

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

RNDr. Michaela Kotková, DiS

**ČESKÉ BUDĚJOVICE
2019**

Autoreferát disertační práce

Doktorand: RNDr. Michaela Kotková, DiS

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat

Název práce: Mikrosporidiové infekce vyvolané *Encephalitozoon cuniculi* genotypem II a III u imunokompetentních a imunodeficientních hostitelů

Školitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

Oponenti: doc. Ing. Oleg Ditrich, CSc. (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích)

doc. Ing. Jaroslav Vadlech, Ph.D. (Česká zemědělská univerzita v Praze)

RNDr. Pavlína Tinavská, Ph.D. (Nemocnice České Budějovice a.s.)

Obhajoba disertační práce se koná dne 20. 09. 2019 v 10 hodin v místnosti Vědecké rady ZF JU, pavilon M.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

SEZNAM IMPAKTOVANÝCH PUBLIKACÍ

Disertační práce vychází z těchto publikací:

Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Květoňová, D., Kváč, M., 2018. Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model. *Exp Parasitol* 193: 51–57.

Kotková, M., Sak, B., Kváč, M., 2018. Differences in the intensity of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III - Comparison using quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol* 192: 93–97.

Sak, B., Kotková, M., Hlásková, L., Kváč, M., 2018. Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis. *Parasite Immunol* 39: e12496.

Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Kváč, M., 2017. The course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice. *Exp Parasitol* 182: 16–21.

Dodatek:

Kotková, M., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M., 2013. Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PloS One* 8: e60941.

PRÁCE VZNIKLA ZA PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH GRANTŮ

GAČR 14-20684S - Latent microsporidiosis of immunocompetent individuals: ticking time-bomb threatening human health (2014–2016; řešitel RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.)

GAČR 17-12871S - Elucidation of different virulence and drug resistance of genotypes of *Encephalitozoon cuniculi* using murine model (2017–2019; řešitel RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.)

GAJU 002/2016/Z - Genetic, animals health and product quality as basis of competitiveness (2016–2018; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.)

ANOTACE

Mikrosporidie jsou obligátní jednobuněční intracelulární paraziti, jež mají unikátní způsob vstupu do hostitelských buněk. První mikrosporidií, která byla detekována u savců, byl *Encephalitozoon cuniculi*, který má široké hostitelské spektrum, infikuje celou řadu hostitelských buněk a je tak nalézán ve většině tkání. Pomocí experimentálních infekcí různých kmenů imunokompetentních a imunodeficitních myší byl sledován průběh akutní a chronické infekce způsobené různými genotypy mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* s cílem osvětlit vznik dosud opomíjené latentní mikrosporidie u imunokompetentních hostitelů a její rozsah. Dále byla pomocí experimentů s CD4 a CD8 knockout myšmi přezkoumána role jednotlivých subpopulací lymfocytů (CD4+ a CD8+) v protektivní imunitě proti *E. cuniculi* a zároveň u nich byla posuzována účinnost léčby albendazolem. Získaná data přispěla k objasnění potenciálního nebezpečí latentních mikrosporidie vyvolaných *E. cuniculi*, která může představovat riziko pro příjemce orgánů pocházejících od infikovaných dárců.

Nedílnou součástí práce bylo studium transplacentárního přenosu mikrosporidií z matky na plod, které přineslo odpovědi na otázku rizik spojených s prenatálními infekcemi plodů u chronicky infikovaných matek.

ANNOTATION

Microsporidia are obligate, unicellular intracellular parasites that have a unique way of entering the host cells. *Encephalitozoon cuniculi* was the first microsporidia found in mammals. This parasite has a broad host spectrum, infects a variety of host's cells and is found in most tissues of an infected individual. The course of acute and chronic infections caused by various genotypes of *Encephalitozoon cuniculi* was investigated by using different strains of mice. The aim of this study was to clarify the origin and extent of neglected latent microsporidiosis in immunocompetent hosts. Furthermore, the role of individual lymphocyte subpopulations (CD4+ and CD8+) in protective immunity against microsporidia was examined using CD4 and CD8 knockout mice experiments, and also the efficacy of treatment with albendazole was studied. The obtained data help to elucidate the potential danger of latent microsporidiosis, which may pose a risk to recipients of organs from infected donors in human medicine.

A considerable part of this thesis was the study of transplacental transmission of microsporidia from mother to a fetus, which answered the question about the risks associated with prenatal infections of fetuses in chronically infected mothers.

SOUHRN

Tato disertační práce se zabývá studiem průběhu infekce způsobené mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II a III u vybraných imunokompetentních a imunodeficitních kmenů myši. Myši byly infikovány dávkou 1×10^7 spor *E. cuniculi* genotyp II nebo III ato per orálně nebo intraperitoneálně. Vybraným skupinám myši jednotlivých kmenů bylo po dobu dvou týdnů denně perorálně podáváno léčivo albendazol. Všechna zvířata zařazená do experimentů byla denně individuálně vyšetřována na přítomnost mikrosporidií v trusu po dobu ~91 dní po infekci. Byla sledována prepatentní a patentní perioda, a doba přežívání jednotlivých kmenů myši. Orgány a tělní tekutiny získané při každotýdenní pitvě byly vyšetřeny pomocí nested PCR na přítomnost specifické DNA mikrosporidií, a pomocí real-time PCR byla stanovena parazitární zátěž organismu.

Experimenty prokázaly, že průběh infekce nezávisí pouze na imunologickém stavu hostitele, ale také na genotypu mikrosporidie *E. cuniculi*. *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III měl oproti genotypu II rychlejší nástup infekce. Již první týden po infekci byly všechny orgány pozitivní na přítomnost parazita. Zároveň počet pozitivních orgánů během celého experimentu byl vyšší u *E. cuniculi* genotypu III v porovnání s genotypem II. Přes tento fakt se imunodeficitní SCID myši s infekcí způsobenou *E. cuniculi* genotypem III dožívaly déle než SCID myši infikované genotypem II.

Léčba albendazolem způsobila snížení počtu parazitů u imunokompetentních i imunodeficitních myši. V případě léčby infekce *E. cuniculi* genotypem II nebylo možné parazita detekovat pomocí konvenční PCR, nicméně po navozené imunosupresi došlo k opětovnému rozšíření infekce. U imunodeficitních myši došlo díky léčbě albendazolem pouze k prodloužení života hostitele o několik týdnů.

Pomocí real-time PCR bylo zjištěno, že zatížení jednotlivých orgánů mikrosporidii *E. cuniculi* genotyp III je o řád vyšší než v případě infekce genotypem II. Zároveň byl zjištěn rozdíl v průběhu šíření infekce do jednotlivých orgánů. U BALB/c myši infikovaných *E. cuniculi* genotypem II a SCID myši infikovaných *E. cuniculi* genotypy II a III byly v prvním a druhém týdnu po infekci infikovány převážně orgány gastrointestinálního traktu (dále jen GIT). V následujících týdnech došlo k přesunu infekce a více byly infikovány orgány mimo GIT. BALB/c myši infikované *E. cuniculi* genotypem III měly vyvážené rozložení výskytu parazita vzhledem ke srovnání GIT vs. orgány mimo GIT po celou dobu sledování.

Z experimentů s knockout myšmi vyplývá důležitost buněčné imunity v boji proti mikrosporidii, především CD8 T lymfocytů. *Encephalitozoon cuniculi* způsobil u CD8

knockout myši vážné onemocnění, jež se projevilo šířením parazita do většiny orgánů a úmrtím hostitele osmý týden po infekci. CD4 knockout myši infekci přežívaly, nicméně v chronické fázi infekce zůstávaly mikrosporidie diseminované v mnoha orgánech.

Výsledky experimentů zjišťujících možnost transplacentálního přenosu mikrosporidií u myši byly negativní až na dvě výjimky. V prvním případě došlo k nálezům mikrosporidií u SCID mláďat, která byla ponechána až do 3. týdne života u náhradní neinfikované matky. Mikrosporidie se byly také detekovány u imunosupresovaných (Depo-medrol) BALB/c mláďat. Z těchto výsledků vyplývá, že k přenosu mikrosporidií přes placentu dochází.

SUMMARY

This thesis focus on the study of the course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III in selected immunocompetent and immunodeficient strains of mice. Mice were orally or intraperitoneally infected with 1×10^7 spores of *E. cuniculi* genotype II or III. Treatment of microsporidial infection was performed using albendazole. Albendazole was orally administered to selected groups of several strains of mice daily for two weeks. All experimental animals were individually examined for microsporidia in faeces daily for ~ 91 days post infection. The prepatent and patent period, and the survival time of different mice strains were monitored. Organs and body fluids obtained at weekly necropsy were examined by nested PCR for the presence of microsporidia, and the parasitic burden of the organism was monitored by real-time PCR.

Experiments had shown that the course of infection does not only depend on the host's immunological status, but also on the *E. cuniculi* genotype. *Encephalitozoon cuniculi* genotype III had a faster onset of infection than in case of infection caused by genotype II. All organs were positive for the presence of specific DNA of the parasite since the first week after infection. Simultaneously, the number of positive organs throughout the experiment was higher in infection caused by *E. cuniculi* genotype III than in these with genotype II infection. Despite this fact, immunodeficient SCID mice infected with *E. cuniculi* genotype III survived longer than SCID mice with genotype II infection.

Treatment with albendazole in immunocompetent mice caused reduction of the amount of parasite. In case of *E. cuniculi* genotype II infection, the parasite could not be detected by conventional PCR. In immunodeficient mice, treatment with albendazole only prolonged the host's life for several weeks.

Parasitic load of organs were ten times higher in case of infection caused by *E. cuniculi* genotype III than in mice infected by genotype II. There was a difference in the distribution of *E. cuniculi* genotype II in BALB/c mice and *E. cuniculi* genotype II and III in SCID mice in body. The organs of gastrointestinal tract (GIT) were predominately infected in the first and second weeks after infection. Since third week the infection were spread mostly to organs outside of the GIT. BALB/c mice infected with *E. cuniculi* genotype III had a balanced of parasite distribution throughout the duration of monitoring.

Experiments with knockout mice indicate the importance of cellular immunity in the fight against microsporidiosis, especially the importance of CD8 T cells. *Encephalitozoon cuniculi* caused serious disease in CD8 knockout mice, manifested by the spreading of the parasite into

most organs and the death of the host 8 weeks post infection. CD4 knockout mice survived the infection, but microsporidia remained disseminated in many organs in the chronic phase of infection.

The results of experiments investigating the possibility of transplacental transfer of microsporidia in mice were negative except for two events. In the first case, microsporidia were found in the SCID cubs, which were kept until the third week of their life in an uninfected substitute mouse-mother. Microsporidial infection was also detected in BALB/c cubs, which were administered by immunosuppressant Depo-medrol. This resulted into the creation of appropriate conditions for the proliferation of microsporidia. Our results showed that the placental transfer of microsporidia occurs.

ÚVOD

Mikrosporidie jsou obligátní jednobuněční intracelulární paraziti řazení do samostatného kmene Microsporidia patřící do říše hub, Fungi (Weber a kol., 1994; Hirt a kol., 1999). Tyto organismy jsou charakterizovány vytvářením malých a ve volném prostředí odolných spor, jež mají unikátní způsob vstupu do hostitelských buněk. Jsou to eukaryota mající jádro, dělení chromosomů a vnitřní cytoplasmatický membránový systém. Naproti tomu postrádají Golgiho aparát, centrioly, peroxisomy a mitochondrie, které jsou nahrazeny mitochondriím podobnou organelou, zvanou mitosom (Vávra, 2005). Nicméně, jejich zjevná jednoduchost je pouze sekundární znak odvozený od adaptace na vnitrobuněčný parazitismus.

Mikrosporidie zahrnují přes 1200 druhů infikujících širokou škálu hostitelů od bezobratlých přes ryby až po savce včetně primátů a lidí (Canning a Hollister, 1992; Snowden a kol., 1998; Didier a kol., 2000). Od roku 1959, kdy byl popsán první případ lidské mikrosporidie, bylo popsáno 17 druhů infikujících člověka (Didier a kol., 2004). První mikrosporidii, jež byla nalezena u savců byl *Encephalitozoon cuniculi*. Zároveň byla první mikrosporidii, jež se podařilo převést do buněčné kultury (Shaddock, 1969). Díky tomu se stal *E. cuniculi* nejlépe prostudovaným druhem mikrosporidií.

Encephalitozoon cuniculi infikuje široké spektrum hostitelských buněk zahrnující makrofágy, epitelie, cévní endotelie, buňky ledvinných kanálků a ostatní typy buněk. Je tak nalézán ve většině tkání s predilekcí v mozku, plicích a ledvinách (Gannon, 1980). U imunokompetentních jedinců s plně vyvinutým imunitním systémem je popisovaná krátká akutní fáze projevující se především průjmem, jež následně přejde v asymptomatickou infekci. V řadě případů nejsou v akutní fázi šíření parazita v těle hostitele detekovány žádné klinické příznaky. Naproti tomu u imunodeficientních jedinců přetrvává klinická forma s chronickými průjmy, jež vedou k malabsorpci a následnému celkovému zhoršení zdravotního stavu (Weber a kol., 1992). Navíc, u těchto pacientů byly popsány další klinické příznaky onemocnění včetně encefalitidy, keratokonjunktivitidy, nefritidy a hepatitidy (Cali a kol., 1991; Weber a kol., 1994; De Groote a kol., 1995; Mertens a kol., 1997; Didier a kol., 1998). Diseminace infekce do různých částí těla hostitele je umožněna schopností tohoto druhu mikrosporidie infikovat a množit se uvnitř makrofágů, které jim zároveň slouží jako dopravní prostředek v těle hostitele (Mathews a kol., 2009). Přestože se jedinec může infikovat celou řadou způsobů, pozřením kontaminované potravy a vody, nebo inhalací spor představuje nejvýznamnější z nich (Cotte a kol., 1999; Thurston-Enriquez a kol., 2002; Didier a kol., 2004).

Nejméně prozkoumaná, ovšem neméně důležitá cesta přenosu mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* je transplacentální přenos. Přenos infekce z matky na potomka přes placentu byl popsán u hlodavců, králíků, koní, masožravců (u psů a lišek) a primátů vyjma člověka (Snowden a kol., 1998; Snowden a Shadduck 1999). U všech těchto skupin zvířat byla přítomnost mikrosporidií u mláďat, jež se narodila přirozeně nebo experimentálně infikovaným matkám, zjišťována především serologicky a/nebo histopatologicky. Rozsáhlé léze především na mozku, ale i v ledvinách a na plicích způsobené mikrosporidii, zapříčinily, že většina mláďat se narodila již mrtvá nebo zemřela během několika málo dní po porodu (Innes a kol., 1962; Owen a Gannon, 1980; Baneux a Pognan, 2003; Mathis a kol., 2005).

Průběh mikrosporidiové infekce závisí především na stavu imunitního systému hostitele. Zatímco u imunokompetentních myší infikovaných *E. cuniculi* dochází k latentní infekci s asymptomatickým průběhem (Gannon, 1980; Niederkorn a kol., 1981), u imunodeficientních hostitelů jako jsou athymické nebo myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID) se rozvine akutní až letální onemocnění (Schmidt a Shadduck, 1984; Koudela a kol., 1993). Podobná variabilita v průběhu infekce byla zaznamenána i u lidí: u jedinců s plně vyvinutým funkčním imunitním systémem probíhá infekce nejčastěji asymptomaticky, zatímco u imunodeficientních pacientů se rozvine chronický průjem vedoucí k malabsorpci a diseminované infekci (Kotková a kol., 2013).

Studium imunologické odpovědi proti mikrosporidiovým infekcím jsou založeny na experimentální infekci různých kmenů myší. Počáteční studie ukazovaly, že průběh infekce je závislý především na imunologickém stavu hostitele – u imunokompetentních myší zůstávají infekce asymptomatické s přechodem do latentní fáze, zatímco u imunodeficientních hostitelů propukne infekce v akutní a velmi často ve fatální onemocnění (Gannon, 1980; Niederkorn a kol., 1981; Schmidt a Shadduck, 1983; Koudela a kol., 1993). Následné studie byly založeny na zjišťování protektivní role jednotlivých složek humorální i buněčné imunity v boji proti mikrosporidioze. Hlavní roli hrají INF- γ a IL-12, což bylo úspěšně demonstrováno pomocí experimentů s adoptivními přenosy imunních buněk za použití SCID nebo athymických myší (Heřmánek a kol., 1993; Braunfuchsová a kol., 1999; Salát a kol., 2004; Sak a Ditrich, 2005). Byl také popsán význam jednotlivých subpopulací T lymfocytů za použití knockout kmenů myší, se zdůrazněním role cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů (Khan a kol., 1999; Moretto a kol., 2000; Sak a kol., 2006).

Chemoterapie mikrosporidióz je omezena pouze na několik léčiv zahrnujících albendazol a fumagilin, které jsou alespoň částečně účinné a redukuje počet parazitů (Didier, 2005).

Albendazol a jeho deriváty se vážou k tubulinu v těle parazitů, brání jeho polymeraci a to následně vede k rozvratu metabolismu a smrti parazita. Léčba lidských mikrosporidiálních infekcí způsobených rodem *Encephalitozoon* pomocí albendazolu ukázala výrazné zlepšení příznaků onemocnění a postupnou likvidaci parazita ve všech orgánech (Molina a kol., 1995). Ovšem recentní výsledky zpochybňují 100% účinnost albendazolu (Kotková a kol., 2013). Mikrosporidie rodu *Enterocytozoon* jsou na albendazol málo citlivé, proto jako lékem první volby je v tomto případě fumagilin. Je to antibiotikum z houby *Aspergillus fumigatus*, které používají především včelaři pro léčbu včelí nosematózy. Pro lidský organizmus je však toxický a může způsobovat trombocytopenii a neutropenii.

Vzhledem k tomu, že do současné doby byl výzkum založen pouze na přežívání hostitele a persistence mikrosporidií u imunokompetentních jedinců byla také opomíjená, je tato práce zaměřena především na studium latentní mikrosporidiózy a účinnosti léčby albendazolem. Samostatnou kapitolou, i když svou podstatou navazuje výzkum latentní mikrosporidiózy, bylo studium transplacentárního přenosu mikrosporidií z matky na plod, které přineslo odpovědi na otázku rizik spojených s prenatálními infekcemi plodů u chronicky infikovaných matek.

CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo komplexní studium infekcí vyvolaných dvěma genotypy mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* u imunokompetentních a imunodeficitních hostitelů (hlodavců) a dále studium možného kongenitálního přenosu mikrosporidií z matky na plod.

Dílčí cíle:

- 1) charakterizace průběhu infekcí způsobených *Encephalitozoon cuniculi* genotypem II a genotypem III u experimentálně infikovaných hostitelů (hlodavců);
- 2) zjištění účinnosti léčby albendazolem u SCID a BALB/c myši infikovaných *E. cuniculi* genotypem III;
- 3) zjištění účinnosti léčby albendazolem u C57Bl/6 myši, CD4 a CD8 knockout myši infikovaných *E. cuniculi* genotypem II;
- 4) pomocí metody RT-PCR zjistit skutečnou parazitární zátěž hostitelského organismu;
- 5) studium transplacentárního přenosu *E. cuniculi* u imunokompetentních i imunodeficitních hostitelů.

SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Mikrosporidie jsou pozoruhodné parazitující mikroorganismy, které fascinují vědce již téměř dvě století. Mikrosporidie mohou infikovat jak bezobratlé, tak obratlovce, u kterých způsobují celou řadu onemocnění od skrytých infekcí až po masivní poškození hostitelského organismu, které často končí smrtí.

Od roku 1959, kdy byla diagnostikována první mikrosporidie u člověka, bylo popsáno 17 druhů infikujících člověka, které u imunodeficitních jedinců způsobují mnohem vážnější zdravotní problémy ve srovnání s imunokompetentními jedinci (Didier a kol., 2004). *Encephalitozoon cuniculi*, jako první mikrosporidie identifikovaná u savce a zároveň první mikrosporidie, která byla úspěšně izolovaná a dlouhodobě kultivovaná v buněčné kultuře, patří mezi nejlépe prostudovaný druh mikrosporidie. Podle počtu krátkých opakování v ITS rRNA regionu jsou rozlišovány čtyři různé (ne však přísně hostitelsky specifické) genotypy *E. cuniculi* (Didier a kol., 1995b; Talabani a kol., 2010).

Většina z toho, co je známo o biologii savčí mikrosporidiózy je primárně založeno na studiu mikrosporidie *E. cuniculi* genotyp II, která je hojně využívána pro experimentální infekce. Průběh infekce způsobené *E. cuniculi* genotyp II závisí především na imunologickém stavu hostitele, což bylo úspěšně dokázáno na myších modelech (Sak a Ditrich, 2005; Sak a kol., 2006; Kotková a kol., 2013). Zatímco u imunokompetentních myší infikovaných *E. cuniculi* genotyp II se rozvinula latentní infekce, která zůstala asymptomatická dokud bylo množství parazita a imunitní odpověď hostitele v rovnováze (Gannon, 1980b; Niederkorn a kol., 1981; Kotková a kol., 2013), u imunokomprimovaných myší, jako jsou SCID nebo athymické nu/nu myši, se po infekci rozvinula akutní a většinou letální mikrosporidióza (Schmidt a Shaddock, 1984; Koudela a kol., 1993; Kotková a kol., 2013).

Na základě literárních dat a našich experimentů se ukázalo, že jednotlivé genotypy *E. cuniculi* se významně liší v průběhu infekce, v odpovědi na léčbu albendazolem, ale také v různé toleranci hostitele na parazitární zátěž (Hofmannová a kol., 2014; Kotková a kol., 2017). Ovšem mechanismus této tolerance zatím zůstává neznámý.

Průběh infekce způsobené mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III u imunokompetentních BALB/c a imunodeficitních SCID myši

Zatímco *E. cuniculi* genotyp II ve většině případů způsobuje asymptomatickou latentní formu infekce (Kašičková a kol., 2009; Neumayerová a kol., 2014), *E. cuniculi* genotyp III se zdá být mnohem agresivnější a infekce způsobené tímto genotypem často vedou ke smrti i imunokompetentního hostitele (Juan-Sallés a kol., 2006; Hofmannová a kol., 2014; Meng a kol., 2014). Výsledky našich experimentů ukázaly, že infekce vyvolaná *E. cuniculi* genotyp III má rychlý nástup se šířením parazita do všech orgánů již týden po infekci, ale hostitel přežíval a měl jen velmi mírné klinické příznaky onemocnění. Zajímavé jsou výsledky u imunodeficitních SCID myši; zatímco infekce způsobená *E. cuniculi* genotyp II byla charakterizovaná postupným nárůstem počtu infikovaných orgánů a smrtí hostitele v době, kdy všechny orgány byly pozitivní na přítomnost mikrosporidií (cca 33. den po infekci) (Kotková a kol., 2013), infekce způsobená *E. cuniculi* genotypem III se již týden po infekci rozšířila do všech orgánů a tento stav zůstal až do smrti hostitele, cca 39. den po infekci. Překvapivé je, že přes rychlou expanzi *E. cuniculi* genotypu III a postižení více orgánů, se myši dožívaly déle než myši s infekcí způsobenou *E. cuniculi* genotypem II. Zdá se, že přežití myši není závislé na parazitární zátěži, ale mnohem pravděpodobněji bude záviset na genotypu *E. cuniculi*. Předpokládáme, že *E. cuniculi* genotyp III aktivuje odlišnou část imunitního systému než *E. cuniculi* genotyp II. Může to být způsobeno adaptací parazita, který tak transformuje imunitu k méně efektivní odpovědi, což následně může mít vliv na prodloužení života hostitele. Zdá se, že nejdůležitějším „zabíječem“ mikrosporidií u imunodeficitních myši jsou NK buňky, ale to je otázka dalších výzkumů.

Chemoterapie mikrosporidióz je omezena pouze na několik léčiv zahrnujících albendazol a fumagilin, které jsou alespoň částečně účinné a redukuje počet parazitů (Didier, 2005). Albendazol a jeho deriváty se vážou k tubulinu v těle parazitů, brání jeho polymeraci a to následně vede k rozvratu metabolismu a smrti parazita. Léčba lidských mikrosporidiálních infekcí způsobených rodem *Encephalitozoon* pomocí albendazolu ukázala výrazné zlepšení příznaků onemocnění a postupnou likvidaci parazita ve všech orgánech (Molina a kol., 1995, Ditrich a kol., 2011). Ovšem recentní výsledky zpochybňují 100% účinnost albendazolu (Kotková a kol., 2013), kdy experimentální imunoprese BALB/c myši, které byly po léčbě albendazolem negativní na přítomnost mikrosporidií, vyvovala opětovné rozšíření parazita do několika orgánů. Mikrosporidie rodu *Enterocytozoon* jsou na albendazol málo citlivé, proto jako lékem první volby je v tomto případě fumagilin. Je to antibiotikum z houby *Aspergillus*

fumigatus, které používají především včelaři pro léčbu včelí nosematózy. Pro lidský organizmus je však toxický a může způsobovat trombocytopenii a neutropenii.

Encephalitozoon cuniculi genotyp III vykazuje zvýšenou rezistenci proti principiálnímu působení albendazolu. Nejenom že léčba pomocí albendazolu nevedla k eliminaci parazita ze všech orgánů, jako tomu bylo v případě *E. cuniculi* genotyp II, ale navíc počet pozitivních orgánů opět vzrostl okamžitě po ukončení léčby. U imunokompetentních SCID myší vedla léčba k prodloužení života o cca 37 dní, v případě že léčba byla započata 14. den po infekci. Léčba infekce u SCID myší od 28. DPI způsobila pouze vymizení parazita z žaludku a z krve. Zároveň prodloužila dobu přežití myší o 17 dní.

Porovnání parazitární zátěže organismu použitím metody qRT-PCR

Mikrosporidie bývají popisovány jako pomalu působící patogeny, a tedy méně virulentní než jiné skupiny patogenů. Nicméně, jak je uvedeno výše, jsou schopny se úspěšně množit ve vhodném hostiteli na enormní množství bez jakýchkoliv zjevných známek infekce u imunokompetentních hostitelů, což ukazuje, že vysoká infekčnost, vysoká patogenita nebo obojí nemusí nutně odpovídat úrovni dopadu mikrosporidií na hostitelský organizmus.

Většina z dřívějších experimentálních studií je omezena na hodnocení doby přežití hostitele (Braunfuchsová a kol., 2001; Salát a kol., 2006) a skutečná parazitární zátěž nebyla doposud zkoumána. Na základě našich výsledků kvantifikace množství spor v jednotlivých orgánech během infekce byl u imunokompetentních BALB/c myší zjištěn progresivní průběh charakterizovaný šířením mikrosporidií do téměř všech orgánů s maximálním dosaženým počtem $3,8 \times 10^8$ spor na 1 g tkáně v případě *E. cuniculi* genotypu II, a $3,6 \times 10^9$ spor na 1 g tkáně v případě *E. cuniculi* genotypu III. Kromě toho, hodnocení vzorků pomocí RT-PCR potvrdilo omezenou účinnost albendazolu. Tato metoda odhalila přítomnost mikrosporidií v 5 ze 17 vyšetřených tkání a tělních tekutin (nepublikovaná data) u léčených BALB/c myší, jež se zdály být zcela negativní po vyšetření pomocí konvenční PCR.

Naše výsledky zaměřené na experimentální infekce imunodeficitních SCID myší *E. cuniculi* genotypem II nebo III ukázaly rozdílný průběh infekce a různou toleranci k parazitární zátěži. Ačkoli *E. cuniculi* genotyp II způsobil akutní infekci s masivní diseminací parazita do mnoha orgánů s maximem $2,9 \times 10^{10}$ spor na gram tkáně (28. den po infekci), hodnocení SCID myší infikovaných *E. cuniculi* genotypem III ukázalo mnohem dřívější vzestup a intenzivní rozšíření infekce v těle hostitele s maximem pozitivních orgánů již týden po infekci. Navíc absolutní počet spor ve tkáních byl 10× větší ve srovnání *E.*

cuniculi genotyp II, tj. $4,9 \times 10^{11}$ spor na gram tkáně (35. den po infekci). Navzdory tomuto faktu, myši infikované *E. cuniculi* genotypem III přežily mnohem déle.

Průběh infekce způsobené *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II u imunokompetentních C57Bl/6 myši a z nich odvozených CD4 a CD8 knockout myši

Studium imunitní odpovědi proti mikrosporidiím je založeno především na experimentálních infekcích různých kmenů myši. Zpočátku byly využívány imunokompetentní kmeny myši BALB/c, C57BL/6, C57BL/10, DBA/1, DBA/2, 129/J a AKR (Niederhorn a kol., 1981). Dalším milníkem v rámci imunoparazitologie bylo využití hostitelů s různými defekty imunitního systému - athymické myši (Schmidt a Shaddock 1983, 1984; Didier a kol., 1994) a myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí SCID (Koudela a kol., 1993, Salát a kol., 2001) a následovaly experimenty s kmeny myši, jež měly defektní geny pro syntézu konkrétních cytokinů (IFN- γ , IL-12) nebo defekty funkčně významných povrchových molekul lymfocytů (receptor pro IFN- γ , CD4 a CD8 povrchové molekuly) (Achbarou a kol., 1996, Khan a Moretto, 1999, Khan a kol., 1999, Salát a kol., 2002). Druhým způsobem, kterým je posuzován význam konkrétního imunitního mechanismu, jsou adoptivní přenosy přesně definovaných populací lymfocytů do SCID myši před následnou infekcí mikrosporidiemi. Počáteční studie tak ukázaly, že chemicky imunosuprimované nebo geneticky imunokomprimované (SCID a nu/nu) myši mohou být zachráněny adoptivním přenosem aktivovaných T buněk (Heřmánek a kol., 1993; Khan a kol., 1999; Braunfuchsová a kol., 2001). Data získaná z experimentů CD4 a CD8 knockout myšmi také ukázala, že cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty jsou zásadní pro ochranu hostitelského organismu před mikrosporidiemi, a že jejich aktivace nemusí být závislá na CD4⁺ T lymfocytech (Khan a kol., 1999; Moretto a kol., 2000).

Protože CD4 a CD8 knockout myši jsou vyvinuty z C57Bl/6 myši, pozorovali jsme u všech kmenů stejný počáteční průběh infekce, kdy došlo již během několika málo týdnů po infekci k diseminaci parazita do většiny orgánů hostitele. U CD4 knockout myši a C57Bl/6 byla tato počáteční fáze vystřídána chronickou fází charakterizovanou persistencí mikrosporidií v některých orgánech, u CD4 knockout myši byla většina zasažených orgánů mimo gastrointestinální trakt. U CD8 knockout myši se vyvinula letální mikrosporidíóza končící smrtí hostitele cca 57. den po infekci, což je podstatně déle než tomu bylo u

imunodeficitních SCID myší. Tyto výsledky ukazují na roli dalších imunitních mechanismů, jako jsou CD4⁺ T lymfocyty, B lymfocyty a cytokiny. Parazitární zátěž u CD8 knockout myší byla $5,27 \times 10^9$ spor na gram tkáně 35. den po infekci a u CD4 knockout myší $1,19 \times 10^8$ spor na gram tkáně 28. den po infekci, což naznačuje, že přežití hostitele není závislé pouze na snížení množství spor. Tento výsledek podporuje základní koncepci o účinnosti buněčné imunity (především CD8⁺ T lymfocytů) v obraně proti mikrosporidii.

Aplikace albendazolu vedla u C57Bl/6 a CD4 knockout myší k vymizení parazita ze všech orgánů týden, respektive 3 týdny po ukončení léčby. Aplikace albendazolu infikovaným CD8 knockout myším vyústilo ve vymizení mikrosporidií z mnoha orgánů jeden týden po ukončení léčby a v prodloužení doby přežití. Nicméně, po tomto dočasném ozdravení díky léčbě albendazolem se mikrosporidie opět rozšířily do téměř všech orgánů. Avšak v době ukončení experimentu (91. den po infekci) myši stále přežívaly i přes masivně rozšířenou infekci v těle hostitele.

Transplacentální přenos

Encephalitozoon cuniculi infikuje široké spektrum hostitelských buněk zahrnující makrofágy, epitelie, cévní endotelie, buňky ledvinných kanálků a ostatní typy buněk. Je tak nalézán ve většině tkání s predilekcí v mozku, plicích a ledvinách (Gannon, 1980a; Kotková a kol., 2013, 2017; Sak a kol., 2017). Diseminace infekce do různých částí těla hostitele je umožněna schopností tohoto druhu mikrosporidie infikovat a množit se uvnitř makrofágů, které jim zároveň slouží jako dopravní prostředek v těle hostitele (Cotte a kol., 1999). Přestože se jedinec může infikovat celou řadou způsobů, pozření kontaminované potravy a vody, nebo inhalace spor představuje nejvýznamnější z nich (Cotte a kol., 1999; Thurston-Enriquez, 2002; Didier a kol., 2004).

Nejméně prozkoumaná, ovšem neméně důležitá cesta přenosu mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* je transplacentální přenos. Přenos infekce z matky na potomka přes placentu byl popsán u hlodavců, králíků, koní, masožravců (u psů a lišek) a primátů vyjma člověka (Snowden a kol., 1998; Snowden a Shaddock, 1999). U všech těchto skupin zvířat byla přítomnost mikrosporidií u mláďat, jež se narodila přirozeně nebo experimentálně infikovaným matkám, zjišťována především serologicky a/nebo histopatologicky. Rozsáhlé léze především na mozku, ale i v ledvinách a na plicích způsobené mikrosporidii zapříčinily, že většina mláďat se narodila již mrtvá nebo zemřela během několika málo dní po

porodu (Innes a kol., 1962; Owen a Gannon, 1980; Baneux a Pognan, 2003; Mathis a kol, 2005).

Výsledky našich experimentů, kdy jsme perorálně infikovali SCID a BALB/c myši a poté je připustili v akutní nebo chronické fázi infekce, nebo kdy jsme intraperitoneálně injikovali spory mikrosporidií již zabřezlým myším, zprvu neprokázaly přenos mikrosporidií přes placentu. Vyšetření byly podrobeny jak plody vyjmuté pomocí císařského řezu, tak mláďata ihned po narození. Přestože matky vykazovaly systémovou mikrosporidíózu, molekulární testy nepotvrdily přítomnost mikrosporidií v tkáních mláďat.

Následující experimenty, ve kterých jsme mláďata přenesli ihned po porodu k náhradní neinfikované matce, již přenos mikrosporidií přes placentu prokázaly. Vyšetřované orgány SCID mláďat, jež byla usmrcena až 3. týden života, byly pozitivní na přítomnost specifické mikrosporidiální DNA. Ovšem u 6 týdnů starých mláďat BALB/c myši, jež také byla přenesena k náhradní neinfikované matce, nebyla přítomnost mikrosporidií potvrzena. Teprve po aplikaci imunosupresiva Depo-medrolu BALB/c mláďatům (28. a 38. den po porodu) došlo k vytvoření příznivých podmínek pro pomnožení parazita a tím byly v době pitvy pozitivní všechny vyšetřované orgány. Je tedy zřejmé, že velmi malé množství spor, které ovšem není detekovatelné ani molekulárními metodami, prochází přes placentu a potřebují čas a podmínky pro pomnožení. Je zde také možnost ochrany mláďat mateřskými protilátkami (Owen a Gannon, 1980). Ovšem po jejich vymizení mají mikrosporide šanci se prosadit.

Závěry

- průběh infekce závisí nejenom na imunologickém stavu hostitele, ale také na genotypu mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi*;
- *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III má rychlejší nástup infekce než v případě *E. cuniculi* genotyp II; již první týden po infekci jsou všechny nebo téměř všechny orgány pozitivní na přítomnost parazita;
- počet pozitivních orgánů je vždy vyšší u infekcích způsobených *E. cuniculi* genotypem III, přesto se imunodeficitní SCID myši dožívají déle než s infekcí *E. cuniculi* genotyp II;
- zatížení jednotlivých orgánů mikrosporidii *E. cuniculi* genotyp III je o řád vyšší než v případě infekce *E. cuniculi* genotyp II;
- léčba albendazolem u imunokompetentních myší způsobí snížení počtu parazitů pod hranici detekce pomocí konvenční PCR (jsou-li infikovány *E. cuniculi* genotypem II), u imunodeficitních myší dojde pouze k prodloužení života hostitele o několik týdnů;
- léčba albendazolem imunokompetentních BALB/c myší infikovaných *E. cuniculi* genotypem III vedla ke snížení počtu infikovaných orgánů pouze dočasně; dva týdny po ukončení léčby dochází opět k diseminaci parazita v těle hostitele;
- z experimentů s knockout myšmi vyplývá důležitost buněčné imunity, především CD8 T lymfocytů, v boji proti mikrosporidii;
- transplacentální přenos parazita byl prokázán až několik týdnů po narození (u mláďat SCID myší) nebo po aplikaci imunosupresiva Depo-medrolu (u mláďat imunokompetentních BALB/c myší); z toho vyplývá, že k přenosu mikrosporidii přes placentu dochází.