviek z napadnutých tkanív (potrebný je korneálny zoškrab) alebo puzdier na kontaktné šošovky. Nepriama imunofluorescenčná metóda dôkazu akantaméb z korneálnych zoškrabov je považovaná za jednoduchý a veľmi presný spôsob diagnostiky. Rýchly a spoľahlivý výsledok sa dá dosiahnuť aj využitím polymerázovej reťazovej reakcie (PCR).

V klinickej praxi je možné neinvasívne vyšetrenie rohovky tandemovým konfokálnym mikroskopom (10). Sérologické metódy nepodávajú spoľahlivé výsledky kvôli častej prítomnosti protilátok proti akantamébam u zdravej populácie (11).

Liečba AK

Včasné diagnostikovanie AK a okamžité intenzívne nasadenie terapeutík zväčša zohráva veľkú úlohu v úspešnosti liečby. Doposiaľ je však terapia nejednotná, dlhodobá a viackrát aj zlyhala. K najviac osvedčeným liečivám s topickou aplikáciou na rohovku patrí u nás nedostupný propamidín izotionát, hexamidín, chlórhexidín, polyhexametylén biguanid, neomycín, neosporín a azoly (itakonazol, ketokonazol) (2). Vysoká odolnosť cýst akantaméb vyžaduje intenzívnu a dlhodobú terapiu, často v trvaní niekoľkých mesiacov. Pri ťažkých prípadoch, zväčša zapríčinených neskorým diagnostikovaním alebo neúčinnou liečbou, je nutná transplantácia rohovky, prípadne enukleácia očného bulbu (7,8).

Preventívne opatrenia

Pri poranení rohovky je potrebné sa vyhýbať možnostiam kontaminácie z vodných zdrojov (napr. bazény) a pôdy, kde sa akantaméby, odolné na mnohé dezinfekčné prostriedky, bežne vyskytujú.

Prehľadové práce

Používatelia kontaktných šošoviek môžu predísť infekcii dodržiavaním základnej hygieny. Kontaktné šošovky je nutné aplikovať čistými rukami, neumývať ich vo vodovodnej vode, treba pravidelne vymieňať úložný roztok a dezinfikovať puzdrá kontaktných šošoviek (napr. peroxidom vodíka). Je potrebné vyhýbať sa používaniu kontaktných šošoviek počas plávania a kúpania sa v prírodných kúpaliskách, v mori ako aj bazénoch (6).

Situácia na Slovensku

Na Slovensku býva AK diagnostikovaná len sporadicky a prvých päť prípadov akantamébovej keratitídy na Slovensku bolo zdokumentovaných iba nedávno (7,8). V prvom prípade bola infekcia zrejme výsledkom kontaminácie poranenia oka vodou z prírodnej studničky. Pôvodca infekcie bol identifikovaný neskoro, ani následná transplantácia rohovky stav nezlepšila a oko bolo nutné enukleovať. V štyroch ďalších prípadoch boli infikovaní používatelia kontaktných šošoviek, ktoré používali aj pri plávaní v kúpaliskách, bazénoch či dokonca v mori. Aplikáciou propamidín izotionátu a ďalších liečiv ako aj transplantáciou rohovky sa podarilo stav pacientov zlepšiť. V súčasnosti sú evidované štyri ďalšie prípady súvisiace s používaním kontaktných šošoviek.

Vzhľadom k spojitosti prípadov AK s rekreačnými vodnými zdrojmi a nedávnomu zisteniu vysokého percentuálneho zastúpenia meňaviek rodu *Acanthamoeba* v kúpaliskových vodách a bazénoch je potrebný ich zvýšený monitoring (10). Nízky počet diagnostikovaných akantamébových infekcií na našom území a absenciu zaznamenania prípadov GAE a kožných infekcií je možné spojiť s nízkym počtom domácich bazénov na celkový počet obyvateľov, nízkym počtom HIV pacientov, ale aj nedostatočnou informovanosťou lekárov.

Použitá literatúra

1. De Jonckheere J.F. (1991): Ecology of *Acanthamoeba*. Rev. Infect. Dis. 13: 385-387.
2. Filipec M., Záhlava J., Nohýnková E. (2005): Akantamebová keratitída. Čes. a Slov. Oftal. 61: 132-140.
3. Khan N.A. (2009): *Acanthamoeba*, biology and pathogenesis. Caister Academic Press, Norfolk.
4. Klieščiková J., Kulda J., Nohýnková E. (2011): Stress-induced pseudocyst formation – a newly identified mechanism of protection against organic solvents in acanthamoebae of the T4 genotype. Protist 162: 58-69.
5. Marciano-Cabral F., Cabral G.A. (2003): *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin. Microbiol. Rev. 16: 273-307.
6. Mrva M. (2010): Infekcie voľne žijúcimi meňavkami. Pp. C3.20. 1-48. In: Holečková K., Ondriska F., Ondrušová A., Šišková L. (ed.): Cestovná medicína v praxi. J. Raabe, Bratislava.
7. Ondriska F., Mrva M., Lichvár M., Žiak P., Murgašová Z., Bieliková A., Gablasová K., Nohýnková E. (2006): Akantamébová keratitída – novoobjavená humánna parazitóza na Slovensku. Pp. 46-48. In: Furková K. (ed.): Novinky v pediatrii III. Herba, Bratislava.
8. Ondriska F., Mrva M., Lichvár M., Žiak P., Murgašová Z., Nohýnková D. (2004): First cases of *Acanthamoeba* keratitis in Slovakia. Ann. Agric. Environ. Med. 11: 335-341.
9. Schuster F.L., Visvesvara G.S. (2004): Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int. J. Parasitol. 34: 1001-1027.
10. Trnková K., Bieliková A., Izák M., Klement C. (2009): Diagnostika akantamébovej keratitídy. Čes. a Slov. Oftal. 65: 155-160.
11. Visvesvara G.S., Schuster F.L. (2008): Opportunistic free-living amebae, Part I. Clin. Microbiol. News. 30: 151-158.

12. Zanetti S., Fiori P.L., Pinna A., Usai S., Carta F., Fadda G. (1995): Susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to contact lens disinfecting solutions. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1596-1598.

Charakteristika výskytu mikrosporídií ako oportúnnych patogénov u imunodeficientných pacientov

Halánová, M.¹, Čisláková, L.¹, Valenčáková, A.², Malčeková, B.², Kalinová, Z.¹, Pohorencová, A.¹

¹Ústav verejného zdravotníctva, UPJŠ, Lekárska fakulta, Šrobárova 2, 041 80 Košice

²Katedra biológie a genetiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 041 81 Košice

Rovnováha medzi vnímavým hositeľom a mikroorganizmami či už patogénnymi, podmienené patogénnymi alebo nepatogénnymi, v priebehu života kolíše a musí byť neustále obnovovaná za účasti oboch partnerov. Medzi mikroorganizmy, ktoré majú úzky vzťah k hositeľovi, využívajú ho ako prostredie pre svoje množenie a svojím pôsobením vyvolávajú ochorenia niekedy až so smrteľným koncom patria aj oportúnne patogény, ktoré sú schopné byť pôvodcami ochorení len v prípade, ak sú prirodzené obranné mechanizmy poškodené (poranenia kože, poškodenie slizníc, porucha fyziologických dejov) a funkcia imunitného systému je znížená v dôsledku dysfunkcie jednej alebo viacerých jeho zložiek.

Význam oportúnnych infekcií sa v súčasnosti zvyšuje v dôsledku stúpajúceho počtu HIV pozitívnych pacientov, pacientov s AIDS, ako aj ďalších osôb s narušeným imunitným systémom, či už v dôsledku primárnej alebo sekundárnej imunodeficiencie. V spomínanej skupine pacientov sa ako pôvodcovia oportúnnych infekcií s perzistujúcimi hnačkami a systémovými infekciami popisujú aj mikrosporídie, taxonomicky radené do ríše *Fungi*, kmeňa *Microsporidia* a radu *Microsporida* (1).

Prehľadové práce

Prvý zdokumentovaný prípad infekcie spojenej s mikrosporídiami sa v humánnej populácii datuje až v roku 1959 (2). Aj po tomto období boli mikrosporídie v humánnej populácii identifikované len sporadicky. Zlom nastal po vypuknutí AIDS pandémie, keď sa situácia v ich výskyte prudko zmenila, a mikrosporídie sa začali opisovať ako pôvodcovia oportúnnych ochorení spojených s hnačkami a systémovými infekciami najmä u HIV pozitívnych pacientov a pacientov s AIDS. Medznikom sa stal rok 1985, kedy sa prvýkrát detegoval *Enterocytozoon bieneusi* u HIV pozitívneho pacienta. So zvyšujúcim sa počtom HIV pozitívnych pacientov a pacientov s AIDS sa identifikovali nové druhy mikrosporídií. Súčasne sa rozvíjali aj ďalšie diagnostické metódy. V sérologických testoch sa začali používať aj antigény iných druhov mikrosporídií, ktoré sa dali kultivovať v laboratórnych podmienkach. Postupne sa vylepšovali aj imunohistochemické metódy a zaviedli sa molekulárne metódy (PCR), pomocou ktorých sa priamo identifikovali jednotlivé druhy. Mikrosporídie boli postupne detegované aj u HIV negatívnych osôb, najčastejšie u pacientov po orgánových transplantáciách (3, 4), u cestovateľov (5), u nositeľov kontaktných šošoviek (6) a vo zvýšenej miere aj u detí (7, 8) a starších ľudí (9).

Klinický priebeh mikrosporidiózy závisí od troch dôležitých faktorov:

- **Imunitného stavu infikovaného jedinca**

Mikrosporídie sú považované vo všeobecnosti za málo virulentné patogény, ktoré sú účinne regulované imunitnými mechanizmami s dominantnou úlohou bunkovej imunity. Pri vstupe infekčného agens napríklad dýchacím traktom majú pľúcne makrofágy primárnu úlohu pri likvidácii inhalovaných buniek. Makrofágy pochádzajú z kostnej drene, z kmeňovej bunky monoblastu a pod vplyvom rastového faktoru CSF sa diferencujú na promonocyty. Tie sa diferencujú na monocyty, ktoré sa dostávajú do krvného obehu a po troch dňoch opúšťajú krvné riečište a usídľujú sa v tkanivách, kde sa diferencujú na makrofágy.

Aj nepatrný defekt fagocytárnej funkcie môže viesť k diseminovaným infekciám, čo sa stáva práve v prípade HIV pozitívnych pacientov, pacientov s AIDS a imunodeficientných pacientov. Špecifickú imunitnú odpoveď zabezpečujú dva druhy buniek: T-lymfocyty, zodpovedajúce za odpoveď sprostredkovanú bunkami a B-lymfocyty zodpovedné za protilátkovú odpoveď. Mikrosporídiová infekcia aktivuje produkciu protilátok v organizme hostiteľa a ich perzistencia sa môže prejaviť v latentnom štádiu ochorenia. Špecifické protilátky proti mikrosporídiovým antigénom, ktoré sú produkované B-lymfocytmi majú v rezistencii dôležitú úlohu, ale osamotené nedokážu zabezpečiť imunitnú bariéru a ochrániť hostiteľa pred ochorením.

U imunologicky kompetentných jedincov sa klinické príznaky prejavujú veľmi zriedkavo. Množenie patogéna a následná perzistentná produkcia protilátok sú v rovnováhe, čo spôsobuje latentné asymptomatické ochorenie. K rozvoju klinických príznakov tak dochádza obvykle len v prípade poškodenia alebo zlyhania imunitného systému. Ak aj dôjde k prepuknutiu ochorenia, toto je charakterizované ako ľahká akútna infekcia, ktorá neskôr ustúpi ale môže perzistovať ako chronická, latentná infekcia.

- **Miesta infekcie**

Mikrosporídiové infekcie postihujú najviac tráviaci trakt, hlavne tenké črevo, pečeň a žlčník. Infekcia rohovky sa prejavuje keratitídou a keratokonjunktivitídou. Ochorenia prínosových dutín charakterizuje sinusitída s pridruženou rinitídou. A v neposlednom rade sú to diseminované infekcie spôsobujúce hostiteľovi bronchitídu a nefritídu.

- **Druhu mikrosporídie**

Medzi najčastejších vyvolávateľov mikrosporídiových infekcií u ľudí patria *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem* a *Encephalitozoon cuniculi*.

Prehľadové práce

Enterocytozoon bieneusi patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúcu mikrosporídiu v humánnej populácii. Predpokladá sa, že k prenosu nákazy dochádza fekálno-orálnou, orálno-orálnou alebo inhalačnou cestou. K infekcii však môže dôjsť aj priamym kontaktom, kde sa ako významný rizikový faktor udávajú homosexuálne praktiky u HIV pozitívnych mužov, ktoré sa dávajú do priameho súvisu so vznikom intestinálnej mikrosporidiózy (10). Vo všeobecnosti sa za rizikové faktory okrem homosexuality považuje aj intravenózna aplikácia drog a expozícia kontaminovanou vodou v bazénoch (10, 11). Po ingestii sa spóry dostávajú cez duodenum, jejunum až do epiteliálnych buniek tenkého čreva – enterocytov a hostiteľovi spôsobuje chronickú hnačku, bolesti brucha a chudnutie. Hostiteľmi sú najčastejšie imunodeficientní pacienti, pacienti s AIDS s počtom CD4+ T lymfocytov pod 100 na mikroliter krvi (12). V ojedinelých prípadoch *E. bieneusi* spôsobuje pľúcne infekcie, cholecystitídy a cholangitídy. U zdravých jedincov, ako napríklad u cestovateľov, spôsobuje hnačku s dĺžkou trvania do jedného mesiaca (13).

Infekcia vyvolaná *Encephalitozoon intestinalis* je charakterizovaná klinickými príznakmi zahrňujúcimi chronickú hnačku sprevádzanú horúčkou, stratou chuti do jedla, chudnutím a celkovým chradnutím organizmu. Výskyt tohto patogéna je celosvetový, pomerne často sa opisuje ako etiologický agens chronickej diarhoe u AIDS pacientov.

Encephalitozoon cuniculi je podobne ako predchádzajúce dva druhy rozšírený celosvetovo. Najčastejšie sú infikovaní pacienti s HIV infekciou, pacienti po orgánových transplantáciách alebo pacienti s idiopatickou CD4+ lymfocytopeniou.

Encephalitozoon hellem je rozšírený len obmedzene a doposiaľ nie je jasné, či sú za to zodpovedné epidemiologické faktory, alebo je príčinou jeho relatívne náročná identifikácia imunologickými a molekulárnymi metódami.

Prehľadové práce

Vo všeobecnosti sa klinické príznaky mikrosporidiózy objavujú po uplynutí rôzne dlhého času a ich spektrum je široké. Jedným z ich najčastejších klinických prejavov je postihnutie gastrointestinálneho systému charakterizované hnačkou, ale opisujú sa aj encefalitídy, očné infekcie, sinusitídy, myozitídy a diseminované infekcie.

Podľa klinickej formy rozlišujeme:

- akútnu infekciu,
- chronickú asymptomatickú infekciu,
- chronickú symptomatickú infekciu.

Inkubačná doba závisí od vstupnej brány infekcie a od zdravotného stavu postihnutého jedinca. Zatiaľ čo u pacientov s poškodeným imunitným systémom predstavujú mikrosporídie významnú skupinu oportúnnych patogénov, u imunokompetentných jedincov ide o celkom ojedinelé prípady.

Ako oportúnna nákaza sa mikrosporidióza okrem HIV pozitívnych pacientov vyskytuje aj u pacientov po transplantáciách tkanív. Z hľadiska rizika vzniku infekcie sa u nich potransplantačné obdobie orientačne delí do troch časovo ohraničených etáp:

- 1. etapa – do 30-tich dní od transplantácie,
- 2. etapa – 2.- 4. mesiac,
- 3. etapa – 5.- 12. mesiac.

Výskyt infekcií je u všetkých recipientov transplantovaných tkanív všeobecne vysoký, no charakter infekcie, jej vážnosť a letalita sa výrazne menia v závislosti od transplantovaného orgánu. Mykotické nákazy, medzi ktoré sa v súčasnosti radia aj mikrosporídie sa objavujú najčastejšie v 1. a 2. mesiaci po transplantácii, po 6. mesiaci sa vyskytujú už len sporadicky (14).

Použitá literatúra

1. <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1390>
2. Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, I., Takei, H., Hagiwara, S.: A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Archiv. Pathol.*, 1959, 67, 181-187.
3. Mohindra, A.R., Lee, M.W., Visvesvara, G., Moura, H., Parasuraman, R., Leitch, G.J., Xiao, L., Yee, J., del Busto, R.: Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. *Transplant. Infect. Dis.*, 2002, 4, 102-107.
4. Latib, M.A., Pascoe, M.D., Duffield, M.S., Kahn, D.: Microsporidiosis in the graft of a renal transplant recipient. *Transplant. Int.*, 2001, 14, 274-277.
5. Müller, A., Bialek, R., Kamper, A., Fatkenheuer, G., Salzberger, B., Franzen, C.: Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39, 1630-1632.
6. Rauz, S., Tuft, S., Dart, J.K., Bonshek, R., Luthert, P., Curry, A.: Ultrastructural examination of two cases of stromal microsporidial keratitis. *J. Med. Microbiol.*, 2004, 53, 775-781.
7. Desportes-Livage, I., Doumbo, O., Pichard, E., Hilmarsdottir, I., Traore, H.A., Maiga, I.I., El Fakhry, Y., Dolo, A.: Microsporidiosis in HIV-seronegative patients in Mali. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1998, 92, 423-424.
8. Tumwine, J.K., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Akiyoshi, D.E., Buckholt, M.A., Tzipori, S.: *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 2002, 67, 299-303.
9. Lores, B., Lopez-Miragaya, I., Arias, C., Fenoy, S., Torres, J., del Aguila, C.: Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. *Clin. Infect. Dis.*, 2002, 34, 918-921.
10. Hutin, Y.J., Sombardier, M. N. , Liguory, O., Sarfati, C., Derouin, F., Modai, J., Molina, J.M.: Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection. A case control study. *J. Infect. Dis.* 1998, 178, 904-907.

Prehľadové práce

11. Deplazes, P., Mathis, A., Weber R.: Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contib. Microbiol.*, 2000, 6, 236-260.
12. Kotler, D.P., Orenstein, J.M.: Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv. Parasitol.*, 1998, 40, 321 – 349.
13. Okhuysen, P.C.: Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 1, 110-114.
14. Bálint, O.: Infekcie u kompromitovaného pacienta. In: *Infektológia a antiinfekčná terapia*. Bálint (Ed.), Osveta, Martin, 2000, 376.

Práca bola riešená v rámci grantov VEGA MŠ SR č.1/0412/09, č. 1/0108/10, č. 1/0271/11.

Kryptosporidióza: u nás zriedkavá, ale závažná protozoárna infekcia

Valenčáková, A.¹, Goldová, M.¹, Halánová, M.², Ravaszová, P.¹, Pohorencová, A.²

¹ Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 04181 Košice

² Ústav verejného zdravotníctva, Lekárska fakulta UPJŠ, Šrobárova 2, 041 80 Košice

Úvod

Kryptosporidióza je gastrointestinálne ochorenie spôsobené prvokom rodu *Cryptosporidium*. Infikovaní jedinci vykazujú široké spektrum klinických príznakov, ale patogenita kryptosporidiových infekcií varíruje podľa druhu parazita, a závisí od typu, veku a imunitného stavu hostiteľa (4).

Mnoho kryptosporidiálnych druhov a genotypov bolo nájdených v domácich i voľne žijúcich zvieratách, a počet druhov a genotypov infikujúcich ľudí sa neustále zvyšuje. Najväčším problémom v pochopení prenosu kryptosporidiózy je nedostatok morfológických vlastností, ktoré by jasne odlišovali jednotlivé druhy kryptosporidií (19). Revízia taxonómie druhov z rodu *Cryptosporidium*, ktorá prebiehala v súčasnosti, bude preto nápomocná pri pochopení biológie, epidemiológie a dôležitosti *Cryptosporidium* spp. pri ochrane verejného zdravia.

Taxonómia

Taxonómia kryptosporídií je stále nedokonalá a neustále prechádza zmenami. Zatiaľ čo sú kryptosporídie klasifikované v rámci kokcidií, niektoré štúdie preukázali, že sú príbuzné skôr s gregarinami, ako s kokcidiami (17). Preto by bolo vhodnejšie ich zatriediť takto: *Cryptosporidium* spp. patrí do kmeňa Apicomplexa (= Sporozoa), ktorých predstavitelia majú apikálny komplex, trieda Sporozoa, ktorých predstavitelia sa reprodukovávajú asexuálnymi a sexuálnymi cyklami, podtrieda Coccidia, ktorých životný cyklus zahŕňa merogóniu, gametogóniu a sporogóniu, rad Eucoccidiida (= Eucoccidiorida), u ktorých sa vyskytuje schizogónia, podrad Eimeriina (Eimeriorina), u ktorých sa vyvinula nezávislá mikro- a makrogamia, čeľaď *Cryptosporidiidae*, ktorých predstavitelia majú štyri sporozoity uložené v oocyste, nie je vytvorená sporocysta.

Unikátnou vlastnosťou, ktorá odlišuje *Cryptosporidium* spp. od ostatných kokcidií je parazitovanie v rámci hostiteľskej bunkovej membrány, tzv. intracelulárna extracytoplazmatická lokalizácia, ich schopnosť autoinfekcie a ich rezistencia na akékoľvek antiparazitárne látky.

V ostatných rokoch molekulová charakteristika kryptosporídií pomohla objasniť nejasnosti v ich taxonómii. Boli pomenované niektoré nové druhy kryptosporídií: *C. andersoni* u dobytky, *C. canis* u psov, *C. hominis* u ľudí a *C. molnari* u rýb, za použitia nielen morfológie, ale aj vývojovej biológie, hostiteľskej špecificity, histopatológie a molekulovej biológie (2,7,9).

Prehľadové práce

Okrem nových druhov existuje takmer 61 kryptosporidiálnych genotypov s neistým druhovým statusom, ktoré boli objavené na základe SSU rRNA sekvencií. GP 60 gén preukázal vysoký stupeň sekvenčného polymorfizmu u izolátov kryptosporidií.

Bolo identifikovaných niekoľko subtypových skupín a subgeno-tyпов, z ktorých *C. parvum* IIa a IIb subtypové skupiny sú zoonotické. Bolo preukázané, že osem druhov kryptosporidií je schopných infikovať človeka a okrem týchto ôsmich druhov existuje ešte sedem nezvyčajných genotypov kryptosporidií, ktoré boli identifikované u pacientov s hnačkou, čo poukazuje na fakt, že genotypy zohrávajú významnú úlohu pri kryptosporidióze u ľudí (12,20).

Vývinový cyklus

Biologický cyklus kryptosporidií je jednohostiteľský a skladá sa z troch fáz: schizogónia, gamogónia a sporogónia. Po ingescii parazita hostiteľom dochádza v tenkom čreve cicavcov k excystácii, pričom sporozoity sú uvoľnené do lúmena čreva a osídľujú epiteliálne bunky gastrointestinálneho traktu hostiteľa. Na rozdiel od kokcií (11) sa nevnoria do cytoplazmy, ale zostávajú inkorporované intracelulárne extracytoplazmaticky. Sporozoity sa menia na trofozoity a sú uzavreté v parazitofornej vakuole v enterocytoch mikroklkov. Jadro trofozoita sa delí a dochádza k asexuálnemu množeniu - schizogónii. Pri druhu *C. parvum* existujú dva typy merontov: meront typu I (vytvára 8 merozoitov) a typu II (vytvára 4 merozoity). Merozoity z meronta typu I sa ďalej množia asexuálne, zatiaľ čo merozoity z meronta typu II vstupujú do sexuálnej fázy – gametogonie, pri ktorej sú produkované mikrogaméty a makrogaméty.

Prehľadové práce

Po fertilizácii makro-gamét mikrogametami sa vyvíja oocysta, ktorá sporuluje v infikovanom hostiteľovi. Vznikajú dva druhy oocýst: 80 % tvoria hrubostenné, ktoré sa exkrétni po sporogónii dostávajú do vonkajšieho prostredia a tenkostenné, ktoré sa primárne podieľajú na autoinfekcii (14).

Epidemiológia

Prvé prípady kryptosporidiózy u ľudí boli zaznamenané v roku 1976 (8) a ďalšie boli hlásené zriedkavo až pokiaľ nebolo zistené, že *Cryptosporidium* (podľa terajších zistení *C. parvum*) môže spôsobovať život ohrozujúce ochorenie podobné cholere u pacientov s nedostatočnou imunitou, obzvlášť u osôb s AIDS (1). Najčastejšie kryptosporídie zodpovedné za 90% hlásených infekcií u ľudí, sú *C. parvum* a *C. hominis* (3). Ďalšie druhy označené ako ľudské patogény sú *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, a králičí *Cryptosporidium* genotyp (3). Každý z týchto druhov bol špecifický pre morky, psy, mačky, králiky. Tiež boli hlásené náhodné nálezy u ľudí *C. muris*, *C. andersoni*, *C. suis*, *C. hominis* opičí genotyp, *C. parvum* myší genotyp a *Cryptosporidium* jelení (W4), Chipmunk I (W17), skunk genotypy a konský genotyp (20). Patogenita týchto pôvodcov a genotypov u človeka zostáva nejasná.

V priebehu rokov 1995-2007 sa celkový počet hlásených prípadov kryptosporidiózy napr. v USA zvýšil z 2972 v roku 1995 až na 11657 pre rok 2007. Výskyt dramaticky vzrástol od roku 2005 a pokračoval po celý rok 2007 (4 prípady na 100.000 obyvateľov).

V krajinách Európy sa infekcia spôsobená *C. parvum* a *C. hominis* opisuje prevažne v spojitosti s kontaminovanou vodou a posledné hlásené prípady boli u švédskych detí cestovateľov do Turecka v roku 2008 (21).

Prehľadové práce

Na Slovensku *C. hominis* bol po prvýkrát diagnostikovaný v roku 2009 u dvoch detí, z ktorých len 7 ročný chlapec vykazoval klinické príznaky ochorenia (10).

Klinické prejavy

Klinické prejavy kryptosporidiózy u imunokompetentných jedincov sa líši podľa lokalizácie v hostiteľovi a podľa druhu kryptosporídie. U väčšiny črevných druhov (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. canis* atď.), ktoré sú lokalizované prevažne v tenkom čreve, je klinickým príznakom vodnatá hnačka, ktorá môže byť sprevádzaná kŕčmi brucha, stratou chuti do jedla, zvýšenou teplotou, nevoľnosťou, vracaním, slabosťou, únavou, nechutenstvom, zimnicou a zvýšeným potením so stratou hmotnosti, avšak aj bezpríznakové infekcie sa často vyskytujú (3).

Kryptosporidióza spôsobená žalúdočnými druhmi má vo väčšine prípadov asymptomatický priebeh, iba v niekoľkých prípadoch boli opísané klinické príznaky spojené s anorexiou a úbytkom hmotnosti (13). U imunodeficientných jedincov je priebeh kryptosporidiózy odlišný. Ochorenie je chronické, často diseminuje do ďalších orgánov (celý gastrointestinálny trakt, močový mechúr, žľčovody, slinivka, dýchací trakt).

Diagnostika

Na identifikáciu oocýst kryptosporídií pod svetelným mikroskopom bolo vyvinutých niekoľko farbiacich techník, ako napríklad dimetyl-sulfoxid-carbol fuchsinové farbenie, Kinyoun, safranin-metylénová modrá, modifikované Ziehl-Neelsen farbenie a iné. Okrem týchto priamych farbiacich metód existujú aj negatívne farbiace metódy, ktoré zafarbí materiál v pozadí na sklíčku a kryptosporídie ostávajú nezafarbené.

Prehľadové práce

Pre všetky farbivé metódy je však typické, že sú časovo náročné, poskytujú nízku špecificitu a citlivosť (15).

Imunologické metódy poskytujú niekoľko výhod pri detekcii oocýst kryptosporídií oproti svetelnej mikroskopii. Relatívne vysokú špecificitu (96 – 100 %) a citlivosť (98,5 – 100 %) preukázali fluorescenčná mikroskopia a priamy fluorescenčný test protilátok (direct fluorescent antibody assay – DFA), pri ktorých sa používajú anti-*Cryptosporidium* monoklonálne protilátky konjugované s fluoresceín-izotiokyanátom (FITC-C-mAb), rozoznávajúce povrchové epitopy oocýst (18).

Ďalším diagnostickým prístupom je detekcia tzv. koproantigénov vo vzorkách trusu. V dnešnej dobe je dostupných niekoľko ELISA a imunochromografických (IC) testov, ktoré majú pomerne vysokú (98 – 100 %) špecificitu, aj keď senzitivita detekcie koproantigénu môže byť pri týchto postupoch nižšia, ako u mnohých iných mikroskopických metód (16).

V ostatnej dekáde bolo vyvinutých množstvo molekulovo-biologických techník na detekciu a diferenciaciu kryptosporídií na druhovej/genotypovej a subtypovej úrovni. Patria sem rôzne typy PCR metódy (Nested PCR, PCR-RFLP, RTPCR-HRM, Multiplex PCR až po DNA Microarray). Tieto metódy sú dnes v značnej miere využívané pri epidemiologických štúdiách kryptosporidiózy v endemických oblastiach, čo výrazne zlepšuje naše chápanie prenosu kryptosporidiózy u ľudí aj zvierat (5).

Terapia

Pri imunokompetentných pacientoch sa používa symptomatická liečba, predovšetkým rehydratácia organizmu. O špecifickej terapii sa síce občas diskutuje, ale doposiaľ spoľahlivá špecifická liečba neexistuje a v dobe stanovenia diagnózy väčšinou už príznaky ochorenia samovoľne pominú. Je niekoľko málo informácií o použití nitazoxanidu, avšak bolo použitých už viacero sľubných prípravkov no s neuspokojivým výsledkom.

Iná situácia je u imunodeficitných pacientov napr. HIV infikovaných pacientov, kde sa osvedčila vysoko aktívna antiretrovírusová (HAART) terapia (6).

Použitá literatúra

1. Current, W.L., Upton, S., Haynes, T.B.: The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. J. Protozoology, 1986, 33, 289-296.
2. Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lal, A.A., Dubey, J.P.: *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. J. Protozoology, 2001, 87, 1415-1422.
3. Huang, D.B., White, A.C.: An updated review on *Cryptosporidium* and *Gardia*. Gastroenterol. Clin. North. Am. 2006, 35(2), 291-314.
4. Chen, X.M., Keithly, J.S., Paya, C.V., LaRusso, N.F.: Cryptosporidiosis, N. Engl. J. Med., 2002, 346, 1723-31.
5. Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E., Gasser, R.B.: *Cryptosporidium*—biotechnological advances in the detection, diagnosis a analysis of genetic variation. Biotechnology Advances, 2008, 26, 304-317.
6. Kaplan, J.E., Jones, J.L., Dykewicz, C.A.: Protists as opportunistic pathogens: Public health impact in the 1990s and beyond. J. Eukaryot. Microbiol, 2000, 47(1), 15-20.

Prehľadové práce

7. Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L.: *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. J. Eukaryot. Microbiol., 2000, 47, 91–95.
8. Meisel, J.L.: Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology, 1976, 70, 1156-1160.
9. Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., et al.: *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from *Homo sapiens*. J. Eukaryot. Microbiol. 2002, 49, 433-40.
10. Ondriska, F., Vrabcová, I., Brindáková, S., Ditrich, O., Boldiš, V., Bastlová, M., Kváč, M.: Prvé prípady humánnej kryptosporidiózy spôsobenej druhom *Cryptosporidium hominis* v SR. Zborník abstraktov: IX. Slovenské a české parazitologické dni, Liptovský Ján, Máj, 2010, s.60.
11. Ortega, Y.R., Nagle, R., Gilman, R.H., Watanabe, J., Miyagui, J., Quispe, H., Kanagusuku, P., Roxas, C., Sterling, C.R.: Pathologic and clinical findings in 26 patients with cyclosporiasis and a description of intracellular parasite life-cycle. J. Infect. Dis., 1997, 176, 1584-1589.
12. Plutzer, J., Karanis, P.: Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. Vet. Parasitol., 2009, 165, 187-199.
13. Pospichil, A., Stiglmeier-Herb, M.T., Hegel, G., Wiener, H.: Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazells. Vet. Rec., 1987, 112, 379-380.
14. Putignani, L., Menichella, D.: Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. Interdiscip Perspect. Infect. Dis., 2010. pii: 753512. Epub 2010 Jul 14.
15. Quintero-Betancourt, W., Gennaccaro, A.L., Scottm T.M.: Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts a *Giardia* cysts in reclaimed effluents App. Envir. Microbiol., 2003, 69, 5380-5388.

Prehľadové práce

16. Rimhanen-Finne. R., Enemark, H.L., Kolehmainen, J., Toropainen, P., Hanninen, M.L.: Evaluation of immunofluorescence microscopy and Enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.*, 2007, 145, 345-348.
17. Rosales, M.J., Cordon, G.P., Moreno, M.S., Sanchez, C.M., Mascaro, C.: Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Tropica*, 2005, 95, 74-78.
18. Smith, H.V., Campbell, B.M., Grimason, A.M.: Comments on research note. *Water Research*, 2003, 37, 2525-2527.
19. Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J.: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, 17, 72-97.
20. Xiao, L., Ryan, U.: Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2004, 17, 483-90.
21. <http://www.szu.cz/tema/prevence/kryptosporidioza-u-svedskych-cestovateluu-do-turecka>

Práca bola riešená v rámci grantov VEGA MŠ SR č. 1/0108/10, č. 1/0144/10, č. 1/0271/11.

Zisťovanie prevalencie *Cryptosporidium* spp. u detí minoritnej skupiny obyvateľstva na východe Slovenskej republiky

Ravaszová, P., Halánová¹, M., Goldová², M., Valenčáková, A., Pohorencová, A.¹, Malčeková, B.

Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

¹Ústav verejného zdravotníctva, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

²Ústav parazitológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Kryptosporidióza je častou príčinou hnačiek u ľudí, pričom niektoré skupiny ľudí sú obzvlášť predisponované. Kryptosporidiálne druhy infikujú široké spektrum zvierat a pre ubikvitárny výskyt kryptosporidiálnych oocýst v prostredí, môžu ľudia získať kryptosporidiálnu infekciu viacerými cestami [7]. Najčastejšie opisovanými cestami infekcie sú kontaminovaná voda a potraviny, aj keď infekčný potenciál kryptosporidiálnych oocýst vo vode pre človeka nie je ešte úplne objasnený.

V tejto práci bolo našim cieľom zamerať sa na deti minoritnej skupiny obyvateľstva, žijúcej na východnom Slovensku. Ide o skupinu Rómov, žijúcu zväčša v rómskych lokalitách, osadách, či getách úplne izolovanú od majoritnej spoločnosti a pohybujúcu sa na hranici alebo pod hranicou chudoby [4]. Špecifikom, zohrávajúcim veľkú úlohu v epidemiológii tejto minoritnej skupiny obyvateľstva, sú jej životné podmienky a hlavne hygienické návyky.

Zdrojom pitnej vody je častokrát jediná studňa pre všetkých obyvateľov, žijúcich v danej osade, pričom tieto studne nie sú pravidelne kontrolované a o prípadnej kontaminácii zdroja pitnej vody sa používatelia dozvedia až počas rozšírenej infekcie [4]. Ďalším faktorom, ovplyvňujúcim epidemiologický status danej minority sú ich nedostačujúce základné hygienické návyky a nedostatok zdravotnej starostlivosti.

Prehľadové práce

Fakt, že *C. hominis* už bol na Slovensku diagnostikovaný [3], poukazuje na nevyhnutnosť sledovania prevalencie kryptosporidiózy ako u ľudí, tak aj u možných prameňov infekcie (zvieratá, voda).

Materiál a metódy

Vzorky stolice 66 detí, rozdelených do troch vekových kategórií (1. kategória – deti do 1 roka, 2.kategória – deti od 1 do 5 rokov a 3. kategória – deti od 5 do 9 rokov), boli zozbierané na východnom Slovensku a uložené pri teplote 4 °C do vykonania analýzy. Tieto vzorky boli vyšetrené metódou sendvičovej ELISA, pričom bol použitý komerčne vyrábaný ELISA kit (Diagnostic automation, INC, Calabasas, CA) na detekciu kryptosporidiálnej infekcie, za použitia anti-*Cryptosporidium* protilátok, na zachytenie antigénu zo vzorky trusu. Druhá anti-*Cryptosporidium* protilátka, ktorá viaže zachytený antigén, je potom pridaná do zmesi, pričom reakcia je vizualizovaná pridaním protilátky proti druhej protilátke, ktorá je konjugovaná s peroxidázou a chromogénom tetrametylbenzidínom (TMB). Výsledkom väzby *Cryptosporidium* antigénov s anti-*Cryptosporidium* protilátkami je žlté zafarbenie, ktoré sa dá interpretovať vizuálne aj spektrofotometricky.

Absorbancia bola odčítavaná duálne pri 450/630 nm (ELISA Reader Opsys MR Thermo Labsystems). Za pozitívnu bola vzorka považovaná pri absorbancii 0,15 OD jednotiek a vyššej. Absorbancia nižšia, ako 0,15 OD jednotiek indikovala, že vzorka neobsahuje detegovateľnú úroveň kryptosporidiálneho antigénu.

Výsledky

Z celkového počtu 66 vzoriek bolo 28 vzoriek (42,4 %) pozitívnych. Najvyššie percento pozitívnych vzoriek bolo v kategórii detí mladších ako jeden rok (48,1 %) (Tab. č. 1).

Prehľadové práce

Tab. č. 1: Počet vzoriek podľa vekových skupín

Veková kategória	Počet vzoriek	Pozitívne vzorky	% pozitívnych vzoriek
<1rok	27	13	48,1
1-5 rokov	21	7	33,3
6-9 rokov	18	8	44,4
Spolu	66	28	42,4

Diskusia

V rozvojových krajinách sa kryptosporídióvé infekcie vyskytujú hlavne u detí mladších ako päť rokov. Deti môžu mať opakujúce sa epizódy kryptosporidiózy, čo indikuje, že získaná imunita na kryptosporídióvu infekciu je len krátkodobá, alebo inkompletná [2]. V industrializovaných krajinách sa môže vyskytnúť endemická kryptosporidióza požitím infikovanej vody alebo potravy [5]. U imunokompromitovaných osôb, ako sú HIV pozitívni pacienti, sa incidencia a závažnosť kryptosporidiózy so znižujúcim sa počtom CD4⁺ T-lymfocytov zvyšuje, hlavne keď tieto klesnú pod 200 buniek na μ l [6].

U detí do jedného roka je v dôsledku nezrelosti imunitného systému výskyt infekcií častejší, ako u starších detí. Táto skutočnosť, spolu so zdravím škodlivými podmienkami a bývaním s nižším štandardom (prípadne v chatrčiach), má pravdepodobne za následok pomerne vysoké percento výskytu pozitívnych vzoriek na *Cryptosporidium* spp. v populácií detí rómskej skupiny obyvateľstva. Avšak aj u ďalších vekových kategórií je percento *Cryptosporidium* spp. – pozitívnych vzoriek pomerne vysoké, čo môže byť spôsobené nedostačujúcou hygienou detí v osadách, ako aj kontaminovanou vodou.

Hunter a kol. [1] kvantitatívne hodnotili riziko infekcie *Cryptosporidium* spp. z malých súkromných vodných zdrojov. Zistili, že riziko infekcie je oveľa vyššie, ako pri verejných zdrojoch pitnej vody. Na druhej strane sledovali aj výskyt kryptosporidiózy u ľudí, ktorí takéto zdroje pitnej vody používali a ukázalo sa, že počet skutočných infekcií ľudí je oveľa nižší, ako by sa dalo očakávať, čo môže indikovať zvýšenú imunitu ľudí pravidelne konzumujúcich vodu zo súkromných zdrojov. Avšak je potrebné si uvedomiť, že zvýšené riziko infekcie je dôležité hlavne u malých detí, keďže ich imunita je nedostatočne vyvinutá. V prípade, že dôjde u týchto detí k prepuknutiu a rozvoju infekcie, klinické príznaky ochorenia majú oveľa ťažší charakter.

Použitá literatúra

1. Hunter, P.R., Saylor, M.A., Risebro, H.L., Nichols, G.L., Kay, D., Hartemann, P.: Quantitative microbial risk assessment of Cryptosporidiosis and giardiasis from very small private water supplies. *Risk analysis*, 2011, 31, 228-236
2. Newman, R.D., Sears, C.L., Moore, S.R., Nataro, J.P., Wuhib, T., Agnew, D.A., Guerrant, R.L., Lima, A.A.: Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.*, 1999, 180, 167-175.
3. Ondriska, F., Vrabcová, I., Brindáková, S., Ditrich, O., Boldiš, V., Bastlová, M., Kváč, M.: Prvé prípady humánnej kryptosporidiózy spôsobenej druhom *Cryptosporidium hominis* v SR. Zborník abstraktov: IX. Slovenské a české parazitologické dni, Liptovský Ján, Máj, 2010, s.60.
4. Popper, M., Szeghy, P., Šarkozy, Š.: Rómska populácia a zdravie: Analýza situácie na Slovensku. 2009
5. Quiroz, E.S., Bern, C., MacArthur, J.R., Xiao, L., Fletcher, M., Arrowood, M.J., Shay, D.K., Levy, M.E., Glass, R.I., Lal, A.: An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. *J. Infect. Dis.*, 2000, 181, 695-700.

Prehľadové práce

6. Sak, B., Ditrich, O.: Humoral intestinal immunity against *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) infection in mice. *Folia Parasitol.*, 2005, 52, 158-162.
7. Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3386-3391.

Práca bola riešená v rámci grantov VEGA MŠ SR č. 1/0108/10, č. 1/0144/10, č. 1/0271/11.

Sérologická depistáž výskytu antimikrosporidiálnych protilátok u pacientov s rôznymi diagnózami

Halánová, M.¹, Čisláková, L.¹, Adam, J.²

¹Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta UPJŠ, SNP 1, 040 66 Košice

²II. gynekologicko-pôrodná klinika, Moyzesova 9, 040 01 Košice

Mikrosporídie tvoria skupinu obligátnych intracelulárnych jednobunkových parazitov vytvárajúcich primitívne spóry výživovo závislé na energetickom metabolizme hostiteľskej bunky bez metabolicky aktívnych štádií.

Už od roku 1857 sú považované za pôvodcov mikrosporidiózy [7], ochorenia vyskytujúceho sa u zástupcov všetkých živočíšnych skupín, od prvokov až po človeka. V roku 1996 bol dokázaný ich zoonotický charakter [3].

Vo všeobecnosti sú mikrosporídie považované za podmienené patogénne mikroorganizmy spôsobujúce klinicky manifestné ochorenie len v prípade zníženej imunitnej odpovede hostiteľského organizmu. Niektoré druhy mikrosporídií sa vyvíjajú len v špecifických hostiteľských bunkách (makrofágy, histiocyty, epiteliálne bunky obličkových kanálikov, močových ciest, výstelky tenkého čreva, spojovky, rohovky, žľčovodov, bronchov, sliznice maternice, cievne epiteliálne bunky) určitého orgánového systému, kým ďalšie druhy spôsobujú systémové ochorenia.

Systematicky patrili mikrosporídie do ríše *Animalia*, podríše *Protozoa* a kmeňa *Microsporidia*. Posledné výskumy však poukázali na veľmi úzke vývojové vzťahy s ríšou húb (*Fungi*). U ľudí bolo doposiaľ zistených a opísaných 14 druhov mikrosporídií, zatriedených do 8 rodov [10].

Prehľadové práce

Medzi najčastejšie diagnostikované mikrosporídie patrí *Encephalitozoon cuniculi* z čeľade *Encephalitozoonidae*. Je pôvodcom encefalitozoonózy, chronického, zvyčajne asymptomaticky prebiehajúceho ochorenia, postihujúceho predovšetkým centrálny a periférny nervový systém, obličky a močovody. *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* je druhou najčastejšie diagnostikovanou ľudskou mikrosporídiou. Aj napriek tomu, že sa vyskytuje tak v humánnej ako aj v zvieracej populácii, jeho zoonotický charakter nebol doposiaľ dokázaný. Veľmi častý výskyt *Encephalitozoon intestinalis* je zaznamenávaný u pacientov s AIDS, u ktorých vyvoláva črevné infekcie prejavujúce sa chronickou diarhoe. Takisto bol jeho výskyt pozorovaný u pacientov s oslabeným imunitným systémom.

V rámci skriningového vyšetrenia sme sledovali výskyt špecifických anti-*Encephalitozoon cuniculi* protilátok u pacientov s rôznymi diagnózami.

Materiál a metódy

Na prítomnosť protilátok proti antigénom *Encephalitozoon cuniculi* sme vyšetrili spolu 187 sér pacientov. 113 z nich bolo hospitalizovaných s rôznymi diagnózami na internom oddelení detskej nemocnice (64 pacientov) a na internom oddelení fakultnej nemocnice (49 pacientov). Skupinu ostatných 74 pacientiek tvorili ženy s rôznymi gynekologickými diagnózami, vo väčšine prípadov s chronickým priebehom.

Ako antigén sme použili spóry *E. cuniculi* pestované na opičej obličkovej kultúre VERO E6, kultivované v médiu RPMI 1640 s prídavkom 5 % fetálneho teľacieho séra, antibiotík a antimykotík.

Protilátky boli detekované metódou nepriamej imunofluorescencie podľa Chalupského a kol. [2].

Prehľadové práce

Výsledky

Protilátková imunitná odpoveď na prítomnosť protilátok proti *E. cuniculi* a *E. intestinalis* bola sledovaná sérologickou metódou nepriamej imunofluorescencie. V prípade pozitivity sa spóry mikrosporidií zobrazovali ako oválne fluoreskujúce útvary.

Z celkového počtu 187 pacientov reagovalo pozitívne pri titri 1:32 16 pacientov, z toho bolo 5 hospitalizovaných a 11 gynekologických pacientiek. Pri titri 1:64 bolo pozitívnych 19 pacientov (5 hospitalizovaných a 14 gynekologických pacientiek) a pri titri 1:256 6 pacientov (len zo skupiny hospitalizovaných pacientov).

Diskusia

Význam mikrosporidiálnych infekcií cicavcov v posledných dvoch desaťročiach značne stúpol, jednak v dôsledku ich častejšieho záchytu v relatívne zdravých populáciách vnímavých hostiteľov, jednak v dôkaze zoonotického charakteru niektorých druhov mikrosporidií – *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*. Takisto neustále sa zvyšujúce zdravotné zaťaženie životného prostredia spolu so stresormi prichádzajúcimi z bezprostredného okolia má za následok znižovanie funkcie imunitného systému. V dôsledku toho dochádza k uplatneniu sa potencióálnych patogénov, medzi ktoré svojim oportúnnym charakterom radíme aj mikrosporídie. Mikrosporídie vo všeobecnosti považované za málo virulentné patogény. Vyvolávajú infekcie, ktoré sú účinne regulované imunitnými mechanizmami s dominantnou úlohou bunkovej imunity. Makrofágy, ktoré slúžia jednak k šíreniu infekčného agens sú zároveň dôležitou súčasťou imunitnej odpovede [4]. Ich hlavnými efektorovými funkciami je produkcia cytokínov (IL- 1, IL- 3, IL- 6, INF- γ , TNF- α), fagocytóza, intracelulárne zabíjanie, produkcia toxických metabolitov kyslíka,

oxidu dusíka a jeho reaktívnych medziproduktov, ktoré môžu byť meradlom intenzity fagocytózy. Okrem toho sú makrofágy schopné prezentovať antigén T- bunkám, čím sa nepriamo podieľajú na T aj B bunkovej imunitnej odpovedi.

Mikrosporidiálna infekcia aktivuje produkciu protilátok v organizme hostiteľa a ich perzistencia sa následne odráža v latentnom priebehu ochorenia. Špecifické protilátky proti mikrosporidiálnym antigénom zohrávajú dôležitú úlohu, ale samotné nedokážu zabezpečiť dostatočnú imunitnú bariéru a ochrániť hostiteľa pred ochorením. IgM protilátková imunitná odpoveď sa rozvíja v priebehu prvých dvoch týždňov od infekcie. Následná IgG protilátková odpoveď dosahuje najvyššie hladiny okolo 5 – 6 týždňa po infekcii a vo všeobecnosti pretrváva počas celého života hostiteľa, a to i u imunokompetentných jedincov [1, 5]. V prevencii letálnej mikrosporidiózy tak zohráva hlavnú úlohu bunkou sprostredkovaná imunitná odpoveď. Cytotoxické T-bunky špecifické pre bunky infikované *E. cuniculi* nie sú detegovateľné, ale Schmidt a Shadduck (1984) [9] zistili, že lymfocyty uvoľňujúce cytokíny a iné mediátory môžu aktivovať makrofágy k zabíjaniu *E. cuniculi*. Pri deficiencii CD4+T-lymfocytov dochádza k prepuknutiu a rozvinutiu sa klinických príznakov [6, 8].

Všetci naši pacienti boli hospitalizovaní resp. ambulantne vyšetrení pre iné základné ochorenie a na prítomnosť špecifických protilátok proti antigénom *Encephalitozoon cuniculi* boli vyšetrení v rámci skrínigovej štúdie. 10,2 % pozitívne reagujúcich pacientov (pri titri 1:64) naznačuje, že je dôležité sledovať výskyt špecifických antimikrosporidiálnych protilátok, najmä pokiaľ dôjde k zníženiu alebo dokonca k absencii kompetentných obranných mechanizmov hostiteľa, napríklad aj vplyvom inej infekcie. V dôsledku toho môže dôjsť až k rozvinutiu sa klinických príznakov typických pre mikrosporidiózu, prejavujúcich sa najmä vo forme systémových a črevných infekcií.

Literatúra

1. Bergquist, N.R., Stintzing, G., Smedman, L., Waller, T., Andersson, T.: Diagnosis of encephalitozoonosis in man by serological tests. *British Medical Journal*, 288, 1984, 902.
2. Chalupský, J., Vávra, J., Bedrník, P.: Detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits by the indirect immunofluorescent antibody test. *Folia Parasitol.*, 20, 1973, 281- 284.
3. Deplazes, P., Mathis, A., Baumgartner, R., Tanner, I., Weber, R.: Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like Microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Cl. Inf. Dis.*, 22, 1996, 557-559.
4. Didier, E.S., Shadduck, J.A.: IFN- γ and LPS induce murine macrophages to kill *Encephalitozoon cuniculi* *in vitro*. *J. Eukar. Microbiol.*, 41, 1994, 34S.
5. Hollister, W.S., Canning, E.U., Wilcox, A.: Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitology*, 102, 1991, 33-34.
6. Kotler, D.P., Orenstein, J.M.: Microsporidia. In: M.J. Blaser, P.D. Smith, J.I. Ravdin, H.B. Greenberg, R.L. Guerrant (eds.): *Infections of the Gastrointestinal Tract*, 1129-1140. Raven Press, New York, 1995.
7. Nägeli, K.W. Über die neue Krainkheit der Siedenraupe und verwandte Organismen. *Bot. Z.*, 15, 1857, s. 760 – 761.
8. Orenstein, J.M.: Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Parasitol.*, 77, 1991, 843-864.
9. Schmidt, E.C., Shadduck, J.A.: Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J. Immunol.*, 133, 1984, 2712-2719.
10. Wittner, M., Weiss, L.M.: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press Washington D.C., 1999, 553 s.
Práca bola riešená v rámci grantu VEGA MŠ SR č.1/9269/02.

Skríning encefalitozoonózy u detí minoritnej populácie na východnom Slovensku

Malčeková, B.¹, Valenčáková, A.¹, Halánová, M.², Luptáková, L.¹, Ravaszová, P.¹, Pohorencová, A.²

¹Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF Košice, Košice

²Ústav verejného zdravotníctva, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

Mikrosporidiálny druh *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) predstavuje obligátneho intracelulárneho, jednobunkového parazita schopného infikovať široké spektrum cicavcov vrátane ľudí. Systematicky ho radíme do rodu *Encephalitozoon*, kmeň *Microsporidia*. Spolu s ostatnými mikrosporidiálnymi druhmi je zaradený do kategórie B organizmov na zozname NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases). Zatiaľ bolo opísaných 14 druhov infikujúcich človeka [3], pričom *E. cuniculi* predstavuje jedného z nich. V ostatnom období bola diagnostika zameraná hlavne na imunodeficientných a imunosupresovaných pacientov (hlavne pacienti s AIDS, ale aj s bakteriálnymi, parazitickými, mykotickými infekciami; po transplantácii a chemoterapii), ale aj na imunokompetentné osoby, ktoré vycestovali do krajín s nízkou úrovňou hygieny (príčina cestovateľských hnačiek), alebo na starších ľudí, detí a ľudí používajúcich kontaktné šošovky [2, 5, 8].

Ohrozenú skupinu z hľadiska prítomnosti mikrosporídií môže predstavovať aj rómska komunita, čo je podporené ich zhoršujúcimi sa zdravotnými a hygienickými podmienkami ich života. Výskyt infekčných a parazitárnych ochorení v rómskych osadách je vysoký (hepatitída A a E, dyzentéria, svrab, invazívne meningokokové infekcie, infekcie dýchacích ciest, tuberkulóza, pedikulóza, pyodermia, mykózy, pohlavné ochorenia - lues) čo spôsobuje oslabovanie imunitného systému a umožňuje tak objavovanie sa oportúnnych patogénov, ako sú napríklad mikrosporídie [1].

Prehľadové práce

Slovensko patrí z demografického hľadiska ku krajinám s najvyšším percentuálnym zastúpením Rómov. Podľa posledných odhadov na Slovensku je v súčasnosti zhruba 320 000 až 500 000 Rómov, čo predstavuje približne 8 až 10 % z celkového počtu obyvateľov, čím patríme medzi krajiny s najvyšším podielom rómskej populácie v Európe [10]. Rómovia žijú rozptýlene na celom území Slovenska, najväčšia koncentrácia je na juhu stredného a východného Slovenska [6].

Táto práca prezentuje prvé skriningové vyšetrenie na prítomnosť *E. cuniculi* v rómskej populácii (44 detí) na východnom Slovensku pomocou real-time PCR za použitia druhovo špecifického primerového páru ECUITSf/ecfITSr.

Materiál a metódy

Vzorky stolice: Na prítomnosť mikrosporidiálneho druhu *E. cuniculi* bolo vyšetrených 44 rómskych detí, ktorým bola odobratá stolica a do doby vyšetrenia uložená v chladničke pri 4 °C.

Spracovanie stolice: Stolica bola spracovaná éterovou extrakciou podľa postupu publikovaného Van Goolom a kol. [11]. Takto spracované vzorky boli uložené v chladničke pri 4 °C.

Molekulové analýzy: Pred samotnou extrakciou DNA vzorky stolice boli podrobené mechanickej disrupcii: 200 µL spór [100 µL suspenzie spór spolu so 100 µL lyzačného pufru (NET 50 + sarcosine)] najprv 30 min. var a následne 8 x striedavo ponorené do dusíka a rozmrazené pri 100 °C). Na extrakciu DNA sa použil komerčný izolačný kit DNA Sorb B (*E. coli*) a postup bol dodržaný podľa inštrukcií výrobcu.

Real-time PCR: Na druh *E. cuniculi* bol použitý druhovo špecifický primerový pár amplifikujúci celú ITS oblasť, malé časti SSU rRNA a LSU rRNA génov: forward primer ECUITSf 5'-CCTTTGACGGTGTCTACGGA-3' a reverse primer ecfITSr 5'-TTTCACTCGCCGCTACTC-3'.

Prehľadové práce

Na celkový objem 25 μL sa napipetovalo 12,5 μL FastStart Universal SYBR Green Master (Roche), 0,5 μL z každého z primerov (30 pmol/ μL) a 5 μL templátu. PCR reakcia prebehla v BIOER Line-Gene v programe: po 2 min. pri 50 °C nasleduje iniciálna denaturácia 10 min. pri 95°C, amplifikácia 40 cyklov (denaturácia 15 s. pri 95 °C a hybridizácia 1 min. pri 60 °C). Amplifikácia, detekcia a analýza dát bola vykonaná v real-time detekčnom termocykleri (BIOER Line-Gene).

Výsledky

Po vykonaní real-time PCR s použitím druhovo špecifického primerového páru ECUITSf/ecfITSr sa potvrdila prítomnosť mikrosporidiálneho druhu *E. cuniculi* v 7 vzorkách (3,08 %).

Diskusia

E. cuniculi predstavuje jeden z najčastejšie sa vyskytujúcich mikrosporidiálnych druhov prevažne u cicavcov nevynechajúc ľudskú populáciu. Klinické príznaky sa prejavujú hlavne u imunodeficientných a imunosupresovaných osôb, kde narušený stav imunitného systému umožňuje premnoženie mikrosporidií a následné prepuknutie závažných klinických prejavov. Tiež rizikóvu skupinu predstavujú aj deti s ich vyvíjajúcim sa imunitným systémom, hlavne z prostredia rómskych osád, v ktorých prevláda nízka životná úroveň nadväzujúca na minimálne hygienické návyky a zlý zdravotný stav. Deti tvoria významnú zložku rómskej populácie. Ich podiel v rámci rómskeho obyvateľstva je až 50 %, kým na štruktúre nerómskeho obyvateľstva iba necelých 25 %. Nami vykonané skriningové vyšetrenie u 44 rómskych detí potvrdilo prvýkrát prítomnosť spór *E. cuniculi* v rómskej populácii (7 pozitívnych detí).

Prehľadové práce

Najpravdepodobnejšie pramene nákazy *E. cuniculi* mohli predstavovať zvieratá (zvýšený výskyt hlodavcov a šeliem), prípadne infikované osoby, ktoré vylučujú infekčné spóry telovými exkrétmi (moč, fekálie, respiračné exkréty). Významnú úlohu pritom hrá ich najbližšie prostredie kontaminované infekčnými spórmi, zvlášť kontaminovaná voda, čo poukazuje na možnosť infekcie priamo z prostredia [7]. Vo viacerých rómnych osadách, je často iba jedna studňa pre všetkých obyvateľov. Voda nie je pravidelne kontrolovaná a o jej prípadnej kontaminácii sa používatelia dozvedia neraz až počas rozšírenej infekcie. Ďalšie riziko predstavuje aj ich životný štýl v osadách, kde sú obydlia preplnené, nie je vybudovaná kanalizácia alebo žumpy, čím dochádza k hromadeniu sa tuhého komunálneho odpadu, ktorý môže taktiež predstavovať potenciálny zdroj infekčných spór [6]. Ďalšia možnosť prenosu ochorenia predstavuje konzumácia nedostatočne teplom upravených predilekčných orgánov (mozog, obličky) [4]. Bezpochyby dôležitým zdrojom infekcie je infikovaná matka, z ktorej spóry prechádzajú transplacentárne do tela plodu a v tomto prípade sa vyvíja akútne a často letálne ochorenie [8].

Zdravotný stav Rómov je podľa našich i zahraničných výskumov horší ako majoritnej populácie. Ich životný štýl, izolácia, nízka vzdelanostná úroveň, nezdravé stravovanie, alkoholizmus, neusporiadané spoločenské usporiadanie v rodinách, vysoká pôrodnosť, koncentrácia jedincov v bytových jednotkách, nízke hygienické návyky a podobne, majú podstatný vplyv na zvýšený výskyt niektorých chorôb a to najmä infekčných a parazitárnych [9]. Na základe zistených nedostatkov je preto potrebné vykonávať permanentný a pravidelný monitoring hygienicko-epidemiologického stavu, čím sa môže predísť epidémiám.

Literatúra

1. Bartošovič, I., Hegyi, L.: Zdravotné problémy rómskeho etnika. *Lekársky obzor*, 4, 2004.
2. Desporte-Livage, I., Doumbo, O., Pichard, E., Hilmarsdottir, I., Traor, H.A., Maiga, I.I., Fakhry, Y.E., Dolo, A.: Microsporidiosis in HIV-seronegative patients in Mali, *In Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 4, 1998, 423 – 424.
3. Didier, E.S.: Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*, 1, 2005, 61 – 76.
4. Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Stovall, M.E.: Diagnosis and epidemiology of microsporidia infections in humans. *Seminar on Food and Water-borne Parasitic Zoonoses*. Bangkok, Thailande, 1, 2004, 65 – 81.
5. Gamboa-Dominquez, A. De Anda, J., Donis, J., Ruiz-Maza, F., Visvesvara, G.S., Diliz, H.: Disseminated *Encephalitozoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation*, 11, 2003, 898 - 900.
6. Hegyi, L., a kol.: Základy sociálnej práce pre verejné zdravotníctvo. Bratislava: Herba, 2006, 18-20.
7. Cotte, L., Rabodonirina, M., Chapuis, F. a kol.: Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 2, 1999, 2003 - 2008.
8. Mohn, S.F., Nordstoga, K., Dishington, I.W.: Experimental encephalitozoonosis in the blue fox: clinical, serological and pathological examinations of vixens after oral and intrauterine inoculation. *Acta Vet. Scand.*, 23, 1982, 490 – 502.
9. Mojžišová, G. a kol.: Životný štýl a zdravotný stav rómskej populácie na Slovensku a v zahraničí. *Slovenský lekár*, 1-2, 2003, 64 – 66.
10. Popper, M., Szeghy, P., Šarkozy, Š.: Romska populacia a zdravie: Analýza situácie na Slovensku, Bratislava, 2009, 15.

Prehľadové práce

11. Van Gool, T., Hollister, W.S., Schattenkerk, W.E., Van den Bergh Weerman, M.A., Terpstra, W.J., van Ketel, R.J., Reiss, P., Canning, E.U.: Diagnosis of Enterocytozoon bienersi microsporidiosis in AIDS patients by recovery of spores from faeces. *Lancet*, 336, 1990, 697–698.

Práca bola riešená v rámci grantu VEGA MŠ SR č. 1/0108/10, č. 1/0412/09 a č. 1/0271/11.

Oznam

Ústav mikrobiológie Slovenskej zdravotníckej univerzity upozorňuje na plánované diskusné sústreďenie „Konzultácia a konzílium v klinickej mikrobiológii“. Podujatie bolo pôvodne plánované na dni 16. – 18. októbra 2011, z technicko-organizačných dôvodov sa prekladá na termín **20. – 22. apríla 2012**. Vzhľadom k limitovanej kapacite zariadenia si organizátor vyhradzuje právo výberu prihlásených uchádzačov. Prihlášky je potrebné zaslať na študijné oddelenie Lekárskej fakulty Slovenskej zdravotníckej univerzity najneskôr 6 týždňov pred plánovaným termínom. Tlačivo prihlášky si môžete stiahnuť na www.szu.sk → Postgraduálne štúdium → Prihlášky na vzdelávacie aktivity → Lekárska fakulta.

Diagnostika *Pneumocystis jiroveci* v podmienkach rutinného laboratória

V. Boldiš, F. Ondriska, Kováč L.

HPL spol. s r.o., medicínske laboratória, Bratislava.

Úvod

Pneumocystis jiroveci, pôvodca pneumocystovej pneumónie, je jednobunkový organizmus systematicky zaradený do ríše Fungi na základe štúdia ultraštruktúry a analýzy sekvencie malej podjednotky ribozomálnej RNA. Prvotne bol zatriedený do ríše Protozoa na základe morfológických charakteristík. Na rozdiel od vláknitých húb nie sú pneumocysty citlivé na amfotericín B, pretože im chýba ergosterol (Jang-Jih, Chao-Hung 2008). V taxonómii patrí rod *Pneumocystis* z čeľade *Pneumocystidaceae* do triedy Archiascomycetes. Tento monofyletický taxón zahŕňa morfológicky a ekologicky odlišné mikroorganizmy v rámci ríše Fungi, ktoré divergovali v skorom štádiu z Ascomycota (Eriksson, Winka 1997).

Organizmus prvýkrát identifikovaný v potkanoch a nesprávne zaradený Chagasom v roku 1909 medzi trypanozómy (Chagas 1909) bol o tri roky neskôr nazvaný *Pneumocystis carinii* manželmi Delanoe, po tom, čo dospeli k názoru, že útvary objavené v pľúcach morčiat nemajú s trypanozómami nič spoločné (Delanoe, Delanoe 1912). Morfológicky nerozlišiteľné štádiá boli detegované v pľúcach mnohých druhov zvierat vrátane človeka, ale na základe štúdia antigénnych determinantov jednotlivých izolátov sa zdá, že medzi ľudskými a zvieracími pneumocystami sú určité rozdiely. Humánný variant dostal oficiálny názov *P. jiroveci* (Wakefield *et al.* 1990).

K vývoju *P. jiroveci* dochádza výlučne v pľúcach, kde sa nachádzajú jeho dve hlavné vývinové štádiá. Veľmi nepravidelné trofozoity vo veľkosti 1 – 4 µm nasadajú v alveolách na povrch pneumocytov typu I, do ktorých sa vnoria svojimi početnými výbežkami a množia sa.

Prehľadové práce

Za určitých, nie celkom objasnených okolností sa zväčšujú (4 – 8 μm), zaguľacujú, ich bunková stena zhrubne a trofozoit sa mení na cystu (s morfológiou pripomínajúcou zdeformovanú loptu), v ktorej vzniká postupným delením osem jednojadrových teliesok (tzv. intracystické telieska).

V životnom cykle sa pneumocysty prenášajú vzdušnou cestou. Rozmnožovanie na bunkovej úrovni môže byť pohlavné aj nepohlavné. Pri nepohlavnom ide o binárne delenie a prítomné sú iba tenkostenné, mononukleárne trofozoity, ktoré môžu mať amébovitý tvar a sú schopné priľnúť k pľúcny pneumocytom. Pri pohlavnom rozmnožovaní sú prítomné trofozoity aj cysty, čiže najskôr dochádza ku konjugácii haploidných trofozoitov a vzniku diploidnej precysty alebo skorého sporocytu. Ďalej nasleduje meióza a tvorba primárnej cysty alebo intermediárneho sporocytu. Po mitóze vzniká neskorý sporocyt s 8 spórmi. Nakoniec cysta excystuje do trofozoitov (Aliouat-Denis *et al.* 2009).

Priamu súvislosť medzi prítomnosťou *P. jiroveci* a ochorením človeka dokázali v roku 1951 Vaněk a Jírovec v prípade intersticiálnej plazmatickej pneumónie u nedonosených detí (Vaněk, Jírovec 1952). Vďaka postupnému zlepšovaniu sociálnych a zdravotných podmienok toto ochorenie dojčiat takmer vymizlo. Až s nástupom choroby AIDS bol záujem o pneumocysty obnovený, keďže sa zistilo, že pneumocystóza patrí medzi jednu z najčastejších oportúnnych nákaz osôb s pozitívnymi protilátkami proti HIV. Primárne ochorenia, ktoré sú komplikované pneumocystovou pneumóniou sa dajú rozdeliť do piatich základných skupín (Huges 1985): poruchy imunitného systému, nádorové ochorenia, zdravotné poruchy u detí, hematologické poruchy a iné imunodeficitné stavy. U imunokompromitovaných pacientov sú pľúčne komplikácie veľmi časté a ak sa včas nezačne s cieľenou terapiou, vedie to až k úmrtiu pacienta.

Prehľadové práce

V patogenéze *P. jiroveci* je vstupnou bránou pravdepodobne inhalácia a infekcia je lokalizovaná výlučne v pľúcnom tkanive. Trofozoity neprenikajú intracelulárne, ale sú viazané tesne na povrchu alveolárneho epitelu. V rámci imunitnej odpovede je patogén najskôr rozpoznávaný CD4⁺ T-lymfocytmi, potom sa aktivujú makrofágy a následne sa uvoľnia cytokíny a TNF α . Vzniká rozsiahly zápalový proces, čím dochádza k poškodeniu alveol, respiračnému zlyhaniu až smrti. Zo symptómov sú najčastejšie dyspnoe, suchý kašeľ, mierne zvýšená telesná teplota, hypoxémia, tachypnoe a tachykardia. U neliečených HIV pacientov môže byť 100% mortalita (Jang-Jih, Chao-Hung 2008).

V liečbe pneumocystózy sa ako lieky prvej voľby používajú trimetoprim-sulfametoxazol. V rámci druhej voľby sa využíva kombinácia primachínu a klindamycínu u pacientov s alergiou na sulfametoxazol. Pentamidín, atovakvón a kombinácia dapsónu s trimetoprimom slúžia ako alternatívna voľba (Kovacs *et al.* 2001).

Súčasná spoľahlivá diagnostika spočíva v mikroskopickom dôkaze parazita v bronchoalveolárnej laváži (BAL) a v indukovanom spúte. Pri mikroskopii sa používajú farbenia podľa Giemsa, Grama a Weigerta, Grocotta a Gomoriho, toluidínová modrá, kalkofluór (nešpecifická fluorescencia) a merifluór (špecifická fluorescencia). Nielsen *et al.* (1986) uvádzajú 80 – 90 % dôkaz parazita z BAL, približne 60% z indukovaného spúta a 30 % z neindukovaného spúta. V prípade pacientov s AIDS môže byť diagnostika sťažená profylaktickým užívaním pentamidínu vo forme aerosólu, ktorá významne znižuje počet pneumocýst, a tým možnosť dôkazu *P. jiroveci* v spúte a BAL. Nakoľko dlhodobá kultivácia nie je možná, ešte stále máme o tomto mikroorganizme málo poznatkov (Aliouat-Denis *et al.* 2009). Sérologické testy založené na dôkaze špecifických protilátok (ELISA, KFR) nemajú diagnostickú hodnotu, pretože značná časť zdravej populácie vykazuje v týchto testoch špecifickú pozitivitu. Skôr sa tieto testy dajú využiť v epidemiologickom skríningu (Lane *et al.* 1991).

Prehľadové práce

Riešenie ponúkajú metódy molekulárnej biológie, napr polymerázova reťazová reakcia (PCR), pri ktorej je amplifikované malé množstvo cudzorodej DNA v organizme hostiteľa. PCR bola prvýkrát úspešne použitá v diagnostike *P. jiroveci* Wakefieldom *et al.* (1990). Pre PCR sa využívajú primery odvodené z génov *P. jiroveci*: dihydropteroát syntáza, dihydrofolát reduktáza, tymidylát syntáza, β -tubulín, *cdc2*, veľká podjednotka mitochondriálnej rRNA, malá podjednotka mitochondriálnej rRNA. Najčastejšie sa používajú primery označované ako pAZ102 (Wakefield *et al.* 1990). V klinickej praxi sa na diagnostiku využívajú rádiografické zariadenia a CT.

Súbor a metódy

V období 10 rokov sme vyšetřili 386 pacientov podozrivých na infekciu pneumocystami. Súbor pozostával z 231 mužov a 155 žien, u ktorých sme vyšetřili o 316 BAL, 59 indukovaných spút, 10 biopsií pľúc a jeden likvor. Išlo o pacientov z regiónu Bratislava, väčšinu tvorili pacienti z onkologických pracovísk, ale zastúpené boli aj iné zariadenia pre liečbu ochorení dýchacej sústavy. Biologické vzorky sme vyšetřovali metódami:

Farbenie podľa Giemsa: Farbia sa iba štádiá trofozoitov *P. jiroveci*. Preparát fixujeme metanolom a po usušení farbíme 30 min. 5 % roztokom Giemsa (Giemsa 1904).

Farbenie podľa Grama a Weigerta: Farbia sa iba cystické štádiá *P. jiroveci*. Preparát fixujeme metanolom a po usušení farbíme v slede po 5 min. 1 % eozínom Y, roztokom kryštálickej violeti a Gramovým jódovým roztokom. Odfarbujeme pomocou anilínxylénového roztoku a xylénom (Garcia, Bruckner 1997).

Extrakcia celkovej DNA: Na izoláciu DNA zo vzoriek spúta a BAL sme použili komerčne dostupnú súpravu DNeasy kit (Qiagen). a postupovali sme podľa návodu, ktorý uvádza výrobca.

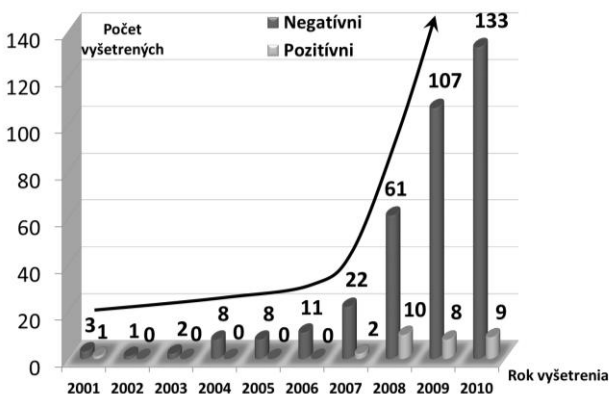
Prehľadové práce

Polymerázová reťazová reakcia: Pri PCR identifikácii *P. jiroveci* sme použili primery pAZ102-E a pAZ102-H, ktoré amplifikujú fragment génu veľkej podjednotky mitochondriálnej rRNA. Očakávaný produkt má veľkosť 346 bp (Tamburrini *et al.* 1993).

Výsledky

➤ Diagnostika *P. jiroveci* u pacientov za obdobie 2001 – 2010

Počet vyšetrení a dôkaz *P. jiroveci* stúpal. V roku 2001 sme vyšetrili štyroch pacientov, v 2002 jedného, v 2003 dvoch, v 2004 ôsmich, v 2005 ôsmich, v 2006 jedenástich, v 2007 dvadsaťštyri, v 2008 sedemdesiatjeden, v 2009 stopätnásť a v 2010 až stoštyridsaťdva (obr. 1).

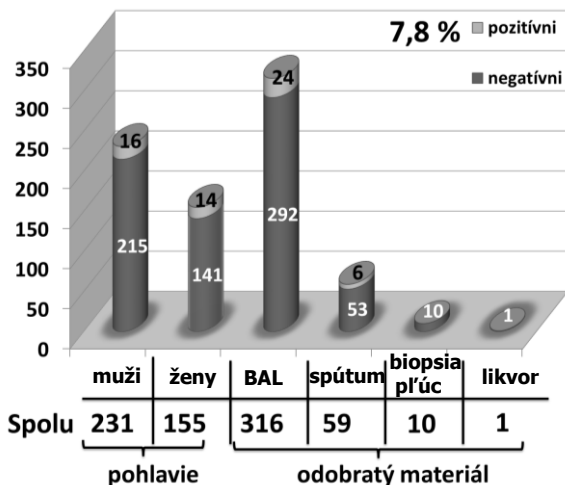


Obr. 1 Požiadavky na vyšetrenie *P. jiroveci*

Metódou PCR sme pneumocysty dokázali v 30 prípadoch a mikroskopicky v 4. U 24 pacientov sme infekciu dokázali v BAL, u 6 v spúte (obr. 2). Prítomnosť *P. jiroveci* sa potvrdila hlavne u imunokompromitovaných osôb s onkologickým ochorením (20), ale aj u pacientov so zápalom pľúc (6+1HIV), s nešpecifikovanou parazitárnou chorobou (1+1HIV) a so systémovým lupus

Prehľadové práce

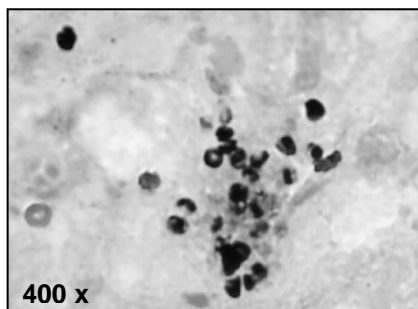
erythematosus (1). U šiestich onkologických pacientov sa stav pneumocystovej infekcie musel sledovať formou viacerých opakovaných vyšetrení. Počet týchto opakovaných vyšetrení sa pohyboval od 2 do 7 a u dvoch pacientov sme pneumocysty detegovali až v tretej a štvrtej vzorke.



Obr. 2 Súhrn vyšetrení na prítomnosť *P. jiroveci* za posledných 10 rokov

➤ Mikroskopický dôkaz

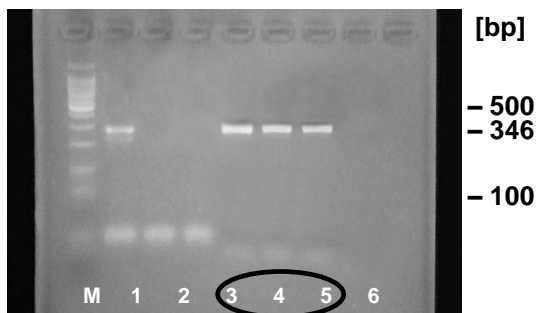
Mikroskopicky sa nám nepodarilo detegovať trofozoity, ale iba cysty, a to v štyroch prípadoch. Na obr. 3 je znázornený jeden z pozitívnych preparátov po farbení podľa Grama a Weigerta. Morfológia pneumocystov je nepravidelná, majú tvar zdeformovanej lopty a sú veľké od 4 – 8 μm . Farbivo dobre diferencuje steny cýst, ktoré sú fialovej až modrej farby a ostatný materiál (eozinofily, alveolárne bunky, pneumocyty) ružovej až purpurovej farby.



Obr. 3 Cysty *P. jirovecii* po farbení podľa Grama aWeigerta.

➤ PCR

Metódou PCR sme vyšetřili 386 pacientov s rôznorodými diagnózami. V 30 (7,8 %) prípadoch (16 mužov a 14 žien) sa nám podarilo detegovať *P. jirovecii* s využitím primerov odvodených z veľkej podjednotky mitochondriálnej rRNA. Obr. 4 reprezentuje niektoré pozitívne a negatívne vzorky vyšetřovaných osôb vizualizované v agarózovom géli po PCR.



Obr. 4 PCR *P. jirovecii*: M – marker molekulových hmotností, dráha 1 – pozitívna kontrola *P. jirovecii*, dráha 2 – negatívna kontrola, dráhy 4, 5, 6 – pozitívni pacienti, dráhy 3, 7, 8 – negatívni pacienti.

Prehľadové práce

➤ *Citlivosť a špecifickosť použitých metód pre diagnostiku P. jiroveci*

Citlivosť a špecifickosť mikroskopického dôkazu sme vyjadrili vzhľadom k PCR, ktorú sme považovali za zlatý štandard. Ide o klasické štatistické hodnoty vypočítané na základe binárneho klasifikačného testu. Po prepočtoch nám pri porovnaní s PCR vyšla 18,2 % citlivosť, 100 % špecifickosť, 100 % pozitívna predpovedaná hodnota a 93,3 % negatívna predpovedaná hodnota mikroskopie .

Diskusia

Na Slovensku ide o prvú prácu, ktorá podáva prehľad o prítomnosti *P. jiroveci* u vyšetovaných pacientov s pľúcnymi komplikáciami a poskytuje možnosti laboratórnej diagnostiky v podmienkach rutinného laboratória.

Porovnávaním citlivosti PCR s ostatnými farbiacimi metódami vzhľadom k vyšetrovanému materiálu sa zaoberali viacerí autori. Vo väčšine prác vyšla podstatne vyššia citlivosť PCR v porovnaní so štandardnými cytologickými farbiacimi technikami pri vyšetovaní BAL, indukovaného aj neindukovaného spúta. Wakefield *et al.* (1990) uvádzajú 90 % citlivosť PCR v porovnaní s 35 % citlivosťou klasického mikroskopického farbenia. Lipschik *et al.* (1992) vyjadrili 93% citlivosť a Chouaid *et al.* (1995) dokonca až 100% citlivosť a špecifickosť PCR v BAL a indukovanom spúte. Naopak, niektorí autori spochybňujú výhodu používania PCR pri diagnostike *P. jiroveci* v indukovanom spúte v porovnaní s farbiacimi technikami a hodnotia PCR ako drahú, časovo náročnú a nevhodnú metódu pre rýchlu detekciu (Armbruster *et al.* 1995). Niektorí zase hodnotia PCR a farbiace techniky ako porovnateľné pri vyšetovaní BAL (Liebovitz *et al.* 1995). Vzhľadom k tomu, že sme nemali k dispozícii klinický obraz a anamnézu vyšetovaných pacientov a či vôbec daná osoba naozaj mala ochorenie zodpovedajúce pneumocystóze, považovali sme ako zlatý štandard výsledky PCR.

Prehľadové práce

Podobne ako vo väčšine prác sme zistili podstatne nižšiu citlivosť mikroskopického dôkazu v porovnaní s PCR metódou. Mikroskopický test (farbenia podľa Grama a Weigerta) je rýchly, pomerne lacný, vyžaduje však odbornú skúsenosť pri hodnotení. Je teda vhodný ako skriningový test na detekciu *P. jiroveci*, ale PCR je oveľa citlivejšia. Mikroskopicky sme mali 81,8 % vzoriek falošne negatívnych a touto metódou sme dokázali iba cystické štádiá. Cornillot *et al.* (2002) sa zaoberali štúdiom životného cyklu *P. jiroveci* a zistili, že 90 až 95 % populácie infekčného agensa je v štádiu trofozoitov. Z tohto dôvodu nám pravdepodobne uniká mikroskopický dôkaz trofozoitov a potvrdzuje, že dôkaz DNA pomocou PCR je spoľahlivou metódou pre detekciu *P. jiroveci*. Na druhej strane u niektorých autorov mikroskopia správne identifikovala klinicky potvrdené prípady pneumocystózy a PCR metóda produkovala významné percento falošne pozitívnych výsledkov (Sing *et al.* 2000).

Z celého súboru vyšetovaných sme pneumocysty detegovali hlavne u osôb s onkologickým ochorením (5,2 %), ďalej nasledovali pacienti so zápalom pľúc (1,8 %), s nešpecifikovanou parazitárnou chorobou (0,5 %), s HIV (0,5 %) a najmenej so systémovým lupus erythematosus (0,3%). Sing *et al.* (2000) diagnostikovali pneumocysty najviac u pacientov s HIV (6 %), potom nasledovali onkologickí (1,8 %) a transplantovaní (1,5 %) pacienti. V našom súbore vyšetovaných osôb nebol taký vysoký počet pacientov s HIV, aký mali Sing *et al.* (40,1 %), a preto sme mali oveľa nižšie percento HIV pacientov infikovaných pneumocystami. Ale najviac pozitívnych pacientov na *P. jiroveci* tvorili imunosuprimovaní (76,7 %) podobne ako v práci Singa *et al.* (94,3 %).

Vzhľadom na nárast počtu imunosuprimovaných osôb je diagnostika *P. jiroveci* nevyhnutná. Potvrdili sme to aj v našej štúdii, kde počet vyšetrení a detekcia tohto oportúnneho patogéna počas rokov stúpa.

Prehľadové práce

V 30 prípadoch sa nám podarilo odhaliť kauzálny agens zodpovedný za vážne pľúcne komplikácie u imunokompromitovaných pacientov.

Podakovanie

Vďaka patrí RNDr. Eve Nohýnkovej, PhD. z NRL pre diagnostiku tropických parazitárnych infekcií, odd. tropickej medicíny 1. LF UK, Praha za časť vyšetrení metódou PCR.

Literatúra

1. Aliouat-Denis C. M., Martinez A., Aliouat E. M., Pottier M., Gantois N., Dei-Cas E. (2009): The *Pneumocystis* life cycle. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, **104**, 419 – 426.
2. Armbruster, C., Pokieser L., Hassl A. (1995): Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by bronchoalveolar lavage in AIDS patients. Comparison of Diff-Quik, fungifluor stain, direct immunofluorescence test and polymerase chain reaction. *Acta. Cytol.* **39**, 1089 – 1093.
3. Cornillot E., Keller B., Cushion M. T., Méténier G., Vivarès C. P. (2002): Fine analysis of the *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* genome by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis. *Gene.* **293**, 87 – 95.
4. Delanoe P., Delanoe M. (1912): Sur les rapports des kystes de carini di poumon des rats avec le Trypanosoma lewisi. *C. R. Acad. Sci.*, **155**, 658 – 660.
5. Eriksson O. E., Winka K. (1997): Supraordinal taxa of the Ascomycota. *Myconet.* **1**, 1 – 16.
6. Garcia L. S., Bruckner D. A.: Diagnostic medical Parasitology. III. Eds., ASM Press, Washington, D.C., 1997, 124.

7. Giemsa G. (1904): Eine vereinfachung und vervollkommnung meiner methylenazur-methylenblau-eosin-färbemethode zur erzielung der romanowsky-nacht'schen chromatin-färbung. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten der Tiere, I. Abteilung, originale*, **37**, 308 – 311.
8. Huges W. T. (1985): *Pneumocystis carinii* pneumonitis. In: Kelley V. C. [Ed.]: Practice of pediatrics, Harper and Row, Publisher, Philadelphia, 1 – 9.
9. Chagas C. (1909): Nova tripanomiasa humana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **1**, 159 – 218.
10. Chouaid, C., Roux P., Lavard I., Poirot J. L., Housset B. (1995): Use of the polymerase chain reaction technique on induced-sputum samples for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. A clinical and cost-analysis study. *Am. J. Clin. Pathol.* **104**, 72 – 75.
11. Jang-Jih L., Chao-Hung L. (2008): *Pneumocystis* pneumonia. *J. Formos. Med. Assoc.*, **107**, 830 – 842.
12. Kovacs J. A., Gill V. J., Meshnick S., Masur H. (2001): New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *JAMA*, **286**, 2450 – 2460.
13. Lane A., Hissey P. H., Jackson H. C. (1991): Detection and quantification of *Pneumocystis carinii* using a sandwich ELISA. In: Proceedings of workshop on Pneumocystis, Cryptosporidium and Microsporidia. *J. Protozool.*, **38**, 195 – 197.
14. Leibovitz E., Pollack H., Rigaud M., Kaul A., Persaud D., Gallo L., Papellas J., Krasinski W., Borkowsky W. (1995): Polymerase chain reaction is more sensitive than standard cytologic stains in detecting *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage from human immunodeficiency virus type 1-infected infants and children with pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **14**, 714 – 716.

15. Lipschik, G. Y., Gill V. J., Lundgren J. D., Andrawis V. A., Nelson N. A., Nielsen J. O., Ognibene F. P., Kovacs J. A. (1992): Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. *Lancet.*, **340**, 203 – 206.
16. Nielsen P., Goyot P., Mojon M. (1986): The microscopic diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B.*, **4**, 19 – 23.
17. Sing. A., Terebesius K., Roggenkamp A., Rüssmann H., Tybus K., Pfaff F., Bogner J. R., Emminger Ch., Heesemann J. (2000): Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1461 – 1467.
18. Tamburrini E., Mencarini P., Luca A. D., Antinori A., Visconti E., Ammassari A., Ortona L., Ortona E., Siracusano A., Vicari E. (1993): Simple and rapid two-step polymerase chain reaction for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2788 – 2789.
19. Vaněk J., Jírovec O. (1952): In: Vaněk J., Jírovec O. [Ed.]: Parazitere pneumonii “intersticielle” plasmazellen pneumonii der frühgeborenen, verursacht durch *Pneumocystis carinii*. *Zbl. Bakt. (Orig.)*, **158**, 120 – 128.
20. Wakefield A. E., Pixley F. J., Banerji S., Sinclair K., Miller R. F., Moxon E. R., Hopkin J. M. (1990): Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet.*, **336**, 451 – 453.