

Vědomostní test

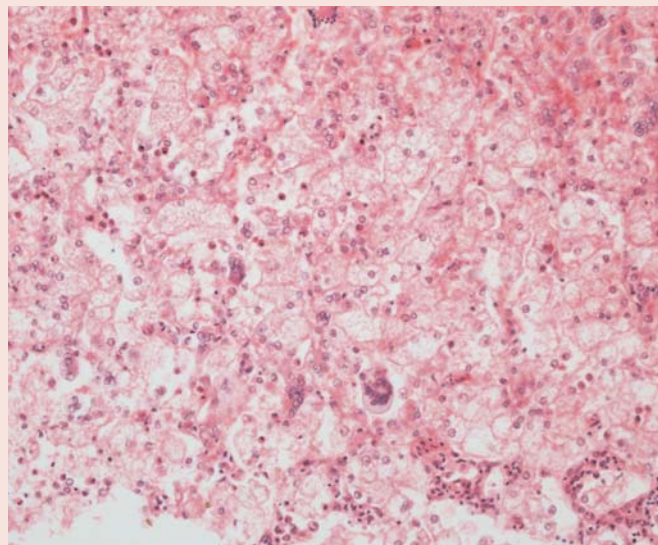
Klinický případ:

V chovu profesionálního chovatele došlo k neočekávanému úhynu dvou, do té doby zdravých, dvouletých mláďat želv čtyřprstých (*Testudo horsfieldii*). Jednalo se o mláďata z českého odchovu. Klinické symptomy (anorexie, průjem aj.) před úhynem majitel nepozoroval. Majitel chová několik desítek želv různých druhů. Uhynulá mláďata byla v chovu šest měsíců, byla chována v separovaném venkovním výběhu přechodně dohromady s želvami pardálními (*Stigmochelys pardalis*) a následně v teráriu odděleně od ostatních želv. Parazitologické vyšetření trusu všech jedinců postižené skupiny bylo před úhynem provedeno dvakrát v odstupu 14 dnů a bylo pokaždé bez nálezu. K pitvě byla na kliniku doručena jedna ze dvou uhynulých želv asi 6 hodin post mortem. Podle pozorování majitele přijímala želva ještě 24 hodin před smrtí potravu.

Při pitvě byla zjištěna výrazně zvětšená játra. Celý orgán vykazoval nepravidelné žluté skvrny, zbytek parenchymu byl převážně světle červený (obr. 1). Výživný stav želvy byl dobrý, ostatní orgány byly makroskopicky bez nálezu. Histologické vyšetření jater prokázalo změny patrné na obrázku 2 (barveno HE, zvětšení 100x).



Obr. 1 – Makroskopický pitevní nález



Obr. 2 – Histologický nález játra, barveno HE, zvětšeno 100x

Otázky:

1. Jaká je Vaše diagnóza s ohledem na makroskopický a mikroskopický nález?
2. Jaká je etiologie, patogeneze, diagnostika a terapie tohoto onemocnění u želv?

Vědomostní test připravili:

MVDr. Jan Hnízdo, Praha
 Dr. med. vet. Nikola Pantchev, FTA parazitologie, VetMedLab, Ludwigsburg
 Prof. MUDr. Ondřej Hes, PhD, ŠPAÚ, FN Plzeň
 Animal Clinic
 Čistovická 44
 16300 Praha 6
www.animalclinic.cz

Správné odpovědi najdete na str. xx

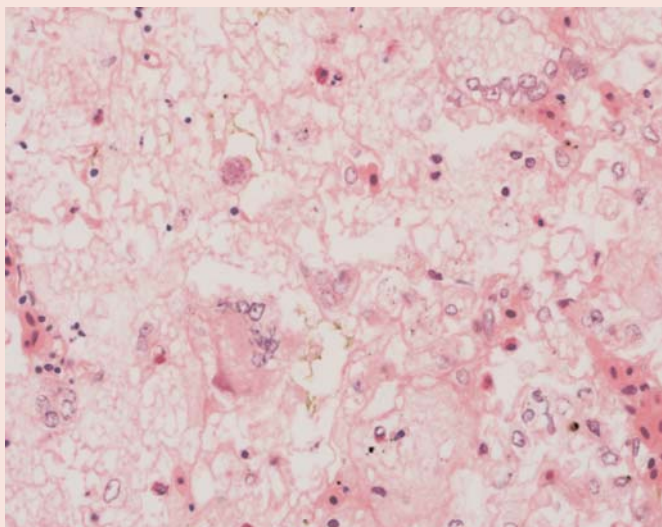
Vědomostní test – odpovědi

Odpověď na vědomostní test na str. xx

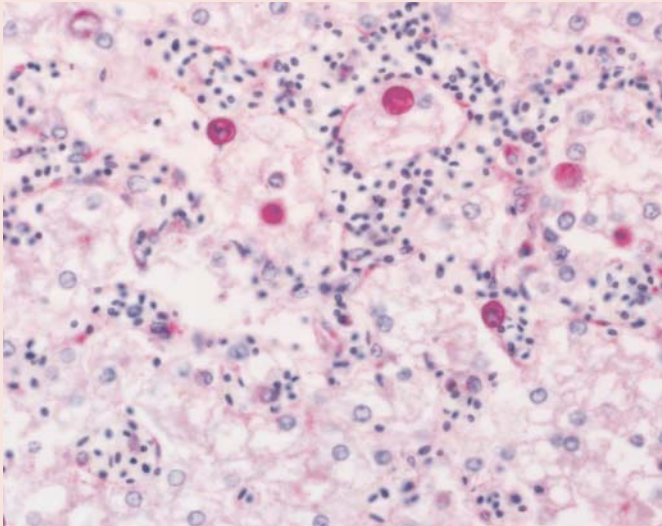
Ad.1. Hepatomegalie, vysoce suspektní hepatitida. Histopatologický nálezn: játra vykazují výraznou velko i malokapénkovou steatózu, četné zánětlivé elementy a mnohočetné améby roztroušené v parenchymu a koncentrované kolem rozpadavé léze s iniciální tvorbou abscesové dutiny v jaterním parenchymu (obr. 3). Jedná se o destruktivní hepatitidu, respektive abscedující amebiázu s četnými PAS pozitivními amébami v jaterním parenchymu (obr. 4).

Ad. 2. Akutní záněty jater pozorujeme u želv pravidelně, většinou v souvislosti se systémovou bakteriální nebo virovou infekcí. Améby jsou všeobecně považovány u hadů a ještěřů za klinicky významný primární patogen. U herbivorních želv se naproti tomu nález améb v trusu považuje často za klinicky irelevantní.

Onemocnění jater může být u želv primární, mnohem častěji ovšem dochází k sekundárnímu postižení jater následkem jiných infekčních onemocnění, zvláště ale



Obr. 3 – Histologický nálezn, barveno HE, zvětšeno 400x



Obr. 4 – Histologický nálezn, barveno PAS, zvětšeno 400x

v souvislosti s neinfekčními, metabolickými chorobami. Proto také neexistuje jednotný klinický obraz jaterního onemocnění u želv. Postižení jedinci mohou být po dlouhou dobu klinicky zcela nenápadní. Také je určitý stupeň steatózy jater u mediteránních druhů želv na podzim považován za fyziologický (játra jako rezervní orgán).

Zánětlivé změny jater vznikají u želv při:

- A. Neinfekčních chorobách (zvláště žloutková serocoelomitida)
- B. Intoxikacích (rostlinné jedy, mykotoxiny, pesticidy, farmaka)

C. Infekcích:

1. Virové hepatitidy
2. Bakteriální infekce
3. Mykotické infekce
4. Protozoální infekce

V souvislosti se systémovými infekcemi vznikají akutní hepatitidy nebo miliární mikroabscesy, respektive granulomy (mykobakterie).^{1,2} Občas vznikají septické tromboembolizace a následné ischemické infarkty jater. Fokální záněty (abscesy a granulomy) nebo hnisavé afekce, které infiltrují játra z okolních tkání, nacházíme vzácněji.³

Patogeny, které způsobují hepatitidy, jsou bakterie (např. *Salmonella sp.*, *Aeromonas sp.*, chlamydie), plísňe (např. *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*) a zvláště viry (Herpes- a Ranaviry).^{2,4-6}

V prezentovaném případě byla původcem hepatitidy suspektně *Entamoeba invadens*. Zda se na onemocnění podílela (sekundární) bakteriální infekce není jasné.

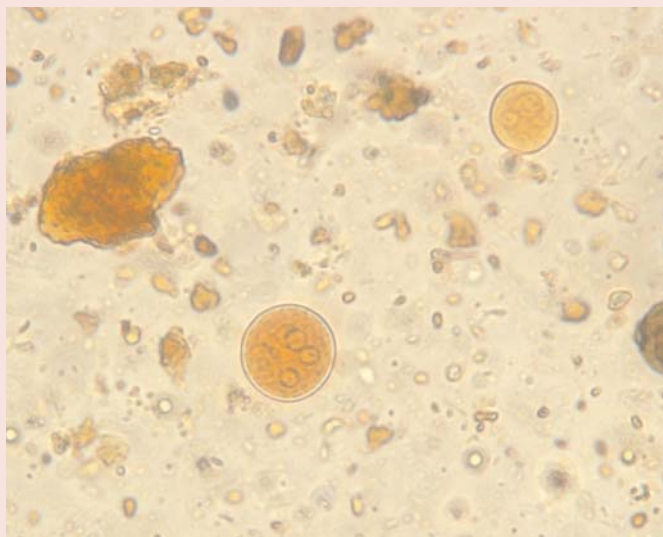
Entamoeba spp. patří u plazů k nejvýznamnějším příčinám úhynu způsobeným parazity v zajetí.⁷⁻⁹ *Entamoeba invadens* byla určena některými autory jako příčina úhynu sice jen u 1% vyšetřených želv, ale naproti tomu u 23,7 % ještěřů a 53,6 % hadů.¹⁰

Morfologicky odlišujeme různé améby podle počtu jader ve zralých cystách z trusu (jedno- čtyř- a osmijaderné skupiny). Nejdůležitější je s ohledem na patogenitu čtyřjaderná skupina. Existuje v této skupině několik druhů u plazů, tyto druhy také vykazují odlišné genové sekvence.

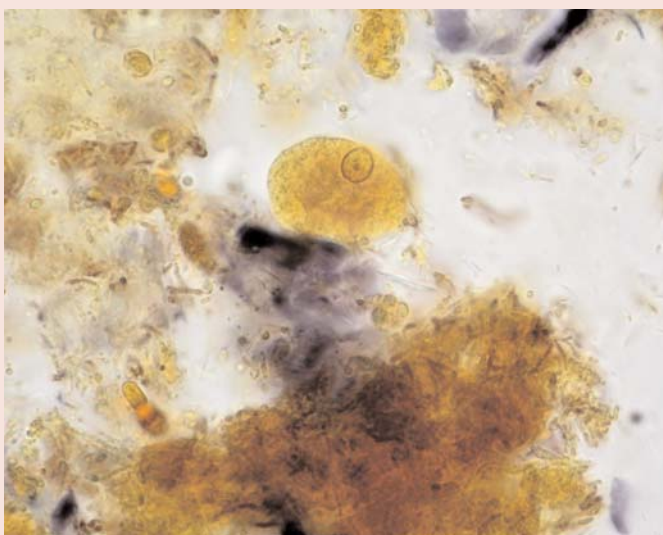
Entamoeba invadens je velice podobná *Entamoeba histolytica* a *Entamoeba dispar* u člověka a odlišení je možné pomocí kultivace. *E. invadens* roste přednostně při 20 °C – 30 °C a kultura uhynie při 37 °C, naproti tomu pro růst kultury *E. histolytica* jsou optimální teploty při 35 °C – 38 °C. To je také důvod proč je často při terapii plazů s *E. invadens*-infekcí doporučováno navýšení tělesné teploty pacienta na 35 °C.

Zralé, infekční cysty jsou 11 – 20,2 μm velké a mají čtyři jádra s malým centrálním karyosomem (obr. 5). Naproti tomu vykazují trofozoity (9,2 – 38,6 μm x 9 – 30 μm) jen jedno jádro (3,4 – 7,5 μm), které má rovněž malý, centrální karyosom (obr. 6).

K infekci *E. invadens* dochází pozřením cyst, které mohou přežívat v okolí 14 dní a déle (při 8 °C) a několik dní při 37 °C.¹¹ Produkce cyst je největší u latentně infikovaných želv. V zažívacím traktu vzniká z osmijaderného stádia (metacystické formy) osm jednojaderných améb průměru 10 – 35 μm, které se rozmnožují dělením. *E. invadens* osídluje převážně



Obr. 5 – Cysty *Entamoeba invadens* z trusu suchozemské želvy (nativní nátěr barvený jódem, zvětšeno 1000 x)



Obr. 6 – Trophozoit *Entamoeba invadens* (zvětšeno 1000 x)

střevo, přesto je schopna hematogenní cestou vnikat do jater, sleziny, ledvin a plic. Na rozdíl od *E. histolytica* u člověka nevytváří magna-formy. Jen některé kmeny *E. invadens* jsou virulentní, navíc existují velké rozdíly ve virulenci stejného kmene u různých druhů plazů.¹² Diferenciálně diagnosticky přichází v úvahu *E. testudinis* (isolováno z *Testudo graeca*, trophozoit větší: 50 – 70 μm s jádrem 11,5 – 12,5 μm), *E. serpentis* (morfologicky identická s *E. invadens*), *E. terrapinae* (izolovaná z *Trachemys elegans*, je menší než *E. invadens* s trophozoitem velikosti 10 – 15 μm a jádrem 2 – 4 μm , vykazuje navíc jinou genovou sekvenci), *E. histolytica/E. dispar* (také odlišné genové sekvence), *E. ranarum* a *E. varani* (jsou morfologicky identické ale *E. ranarum* vykazuje odlišnou genovou sekvenci).^{13,14} Dle SILBERMANA & al.¹³ byla izolována ještě další dvoujaderná améba z želv, která vykazovala jinou genovou sekvenci než *E. invadens*. Jedná se o *E. insolita* izolovanou z Galapážské obří želvy (*Geochelone elephantopus*).¹⁵

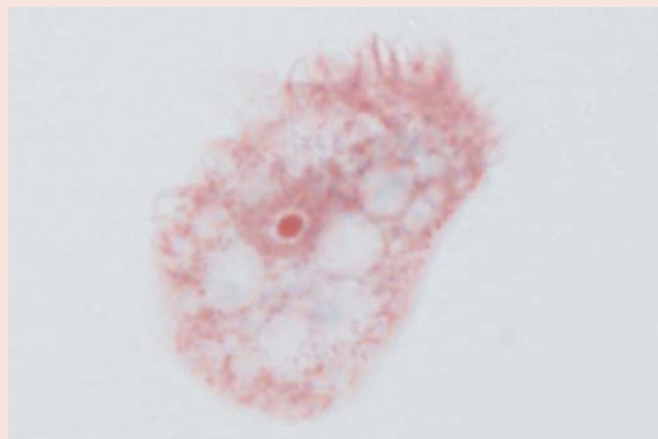
V souboru vzorků druhého autora byly u želv v trusu prokázány i cysty *Entamoeba* spp. s osmi jádry. Tyto améby měly podobnou morfologii jako *Entamoeba coli* u primátů

a *Entamoeba muris* u hlodavců (každé jádro vykazovalo malý, periferní karyozom). Améby z osmijaderné skupiny se považují za apatogenní a neinvazivní, omezují se tedy na střevní lumen. Popsána byla například *Entamoeba barreti* u kajmanky (*Chelydra serpentina*).

V trusu plazů nacházíme také améby, které jsou volně žijící (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia* nebo *Echinamoeba*).¹⁶ Všechny tyto Limax-améby tvoří trofozoity a cysty, rod *Naegleria* vytváří navíc plovoucí formy s dvěma bičíky.^{17,18} *Naegleria* spp. tvoří pro Limax-améby typické cysty (8 – 30 μm) s jedním jádrem, které vykazuje velký karyozom a pulzující vakuolu. Na rozdíl od kulatých cyst od *Naegleria* spp., jsou cysty od *Acanthamoeba* spp. polygonální. Trofozoity různých rodů vykazují odlišnosti ve tvaru buňky; *Acanthamoeba* spp. tvoří trofozoity s mnoha špičatými pseudopodiemi (obr. 7). *Naegleria* spp. žijí ve sladké vodě, *Acanthamoeba* spp. žijí v zemi, písku, ale i ve vodě. Zvláštností volně žijících améb je jejich vysoká termotolerance (až do 40 °C).¹⁶ Tyto druhy jsou schopny se množit i v těle savců, tvoří tudíž potenciální zdravotní riziko pro člověka. Cysty Limax-améb jsou velice odolné ve venkovním prostředí a obsahují často i potenciálně patogenní bakterie (např. *Pseudomonas*, chlamýdie nebo mykobakterie).¹⁹ HASSL @ al.¹⁶ prokázali v cystách od *Acanthamoeba* spp. z matamaty (*Chelus fimbriatus*), *Citrobacter braakii*, *Alcaligenes denitrificans* a *Pseudomonas* spp. V terapii těchto želv našli termotolerantní *Acanthamoeba lenticulata* a *Acanthamoeba triangularis*.

U Limax-améb nalezených v trusu plazů se jedná o střevní pasanty, které jsou pozřeny se substrátem nebo vodou, nebo jde o komensály, kteří alespoň přechodně osídlují zažívací trakt. V zažívacím traktu nehrají žádnou roli.

Entamoeba-invadens infekce probíhá u herbivorních želv velice často bez klinických symptomů, u karnivorních ještěřů a u hadů může mít ovšem fatální dopady. U nemocných jedinců jsou běžnými symptomy anorexie, hubnutí, krvavý, hlenovitý trus a zvracení. Vyskytují se střevní intususcepce a palpačně zjevné zbytnění stěny tlustého střeva jako následek kolitidy (zvláště u hadů). Diferenciálně diagnosticky je nutno zvážit bakteriální nebo mykotickou enteritidu a helmintózy, které jsou ovšem spojené s nižší mortalitou.²⁰ *E. invadens* může způsobovat u želv různých druhů (vodních i suchozemských) symp-



Obr. 7 – Trophozoit od *Acanthamoeba* sp. z amébové kultury (barvení Trichrom, zvětšeno 1000 x, foto Bulantová, PřvFUK, Praha)

tomy, i když se považují améby u suchozemských želv všeobecně za komenzály.⁹ V jednom případě uhynulo z celkového počtu 500 želv uhlířek (*Chelonoidis carbonaria*), které byly importovány do jižní Floridy celkem 200 jedinců v rozmezí dvou měsíců za symptomů anorexie, apatie a průjmu. Pitvy prokázaly nekrózu duodenální sliznice a multifokální jaterní nekrózu. Stejně jako v našem případě byla *E. invadens* prokázána histologicky v jaterním parenchymu a navíc v dvanácterníku.²¹ Z výše uvedených symptomů nebyl u zde prezentované želvy čtyřprstý pozorován žádný další. U našeho pacienta bohužel nebylo provedeno histologické vyšetření dvanácterníku, makroskopicky nevykazoval zažívací trakt žádné změny. Také není k dispozici pitva druhého uhynulého mláděte. *E. invadens* byla popsána také jako příčina kolitidy i s následnými úhyny u želv druhů *Gopherus polyphemus* a *Stigmochelys pardalis*.^{22,23} Zda došlo v našem případě k přenosu více patogenních améb z inaparentních nosičů (*Stigmochelys pardalis*) na nově přikoupená mláďata *Testudo horsfieldii* je spekulativní.

V našem případě nebyly améby u postiženého jedince prokazatelné v trusu. Barvením nativního vzorku trusu (pouze čerstvý průjmový trus) jodem lze identifikovat u mnoha infikovaných jedinců cysty a trofozoity. U pacientů vylučujících malé množství cyst se doporučuje koncentrace pomocí SAF metody nebo kultivace.²⁴ Bohužel v současnosti není možná rutinní kultivace na améby v žádné dostupné laboratoři. Definitivní antemortem diagnóza *E. invadens* infekce způsobuje nadále potíže, zvláště kvůli podobnosti nepatogenních nebo málo patogenních druhů améb. Jedinou, poměrně nákladnou možností je coelioskopická biopsie jater, senzitivita tohoto vyšetření u želv ovšem není jasná. Specifická diagnostika *Entamoeba* spp. by byla důležitá s ohledem na časté chybné diagnózy amebiázy, respektive zbytečnou terapii při nálezu apatogenních druhů améb. V rutinní diagnostice, která se v současnosti zakládá pouze na morfologických kritériích, by měly být považovány améby s čtyřjadernými cystami a trofozoity odpovídající velikosti za suspektní *E. invadens*.

Terapie amebiázy je založena na aplikaci metronidazolu (125 mg/kg, 1 x denně), samotná léčba metronidazolem ovšem podle našich zkušeností není dostačující. Paromomycin (33 – 55 mg/kg p. o., jednorázově a opakování po týdnu) se často používá v kombinaci s metronidazolem, protože má stejně jako jodoquinol (25 – 50 mg/kg p. o., 1 x denně) lepší účinek na luminální formy a cysty, protože se tyto látky, na rozdíl od metronidazolu ve střevě téměř nevstřebávají. Metronidazol vykazuje dobrý účinek vůči trofozoitům a extraintestinálním stádiím. Je vhodné současně s chemoterapií zvýšit okolní teploty v teráriu na 35 °C. Také musí být dbáno na kontinuální rehydrataci. Protože probíhá amebiáza často současně s bakteriální infekcí, je doporučována aplikace antibiotik (například enrofloxacin 10 mg/kg, 1 x denně). Všichni jedinci chovaní v postižené skupině by měli být léčeni současně. V případě amebiázy želv je doporučována 20ti denní kombinační terapie metronidazolem a jodoquinolem⁹: u vodních želv 5 dní metronidazol a jodoquinol, 5 dní pouze jodoquinol, 5 dní opět obě látky, následně 5 dní jen jodoquinol. U suchozemských herbivorních želv se doporučuje třídenní aplikace jodoquinolu a metronidazolu v kombinaci, dále 14 dní samotného jodoquinolu a následně opět třídenní aplikace obou preparátů. U anorektických želv aplikujeme

většinou permanentní esofagostomické sondy, pomocí kterých podáváme léky a výživu. Současně je nutná dekontaminace prostředí: tepelné ošetření > 52 °C ničí cysty bezpečně, tudíž stačí ošetření ploch horkou vodou či párou.⁹

Dobrá hygiena v teráriu je navíc důležitá pro další přenos mezi jinými jedinci v chovu. Protože je v okamžiku diagnózy amebiázy pro efektivní terapii často již příliš pozdě, sledujeme o to důležitější profylaktické opatření: striktní hygiena (dezinfekce rukou a nástrojů) kontrola bezobratlých jakožto mechanických vektorů (například mouchy nebo švábi) a zásadně neslučovat různé druhy plazů v jednom teráriu, zvláště ne želvy s druhy ještěřů či hadů. Samozřejmostí je striktní karanténa pro nově přikoupené jedince.

Literatura:

1. Angus, K. W. Granulomatous hepatitis in tortoises. *Vet Rec* 2005;157(11):328.
2. Gonzales, C. M., Martin, A. P., Pallares, F. J. & V. L. Leon Granulomatous hepatitis cause by Salmonella typhimurium in a spur-tighted tortoise (*Testudo graeca*). *Vet Rec* 2005;157(11): 236-237.
3. Will, R. Kurze Beschreibung der Lebererkrankungen (Nosologie) der Reptilien. *Zbl Vet Ed B*, 1975;22,626-634.
4. Hervas, J., Sanchez-Cordon, P. J., de Chacon, L. F., Carrasco, L. & J. C. Gomez-Villamandos. Hepatitis associated with herpes viral infection in the tortoise (*Testudo horsfieldii*). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002;49(2):111-114.
5. Jacobson, E. R. Infectious Diseases and Pathology of Reptiles. Boca Raton (CRC- Taylor and Francis Group) 2007:716.
6. Johnson, A. J., Pessier, A. P. & E. R. Jacobson. Experimental transmission of ranaviral disease in Western Ornate box turtles (*Terrapene ornata ornata*) and red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Vet Pathol* 2007;44(3)285-297.
7. Kaneene, J. B., Taylor, R. F., Sikarskie, J. G., Meyer, T. J., Richter, N. A. Disease patterns in the Detroit Zoo: a study of reptilian and amphibian populations from 1973 through 1983. *J Am Vet Med Assoc* 1985;187:1132-1133.
8. Ippen, R. Ein Überblick über die parasitären Befunde bei Reptilien.- DVG-Tagung FG Kleintierkrankheiten „Grundlagen der Reptilienmedizin“. Berlin 17. 10. 1992:1992;33-40.
9. Bonner, B., Denver, M., Garner, M. & C. Innis. Entamoeba invadens. *J Herpet Med Surg* 2001;11:17-22.
10. Sassenburg, L. & P. Zwart. Schildkröten. In: Fehr, M., Sassenburg, L. & P. Zwart (Hrsg.) Krankheiten der Heimtiere. Schlütersche; Hannover, 2005:1017.
11. McConachie, E. W. Studies of Entamoeba invadens Rodhain, 1934 in vitro, and its relationship to some other species of Entamoeba. *Parasitology* 1955;45:452-481.
12. Steck, F. Die Amoebensystematik der Reptilien, Aetiologie, Epidemiologie, Diagnostik und Bekämpfung). *Acta Tropica, Separatum* 1963;20(2):115-142.
13. Silberman, J. D., Clark, C. G., Diamond, L. S. & Sogin. Phylogeny of the genera Entamoeba and Endolimax as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol* 1999;16(12):1740-51.
14. Richter, B., Kübber-Heiss, A. et H. Weissenböck: Diphtheroid colitis in a Boa constrictor infected with amphibian Entamoeba sp. *Vet Parasitol* 2008;153(1-2):164-7. Barnard, S. M., Upton, S. J. A Veterinary Guide to the Parasites of Reptiles – Volume 1: Protozoa. Krieger Publ Comp; Malabar, FL 1994:154.
15. Geiman, Q. M. & Wichterman, R. Intestinal protozoa from Galapagos tortoises (with descriptions of three new species). *J Parasitol* 1937;23:331-347.
16. Hassl, A., Benyr, G. & Appelt. Freilebende Amöben als opportunistische Darmparasiten von Reptilien. *Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol* 2000;22:49-54.
17. Pantchev, N. Vorkommenshäufigkeit von Endoparasiten bei Reptilien (Schildkröten, Echsen, Schlangen) in Menschenobhut aus der Sicht eines Untersuchungslabors. *Kleintiermedizin*. 2008;9/10:261-270.
18. Pasmans, F., Blahak, S., Martel, A., Pantchev, N. Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian. *Vet J* 2008;175(1):53-68.
19. Eckert, J., Friedhoff, K. T., Zahner, H., Deplazes, P. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke; Stuttgart, 2005:575.
20. Marcus, L. C. Veterinary Biology and Medicine of Captive Amphibians and Reptiles. Philadelphia; Pennsylvania (Lea and Febiger), 1981:239.
21. Jacobson, E., Clubb, S. & Greiner, E. Amebiasis in red-footed tortoises. *J Am Vet Med Assoc* 1983;71(33)183:1192-4.
22. Philbey, A. W. Amoebic enterocolitis and acute myonecrosis in leopard tortoises (*Geochelone pardalis*). *Vet Rec* 2006;158(16):567-569.
23. Bradford, C. M., Denver, M. C., Cranfield M.R. Development of a polymerase chain reaction test for Entamoeba invadens. *J Zoo Wildl Med* 2008;39(2):201-7.
24. Frank, W. Amphibien und Reptilien. In: Isenbügel, E. & W. Frank (Hrsg): Heimtierkrankheiten. Ulmer; Stuttgart, 1985;161-402.