

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity  
v Českých Budějovicích



Bakalářská práce

**Mikrosporidiové infekce prasat**

Vypracovala: Zuzana Papáčková

Vedoucí práce: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

České Budějovice, 2008

**Papáčková Z., 2008:** Mikrosporidiální infekce prasat. [Microsporidial infection of pigs]. 39 pp., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Czech Republic.

Annotation:

Microsporidial infection of pigs is caused by *Enterocytozoon bieneusi* most frequently. Various genotypes of this parasite infect large groups of animals. Some genotypes infect both people and pigs, implying the zoonotic potential of *E. bieneusi*.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 23.4. 2008

Zuzana Papáčková

.....

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především mému školiteli RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady a trpělivost. Díky patří také celému kolektivu laboratoře lékařské parazitologie za vytvoření přátelské atmosféry.

## **OBSAH:**

<b>1 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>5</b>
<b>2 LITERÁRNÍ REŠERŠE.....</b>	<b>6</b>
2.1 Morfologie.....	6
2.2 Životní cyklus.....	7
2.3 Taxonomie.....	8
2.4 Epidemiologie.....	9
2.4.1 Prevalence a geografická distribuce.....	9
2.4.2 Zdroje infekce a její přenos.....	9
2.5 Klinické projevy při mikrosporidiióze.....	11
2.6 Diagnostické metody.....	12
2.6.1 Transmisní elektronová mikroskopie.....	12
2.6.2 Světelná a fluorescenční mikroskopie.....	13
2.6.3 Histologie.....	13
2.6.4 Buněčné kultury.....	14
2.6.5 Zvířecí modely.....	14
2.6.6 Detekce antigenu.....	15
2.6.7 Detekce protilátek.....	15
2.6.8 Molekulární studie.....	15
2.6.9 Hybridizace.....	16
2.7 Terapie.....	16
2.8 Enterocytozoon bieneusi.....	17
2.8.1 Zoonotický potenciál Enterocytozoonu bieneusi.....	18
2.8.2 Enterocytozoon bieneusi u prasat a jiných hospodářských zvířat.....	19
<b>3 METODY.....</b>	<b>24</b>
3.1 Detekce spor v trusu.....	24
3.2 Molekulární charakteristika mikrosporidiálních druhů a genotypů.....	24
3.2.1 Izolace DNA.....	24
3.2.2 Molekulární identifikace a charakterizace E. bieneusi.....	24
<b>4 DISKUSE.....</b>	<b>26</b>
<b>5 ZÁMĚRY DO BUDOUCNA.....</b>	<b>28</b>
<b>6 SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>29</b>

# **1 CÍLE PRÁCE**

1. Kriticky zpracovat literární rešerši k tématu
2. Analyzovat hlavní problémy tématu s návrhem dalších možností výzkumu
3. Rozpracovat podrobnou metodiku budoucí experimentální práce

## 2 LITERÁRNÍ REŠERŠE

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární paraziti, kteří infikují řadu obratlovců i bezobratlých. V roce 1857 byli tito paraziti poprvé studováni u bource morušového (Naegeli 1857). Mikrosporidie patří do kmene Microsporidia, který zahrnuje přes 1200 druhů řazených do 150 rodů (Keeling and Fast 2002). Dříve byly mikrosporidie považovány za jedny z nejstarších vývojových větví a řazeny mezi Protozoa. Na základě genetických a molekulárních důkazů jsou řazeny dnes do říše Fungi (Cavalier-Smith 1998). První případ lidské mikrosporidiové infekce byl zaznamenán v roce 1959 (Matsubayashi et al. 1959). Do roku 1985 bylo popsáno pouze 10 dobře zdokumentovaných případů lidské mikrosporidiózy, kdy byl u HIV-infikovaných pacientů ve Francii objeven nový druh *Enterocytozoon bienuesi* (Desportes et al. 1985). Od tohoto data bylo zaznamenáno mnoho mikrosporidiálních infekcí po celém světě a tento parazit je nyní studován jako jeden z nejběžnějších patogenů u HIV-infikovaných pacientů (Asmuth et al. 1994). Mikrosporidie mohou u člověka vyvolat různé nemoci postihující nejrůznější orgánové soustavy. Mohou způsobit intestinální, oční, plicní a svalová onemocnění u imunodeficitních, ale i u imunokompetentních jedinců (Weber et al. 1994).

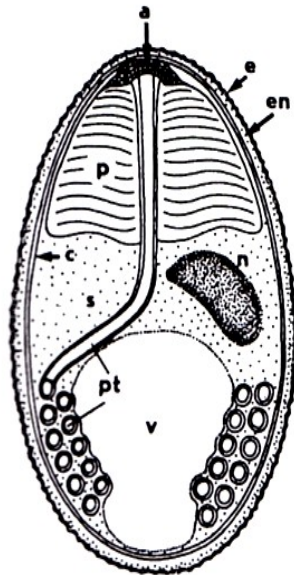
### 2.1 Morfologie

Infekční stádia u mikrosporidií tvoří spóry oválného tvaru. Slouží k infekci nového hostitele nebo k autoinfekci, tedy napadení dalších zdravých buněk téhož hostitele. Velikost spor se pohybuje mezi 1 až 20  $\mu\text{m}$ . Druhy, které infikují obratlovce, bývají většinou menší a to asi 1 až 3  $\mu\text{m}$ . Stěna je silná a skládá se ze 3 vrstev: elektron-denzní exospóry tvořené proteiny, elektron-lucentní endospóry tvořené chitinem a plazmatické membrány obklopující cytoplazmu, jádro (někdy i dvě), vakuoly, membránu polaroplastu a vystřelovací aparát (Cali 1991).

Vystřelovací aparát se skládá ze stočené pólové trubice a kotevního disku, který je charakteristický pro všechny mikrosporidie. Stavba a uspořádání závitů pólové trubice jsou specifické pro každý rod a druh. Za vhodných podmínek je pólová trubice vystřelena přes

tenký anteriorní konec spóry, tím vnikne do hostitelské buňky a do ní vypustí infekční sporoplazmu (Canning 1993).

Mikrosporidie nemají mitochondrie, peroxisomy a klasicky stavěný Golgiho komplex, jejich ribozomy se velmi podobají prokaryotním. Mají ale eukaryotní jádro, intracelulární membránový systém a chromozomy, které se při mitóze oddělují (Vossbrinck et al. 1987).



**Obr.1:** Schéma spóry mikrosporidií (podle Ergens et Lom 1970)

- a - kotvní disk
- c - cytoplazmatická membrána
- e - exospóra
- en - endospóra
- n - jádro
- p - polaroplast
- pt - pólová trubice
- s - sporoplazma
- v - posteriorní vakuola

## 2.2 Životní cyklus

Životní cyklus u mikrosporidií je poměrně jednoduchý. Přenos infekce může být přímý z jednoho hostitele na druhého, přičemž některé mikrosporidie vystřídají ve svém životním cyklu dva druhy hostitele. Jsou však i důkazy o přenosu vertikální cestou (Weber et al. 1994).

Přenos infekce je většinou zprostředkován ingescí, nebo inhalací spór. Jediné stádium mikrosporidií, které se nenachází uvnitř hostitelské buňky jsou infekční spóry. Po úspěšné infekci buňky dochází k množení sporoplasmu, z níž se vyvíjí meronty a sporonty. Vývoj mikrosporidií zahrnuje dvě odlišné fáze: proliferativní fázi (merogonii), při které dochází k masivnímu namnožení merontů uvnitř buňky, a sporogonní fázi (sporogonie), při níž sporonty produkují sporoblasty, ze kterých vznikají spóry (Franzen and Müller 1999). Některé sporonty se dělí na dva sporoblasty, které dávají vznik spórám (Current et al. 1989, Strano et al. 1976, Shaddock et al. 1989, Bryan et al. 1991).

Meronty jsou kulaté, nepravidelné nebo podlouhlé jednoduché buňky s malým množstvím diferenciované cytoplazmy uzavřené plazmatickou membránou. Mohou mít jedno nebo dvě synchronně se množící jádra, tzv. diplokaryon. Uvnitř hostitelské buňky dochází k dvojitmu nebo několikanásobnému dělení, což se nazývá merogonie. Dělení jádra může probíhat bez dělení buňky, což dává vznik několikajaderné plazmodiální formě, která se nazývá merogoniální plazmodium (Cali and Owen 1988).

Sporonty vznikají z merontů, mají oválný tvar a jsou charakteristické svým tlustým vnějším obalem. Z tohoto obalu později vzniká exosporová vrstva na stěně spóry. Sporonty se dělí dvojitým nebo několikanásobným dělením ve sporoblasty, ze kterých se nakonec vyvíjí dospělé spóry. Sporonty stejně jako meronty mohou mít jednoduché nebo dikaryontní jádro (Canning and Lom 1986). Během procesu vzniku spóry se vytváří orgány nezbytně nutné pro infikování dalších buněk: pólové trubice, kotevního disku, polaroplastu a zadní vakuoly (Van Gool et al. 1994).

Spóry se mohou šířit z buňky do buňky uvnitř hostitele, nebo mohou přecházet do tělních exkretů například do moči (Bryan et al. 1991). Moč na prstech pak může být přenesena do oka a tak může vzniknout oční infekce (Lowder 1993).

## 2.3 Taxonomie

Za mikrosporidie jsou označovány organismy, patřící do kmene Mikrosporidia, fylogeneticky blízké kmenu Fungi (Keeling et al. 2000). V roce 1882 Balbiani klasifikoval tyto parazity jako odlišnou skupinu Mikrosporidie (Balbiani 1882). Taxonomie mikrosporidií má však různé modifikace. Hlavní publikované klasifikace se značně liší charakteristikami, podle nichž byly mikrosporidie děleny (Sprague et al. 1992). Těmito charakteristikami mohou být ultrastrukturní rysy zahrnující velikost, morfologii spor, počet závitů pólové trubice, vývojové cykly a vztahy parazit-hostitel (Weiss and Vossbrinck 1998). Nejpoužívanější klasifikace byla navržena v roce 1977 a aktualizována v roce 1982 (Sprague et al. 1992). Podle ní se mikrosporidie dělí do dvou skupin podle toho, zda mají, či nemají parazitoforní membránu: třída Pansporoblastina, u kterých se membrána nachází, a Apansporoblastina, u nichž membrána chybí. V systému vyvíjejícím se v posledních letech jsou viditelné odlišnosti ve stavbě chromozomálního cyklu již v základních částech (Canning 1988). Byly navrženy komplexní změny v klasifikačním systému podle průběhu buněčného cyklu.



Mikrosporidie byly rozděleny na Dihaplophasea, které mají diplokaryon alespoň v některé fázi životního cyklu, a na Haplophasea, které mají nepárové jádro ve všech fázích cyklu (Sprague et al. 1992).

## **2.4 Epidemiologie**

### **2.4.1 Prevalence a geografická distribuce**

První dokumentovaný případ mikrosporidiální infekce byl zaznamenán v roce 1959 u japonského chlapce pracujícího na zvířecí farmě. Nemoc se projevovala bolestmi hlavy, křečemi a opakujícími se horečkami. Vyšetření mozkomíšního moku odhalilo organismus identifikovaný jako mikrosporodie, *Encephalitozoon* (Matsubayashi et al. 1959). Další dva případy se objevily v roce 1973 u imunodeficitního dítěte s nevyvinutým brzlíkem (Margileth et al. 1973). Mikrosporidie *Nosema connori* byla identifikována ve většině orgánů. V druhém případě se jednalo o infekci rohovky u jedenáctiletého chlapce ze Srí Lanky (Ashton et al. 1973). V letech 1959 až 1990 bylo zaznamenáno pouze 8 případů lidské mikrosporidiózy u imunokompetentních i imunodeficitních jedinců, kteří nebyli infikováni virem HIV (Friedberg and Ritterband 1999). Od roku 1985 bylo zaznamenáno více než 60 případů mikrosporidiálních infekcí u pacientů s chronickými průjmy a AIDS (Centre for Disease Control 1990).

Mikrosporidie jsou oportunní paraziti, kteří jsou celosvětově rozšíření. Případy mikrosporidiózy se vyskytly v rozvojových i vyspělých zemích zahrnujících Argentinu, Austrálii, Botswanu, Brazílii, Kanadu, Českou republiku, Francii, Německo, Indii, Itálii, Japonsko, Nizozemí, Nový Zéland, Španělsko, Srí Lanku, Švédsko, Švýcarsko, Thajsko, Ugandu, Velkou Británii, USA a Zambii (Bryan and Schwarz 1999). Nejvyšší záchytnost onemocnění u imunodeficitních jedinců je v severní Americe, západní Evropě a Austrálii (Weber et al. 1994).

### **2.4.2 Zdroje infekce a její přenos**

Mikrosporidie se do prostředí uvolňují ve stolici, moči a dýchacími sekrety. Cesty přenosu a zdroje mikrosporidiální infekce mohou být různé a to přes poranění, orální, dýchací cestou, nebo skrz oko jak bylo testováno u králíků (Cox et al. 1979), myši (Didier et al. 1994) a opic (Tzipori et al. 1997).

Přenos z člověka na člověka může být horizontální i vertikální. Vertikální přenos mikrosporidiózy z matky na potomstvo byl popsán u hlodavců, králíků, karnivorů a primátů (s výjimkou člověka) (Snowden et al. 1998, Snowden and Shaddock 1999, Didier et al. 1998). Tento přenos u lidí nebyl zaznamenán. Přítomnost mikrosporidií v dýchacím ústrojí a trávicím traktu nakažených jedinců a exkrece spór v moči a výkalech dokazuje možný horizontální přenos cestami, které zahrnují fekálně-orální, orálně-orální transmissi, inhalaci kontaminovaného aerosolu a příjem kontaminovaného jídla a vody (Bryan and Schwarz 1999, Mota et al. 2000, Weber et al. 2000, Deplazes et al. 2000). Dalšími nebezpečnými faktory horizontálního přenosu pro vznik mikrosporidiální infekce jsou homosexuální praktiky, intravenózní aplikace drog a kontakt s kontaminovou vodou (Hutin et al. 1998, Dascomb et al. 2000, Deplazes et al. 2000).

V minulosti neexistoval žádný přímý důkaz přenosu mikrosporidií ze zvířete na člověka. Až nyní bylo potvrzeno, že zvířecí druhy mikrosporidií mohou infikovat člověka (McInnes and Stewart 1991). *E. cuniculi* se běžně nachází u savců a *Encephalitozoon* spp. je příležitostně nalezen u ptáků rodu *Agapornis* (Canning 1988). *E. hellem* byl nalezen u papoušků (Black et al. 1997), *E. intestinalis* se objevil u různých savců (osli, psi, prasata, krávy, kozy) v Mexiku (Bornay-Llinares et al. 1998) a *Enterocytozoon bieneusi* byl nalezen v trusu hospodářských zvířat, především prasat, ale i u skotu (Deplazes et al. 1996, Rinder et al. 2000) a u v zajetí chovaných i vvolně žijících zvířat (Mansfield et al. 1997, Haro et al. 2005, [Ślodka-Kowalska et al. 2007](#)).

Přímý důkaz přenosu mikrosporidiózy ze zvířete na člověka byl zaznamenán u dítěte, které bylo vystaveno kontaktu s vrhu štěňat infikovaných *E. cuniculi* (McInnes and Stewart 1991). Druhy mikrosporidií nalézané u člověka byly identifikovány i u jiných druhů zvířat, což naznačuje pravděpodobnost přímého nebo nepřímého zoonotického přenosu (Bryan and Schwarz 1999, Deplazes et al. 2000).

Některé vlastnosti mikrosporidií naznačují možný přenos pomocí vody. Mikrosporidie infikující člověka mohou lehce opouštět hostitele s výkaly a močí. Tak mohou dále infikovat další zvířata a kontaminovat vodní zdroje. Mikrosporidiální spóry jsou odolné a ve vodě mohou přežít dlouhý čas. Spóry jsou malé a proto nejsou jednoduše odstranitelné filtrací. Jejich infekční dávka je relativně nízká (Franzen and Müller 1999). Mnoho druhů mikrosporidií infikujících člověka bylo nalezeno v různých vodních zdrojích jako jsou podzemní a povrchové vody. K nákaze může dojít při rekreačním koupání, z horkých pramenů a pitím (Hutin et al. 1998, Dascomb et al. 2000). Zvýšené procento nálezů bylo

zjištěno u lidí žijících v blízkosti rozvodných systémů (Cotte et al. 1999). Výsledky ze studie používající molekulární metody k identifikaci mikrosporidií objevily přítomnost *E. intestinalis*, *E. bienewisi*, *V. corneae* v kalech, odpadních vodách, povrchových i podzemních vodách ve Francii a USA (Down et al. 1998, Sparfel et al. 1997), což ukazuje na vodu jako možného původce mikrosporidiosis (Enriques et al. 1998).

Mikrosporidie patří mezi parazity, jejichž přenos je možný jídlem jako výsledek globalizace, rychlejšího transporu jídla, zvýšeným cestováním konzumentů a změnou jídelní struktury spotřeby (Slifko et al. 2000, Orlandi et al. 2002). Nákaza je možná příjmem nedovařeného masa (Hutin et al. 1998).

Nákaza je možná i pomocí vektoru, obvykle hmyzu. *Brachiola algerae* je přirozený patogen moskytů, který byl nalezen i u krys (Undeen and Alger 1976, Trammer et al. 1997).

## 2.5 Klinické projevy při mikrosporidiosis

Mikrosporidiosis je infekční onemocnění zahrnující gastrointestinální, pulmonální, nasální, okulární, muskulární, cerebrální a systémové infekce. Mikrosporidie způsobují závažná onemocnění u HIV-pozitivní a jinak imunosuprimovaných pacientů (Orenstein et al. 1997).

Gastrointestinální onemocnění a onemocnění žlučových cest bývají obvykle způsobená druhy *E. bienewisi* (Caramello et al. 1995), *Encephalitozoon* spp. (Chu et al. 1996) a *Nosema* (Mc Innes et al. 1993). Tito paraziti způsobují těžké, nekrvavé, nemukoidní průjmy, doprovázené pomalu postupujícím úbytkem hmotnosti, tuků, D-xylózy a vitamínu B12 (Cornet et al. 1996). Průjmy se objevují postupně a trvají několik měsíců. Pacienti často odmítají jídlo a mohou si stěžovat na žaludeční nevolnost (Kotler et al. 1990). S infekcí žlučníku souvisí cholangitida a cholecystitida (Willson et al. 1995). Diseminované infekce zahrnují těžké infekce močového systému, především ledvin (Dore et al. 1995).

Vedle gastrointestinálních infekcí je okulární infekce nejběžnější mikrosporidiální onemocnění člověka (Lowder 1993). Tyto infekce spočívají především ve vzniku keratokonjunktivitidy, která bývá nejčastěji způsobena druhy *E. hellem*, *E. cuniculi* a *E. intestinalis* (Cali 1991). Toto onemocnění se projevuje záněty spojivky a epiteliální keratopatií, která běžně vede k snížení ostrosti vidění. Keratokonjunktivitida má často mírný

průběh, ale mohou se objevit i těžká onemocnění, která mohou vést ke vzniku nádoru rohovky (Lowder 1993).

Pulmonální infekce jsou méně běžné, většinou asymptomatické. Infekce postihují dolní úseky dýchacích cest a mohou být často asociovány s branchiolitidou či pneumonií (Remadi et al. 1995). Někdy může infekce vést ke vzniku pneumonie a celkovému selhání dýchání (Weber et al. 1997). Tyto mikrosporidie jsou způsobeny zástupci rodu *Encephalitozoon* spp., avšak byly popsány případy, kdy původcem nákazy byl *E. bienersi* (De Aguila et al. 1997, Weber et al. 1992).

Cerebrální mikrosporidie je způsobena *E. cuniculi*. Projevuje se bolestmi hlavy, celkovou sešlostí, nevolností a zvracením (Weber et al. 1997). Tento druh může vyvolat i hepatitidu, která se projevuje vyčerpáním, průjmami a ztrátou hmotnosti. Objevuje se horečka a dochází k odumírání jaterních buněk (Tereda et al. 1987).

## 2.6 Diagnostické metody

Diagnostika lidských mikrosporidií je závislá na identifikaci spór ve vzorcích, jako jsou vzorky stolice, střevní tekutina a žluč, spojivkový výtěr, bronchoalveolární tekutina, sliny a hleny, tkáňové biopsie. Identifikace spór ve vzorcích je náročná, protože tyto organismy jsou velmi malé. Diagnostika lidských mikrosporidií prošla během posledních let velkými změnami. Původně byla založena na určení pomocí transmisní elektronové mikroskopie, ale v poslední době byly vyvinuty nové barvicí techniky, které jsou vhodné pro světelnou mikroskopii, a metody jako PCR a jiné molekulární detekce.

### 2.6.1 Transmisní elektronová mikroskopie

Původně celá diagnostika mikrosporidií vyžadovala ultrastrukturní vyšetření biopsie tkáně, vzorků tělních tekutin (moč, hleny, sliny, bronchoalveolární tekutina, střevní tekutiny, žluč, mozkomíšní mok) nebo vzorků stolice pro transmisní elektronovou mikroskopii, protože organismy jsou malé a mají odlišné barvicí charakteristiky (Croft et al. 1997, Curry and Canning 1993). Diagnostickým znakem mikrosporidií je jejich dobře viditelná unikátní ultrastruktura, kterou tvoří stočená pólová trubice. Identifikace do rodu a druhu je založena na strukturních rysech spóry, proliferujících formách, metodách dělení. V tkáni jsou často

pozorovatelná všechna stádia životního cyklu, zatímco ve vzorcích stolice můžeme vidět pouze spóry (Mc William and Curry 1990).

Detekce mikrosporidií pomocí transmisní elektronové mikroskopie je vysoce specifická, ale tato technika postrádá citlivost, zvláště u vzorků tělních tekutin a stolice. Podobně i příprava a vyšetření vzorků jsou velmi laboratorně i časově náročné (Carter et al. 1996, Connolly et al. 1991).

### **2.6.2 Světelná a fluorescenční mikroskopie**

Vyšetření vzorků pomocí světelné mikroskopie je nejčastěji rutinně používanou technikou pro zjištění mikrosporidií, ale rod a druh není tímto způsobem možné určit. Paraziti jsou viditelní jako oválné drobné útvary uvnitř buněk. Mikrosporidie obarvené pomocí Gramova barvení jsou Gram pozitivní (Friedberg et al. 1999) podobné kvasinkám, od nichž je lze odlišit speciálním barvením, např. Weberovým modifikovaným Trichromem (Weber et al. 1994). To odhalí zářivé růžovočervené spóry a většina z nich má výrazné šikmé nebo vodorovné pruhy a nemají žádné pučící struktury, což je jednoduše odlišuje od kvasinek.

Diagnostika v roztěru vzorku pomocí fluorescenční mikroskopie je poměrně rychlá a snadná. Používají se různé chemifluorescenční zjasňovače jako je Calcofluor nebo Uvitex, které se váží na chitin ve spórovém obalu mikrosporidií (Weber et al. 1994). Ačkoli je fluorescenční barvení více citivé než trichromové barvení, může vést k mylným pozitivním výsledkům způsobených podobností v barvení kvasinkových buněk.

### **2.6.3 Histologie**

Protože jsou spóry malé, závisí diagnostika mikrosporidií na odlišném kontrastu spór a ostatního celulárního obsahu. Spóry obarvené běžným hematoxylin-eosinovým barvením mohou být lehce přehlédnutelné i zkušenými patology (Mc William and Curry 1990). Tkáně se mohou barvit Gramovým, Brown-Brennovým, Brown-Hoppsovým barvením. Tyto metody jsou velmi vhodné pro barvení parafinových řezů (Kotler et al. 1994). Fluorescenční barvicí techniky s optickými zjasňovači jsou snadné a rychlé a citlivost těchto barvení je velmi vysoká. Hlavní výhodou těchto postupů je, že mohou být kombinovány s dalšími barvicími technikami (Conteas et al. 1996). Giemsovo barvení, barvení pomocí chromotropu 2R nebo fluorochromem se používají pro diagnostiku intestinálních mikrosporidií. Tyto metody však vyžadují čerstvé tkáně (Schwarz et al. 1994).

#### 2.6.4 Buněčné kultury

Možnost kultivace několika druhů mikrosporidií infikujících člověka nám usnadňuje pochopit biologické aspekty vztahu hostitel-parazit, imunologické odpovědi pro diagnostiku a určení druhu. Tkáňové kultury jsou také používány k určení účinnosti antimikrobiálních látek na některé druhy mikrosporidií (Beauvais et al. 1994, He et al. 1996). Kultury kombinované s ultrastrukturními, biochemickými, antigenními nebo molekulárními analýzami se používají k potvrzení infekcí způsobených již existujícím druhem mikrosporidie (Visvesvara et al. 1995), stejně jako k určení nových druhů (Shaddock et al. 1990). Avšak používání těchto běžných klinických diagnostik je časově náročné a pouze specializované laboratoře jsou schopné mikrosporidiální kultury udržet.

Mikrosporidie byly úspěšně kultivovány v mnoha savčích buněčných liniích zahrnujících opičí a králičí ledvinné buňky, lidské fetální plicní fibroblasty a několik ostatních buněčných linií (Visvesvara et al. 1991). Druhy, které byly kultivované z lidských vzorků, jsou *E. hellem* (Desser et al. 1992), *E. cuniculi* (Shaddock 1969), *E. ntestinalis* (Van Gool et al. 1994), *V. corneae* (Shaddock et al. 1990) a *T. homonis* (Hollister et al. 1996). Pokusy o vytvoření stabilní kultury *E. bieneusi* byly dosud neúspěšné. Neschopnost růstu *E. bieneusi* v kultuře může odrážet potřebu některých specifických nutričních faktorů, které dosud buněčné kultury nemohou poskytnout (Visvesvara et al. 1995).

#### 2.6.5 Zvířecí modely

Zvířecí modely tvoří základ pro studium imunitní odpovědi a pro hodnocení diagnostických metod, případnou vakcinaci, terapii a cesty přenosu (Didier et al. 1994). Používají se také pro produkci polyklonálních a monoklonálních protilátek (Visvesvara et al. 1994). Několik zvířecích modelů bylo vyvinuto pro studium mikrosporidiální infekce. Myši BALB/c a C57BL/6 jsou používány jako zvířecí model a jsou intraperitoneálně infikovány mikrosporidii rodu *E. cuniculi*, *E. hellem* a *V. corneae* (Gannon 1980). Myši SCID jsou infikováni orální cestou a to spórami *E. cuniculi* (Koudela et al. 1993). Zvířecí model pro infekci *E. bieneusi* je obtížné vyvinout. Experimentální orální infekce byla úspěšně provedena u opic (Tzipori et al. 1997) a u prasat (Kondova et al. 1998).

### 2.6.6 Detekce antigenu

Specifické mikrosporidiální antigeny se používají v imunofluorescenčních testech pro diagnostiku a druhové určení mikrosporidie. Polyklonální a monoklonální protilátky byly také použity ve Western blot analýze pro určení několika druhů mikrosporidií (Aldras et al. 1994). Tyto imunofluorescenční protilátkové testy se používají k rozpoznání druhově specifických priteinů ve stěně spor a pólové trubice mikrosporidie. Byly provedeny studie, které srovnávaly imunofluorescenční detekci s běžnými barvicími metodami, a tyto studie ukázaly menší citlivost imunofluorescence. Imunofluorescenční antigenová detekce by měla být používána jako potvrzující diagnostika, nebo u druhového určení až po počáteční diagnostice provedené běžnými barvicími metodami jako fluorescenční barvení nebo barvení chromotropem (Beauvais et al. 1994).

### 2.6.7 Detekce protilátek

Různé serologické testy byly vyvinuty pro detekci IgG a IgM protilátek u mikrosporidií, zvláště u *E. cuniculi*. Mezi tyto testy patří například CIA (carbon immunoassay), IFA (indirect immunofluorescence assay), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a Western blotting (Peacock et al. 1994, Hollister et al. 1991, Didier et al. 1993). Některé z těchto testů jsou běžně používané při detekci protilátek u některých druhů zvířat (Hollister et al. 1989, Henriksen 1986). Serologické testy byly používané i u lidí, ale zde není jisté, jedná-li se o skutečnou infekci, reakce, které nebyly způsobené parazitem, zkříženou reakci s dalšími mikrosporidii, nebo jinými mikroorganismy, nebo nespecifickou reakci (Weber et al. 1999). Serologická zkřížená reaktivita mezi mikrosporidii byla prokázána imunofluorescencí nebo Western blottingem (Weiss et al. 1992).

### 2.6.8 Molekulární studie

Molekulární studie mikrosporidií jsou na počátku vývoje. Používají se pro taxonomickou klasifikaci, fylogenetické studie a zvláště pro detekci a druhové určení mikrosporidií ve vzorcích (Franzen et al. 1999). Polymerázová řetězová reakce je založena na odlišnosti genů pro malou a velkou podjednotku ribozomální RNA a používá se v diagnostice a k určení druhů infikujících člověka (Katinka et al. 2002). Amplifikace DNA pomocí PCR nabízí dobrý přístup k diagnostice mikrosporidie s výhodou určení jednotlivých druhů

(Muller et al. 1999). Dalším krokem, přicházejícím po PCR je potvrzení nebo specifická identifikace produktů PCR. Tyto metody zahrnují sekvenování DNA, heteroduplexovou analýzu (metoda přímé diagnostiky DNA založená na tvorbě heteroduplexů mutovaného či nemutovaného vlákna) a RFLP (metoda zjišťování genetického profilu, dnes se již moc nepoužívá). Southern analýza (přenesení molekul DNA z gelu na membránu, lepší vizualizace výsledků z elektroforézy) může být také použita k určení *E. bienersi* (Vossbrinck et al. 1993).

### 2.6.9 Hybridizace

Hybridizace byla vyvinuta pro diagnózu infekce *E. bienersi* u lidí a experimentálně infikovaných SIV-pozitivních opic (Carville et al. 1997). Toto vyšetření opět sleduje gen pro malou podjednotku rRNA *E. bienersi*, která pomáhá určit odlišná mikrosporidiální stadia zahrnující plazmodia a spory. Tato metoda je citlivá, ale časově náročná (Velasquez et al. 1999).

## 2.7 Terapie

Dnes jsou známy dva druhy léků, které jsou primárně používány k léčbě lidských a zvířecích mikrosporidióz. Albendazol je benzimidazol, který má protihelminťovou a protihoubovou aktivitu a inhibuje polymeraci tubulinu. Tento lék je účinný pro druhy *Encephalitozoon*, které infikují savce včetně člověka, ale u druhu *E. bienersi* není účinnost zaručena (Kotler and Orenstein 1999, Contreas et al. 2000). Druhým lékem je fumagillin, který vzniká jako antibiotikum houby *Aspergillus fumigatus*. Je vysoce účinný při léčbě keratokonjunktivitid, způsobených druhem *Encephalitozoon* (Contreas et al. 2000, Chan et al. 2003). Fumagillin je velmi účinný při léčbě infekcí vyvolaných druhem *E. bienersi*, ale způsobuje neutropenie a trombocytopenie u některých pacientů, proto bývá používán jeho méně toxický analog TNP-470 (Molina et al. 2002, Coyle et al. 1998). Dalším lékem může být HAART (high active retroviral therapy), který úspěšně ničí mikrosporidiální infekce. Dále mohou být k léčbě mikrosporidióz použity furazolidon, sinefungin, azithromycin, itraconazol a otreotidin (Canning and Lom 1986, Kotler and Orenstein 1998, Kotler and Orenstein 1999, Contreas et al. 2000).



## 2.8 *Enterocytozoon bieneusi*

*Enterocytozoon bieneusi* byl poprvé popsán v roce 1985 u HIV-pozitivního pacienta (Desportes et al. 1985). Od té doby byl tento parazit shledán odpovědný za 30 až 50 % chronických průjmů a s tím souvisejících ztrát hmotnosti a malabsorbci (Shaddock and Orenstein 1993). Navíc bylo zjištěno, že je sdružený s hepatobiliarií a plicními infekcemi a způsobuje papilární zúžení, cholecystitidu a cholangitidu (McWhitney et al. 1991, Beaugerie et al. 1992, Weber et al. 1992, Pol et al. 1993). *E. bieneusi* je nejvíce frekventovaná mikrosporidie u lidí, speciálně u HIV-pozitivních pacientů. Tento parazit je spojován především s chronickými průjmy a ztrátou hmotnosti, ale byl diagnostikován i u pacientů s jinou imunosupresí a u imunokompetentních cestovatelů, u kterých průjmy spontánně mizely (Weber and Bryan 1994, Sobottka et al. 1995). Tento patogen je dnes známý i u prasat (Deplazes et al. 1996), krav, koz, kuřat, koček, krocanů (del Aguila et al. 1999) a u imunodefecitních opic (Tzipori et al. 1997).

Zdroje mikrosporidiálních lidských infekcí a cesty transmise nejsou zcela známé. Některé důkazy naznačují, že transmise probíhá přes kontaminovanou vodu (Dowd et al. 1998, Marshall et al. 1997, Sparfel et al. 1997).

*Enterocytozoon bieneusi* byl nalezen u prasat i u jiných domácích zvířat jako králíků, psů, koz, oslů (Lores et al. 2002). U těchto případů však není známo, zda došlo k aktivní infekci, nebo pasáži spór zažívacím traktem (del Aguila et al. 1999). Nicméně to dokazuje vylučování spór zvířaty do prostředí, což může nabídnout jiné možné cesty transmise a rozšířit tak vědomosti lidské epidemiologie tohoto druhu (Lores et al. 2002).

*Enterocytozoon bieneusi* se vyvíjí v přímém kontaktu s hostitelskou buněčnou cytoplazmou, kde v brzkých stádiích podstupují jaderné dělení k vytvoření multinukleárních merogoniálních plazmodií, která obsahují elektro-lucentní štěrbinu (Cali and Takvorian 1999, Vávra and Larson 1999, Desportes-Livage 2000). Tato stádia jsou v blízkém styku s hostitelkým endoplazmatickým retikulem a mitochondriemi. Meronty se dále vyvíjí ve sporonty, u nichž se kolem jádra formuje pólové vlákno, čímž se morfogeneze vystřelovacího aparátu u skupiny Enterocytozoonidae odlišuje od jiným mikrosporidiím. Cytokinese se dále soustředí na jednotlivé zralé spóry oddělené z plazmodia (Kotler et Orenstein 1998). *E. bieneusi* se svou velikostí asi 1,0  $\mu\text{m}$  x 1,5  $\mu\text{m}$  patří mezi nejmenší mikrosporidie. Spóry obklopuje relativně tenká chitinózní endospora, vlastní jediné jádro a obsahují polární vlákno, které se stáčí asi šestkrát, často má dvojité seskupení (Didier et al. 2004).

*Enterocytozoon bieneusi* nebyl dodnes úspěšně kultivován, což naznačuje odlišné biochemické, imunologické charakteristiky. Nekódující části genomu, jako ITS (internal transcribed spacers) rRNA genu, vysvětlují polymorfismus, jenž poskytuje odlišnosti v jednotlivých kmenech tohoto druhu. Díky ITS byly podány důkazy o existenci nejméně 5 odlišných kmenů *E. bieneusi* infikujících člověka. Čtyři z nich byly odlišeny právě díky ITS sekvencím (Rinder et al. 1997, Liguory et al. 1998, Breitenmoser et al. 1999, Rinder, Katzwinkel-Wladarsch et al. 1999).

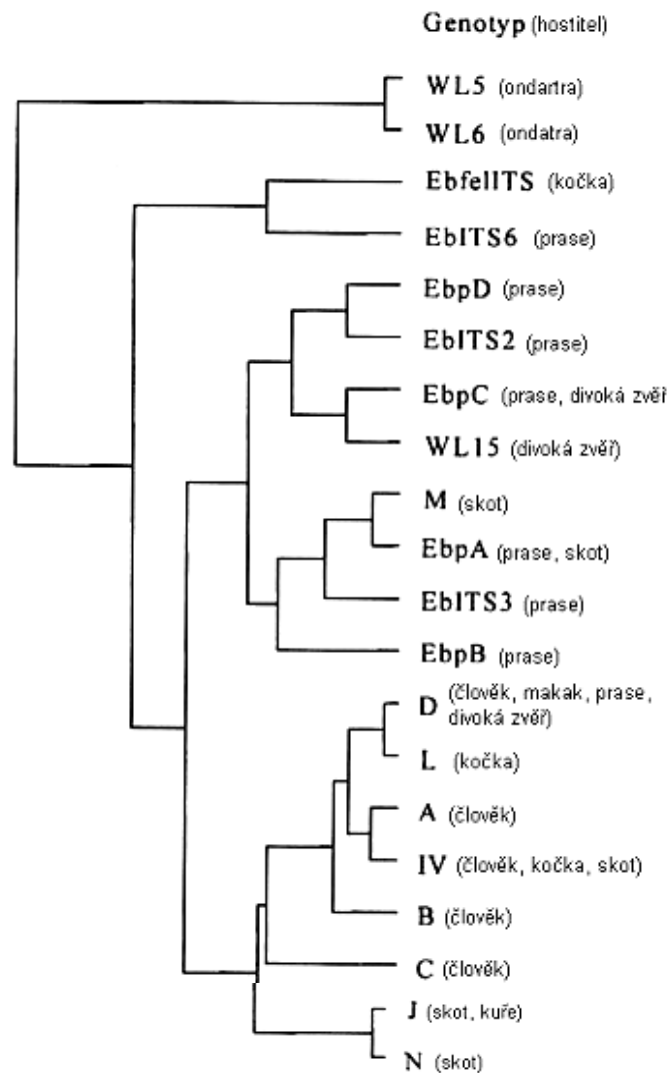
### **2.8.1 Zoonotický potenciál *Enterocytozoonu bieneusi***

V roce 2006 byla provedena studie, která se zabývala potenciálně patogenními genotypy *E. bieneusi* pro člověka a sledovala vztahy genotypů infikujících lidi a ptáky. Sekvenční analýza provedená u ptačích vzorků ukázala genotyp velmi podobný genotypu Peru6, popsáném u pacientů v Peru. Tyto dva genotypy se liší pouze v jednom nukleotidu na 3'-konci fragmentu PCR, což naznačuje vysoký zoonotický potenciál ptačí *E. bieneusi* a nedostatek transmisních bariér mezi ptáky a lidmi, což signalizuje, že ptáci mohou být potencionálním zdrojem lidské infekce a významným zdrojem kontaminace prostředí. Většina infikovaných ptáků byla zřejmě bez klinických příznaků a sloužila jako asymptomatický nositel mikrosporidiálních druhů, proto mohou být mikrosporidie pro ptáky oportunním parazitem, stejně jako pro člověka (Lobo et al. 2006).

Genotypy vyskytující se u člověka byly nalezeny i u hospodářských zvířat. Mezi genotypy nalezené u prasat i lidí patří genotypy EbpC, EbpD, genotyp D a CAF1. Genotypy EbpC a EbpD byly nalezeny u prasat a jsou velmi blízce příbuzné genotypům vyskytujícím se u lidí (Breitenmoser et al. 1999). Genotyp D je bližší ostatním genotypům *E. bieneusi* objevujících se u prasat, než nalezeným genotypům u lidí (Buckholt et al. 2002). Tak je tomu i u genotypu CAF1, který může způsobit mikrosporidiální infekci u lidí (Jeong et al. 2007). Potenciálně patogenní genotypy byly nalezeny i u dobytka, ale tyto genotypy jsou genotypům vyskytujícím se u člověka méně blízké ve srovnání s genotypy popsány u prasat (Rinder et al. 2000, Satín et al. 2005).

Byla zkoumána pouze malá část hospodářských zvířat na přítomnost *E. bieneusi* jako potenciální zdroj lidské infekce. Zatímco některé genotypy *E. bieneusi* mají úzkou hostitelskou specifitu, jiné se mohou vyskytovat u širokého spektra živočichů. Příkladem je genotyp D, který byl nalezen u lidí, makaků, prasat, bobrů, ondatery, mývalů a dobytka.

**Obr. 2:** Přehled známých genotypů *E. bienersi* (Mathias et al. 2005)



### 2.8.2 *Enterocytozoon bienersi* u prasat a jiných hospodářských zvířat

*Enterocytozoon bienersi* byl poprvé u prasat detekován v roce 1996 ve Švýcarsku, kde byly na přítomnost mikrosporidiální infekce testovány vzorky trusu psů, koček, ptáků, telat, ovcí a prasat. Spóry byly nalezeny pouze ve čtyřech vzorcích prasečího trusu, kdy dva pocházely od selat a dva od prasnic. Během čtyř následujících měsíců byly provedeny další dva odběry vzorků na téže farmě. Spóry byly objeveny ve vzorcích trusu jiných prasat. K identifikaci byla použita metoda PCR a sekvenční analýza. ITS sekvence DNA ukázaly 97% shodu s druhem *E. bienersi* izolovaného z lidských vzorků. Klinické příznaky

mikrosporidiosis nebyly u prasat pozorovány. Tato studie dokumentuje, že prasata jsou tímto druhem přirozeně infikována (Deplazes et al. 1996).

Osmnáctiměsíční výzkum provedený u prasat na jatkách v USA ukázal, že 32 % prasat bylo pozitivních na přítomnost *E. bieneusi*. Tato studie se zabývala určením prevalence u prasat a otázkou, zda mohou být prasata potencionálním zdrojem pro lidskou infekci. K výzkumu byly použity vzorky trusu, žluče, žlučníku a jater, které pocházely z jatek v New Hollandu, Massachusetts, New Hampshiru a Vermontu. Za dobu osmnácti měsíců bylo sebráno celkem 202 vzorků. Z toho bylo 32 % pozitivních na *E. bieneusi*. Překvapivě bylo také zjištěno, že u prasat vážících méně než 10 kilogramů byl nižší počet nakažených, než u prasat vážících více. U prasat bylo nalezeno několik odlišných genotypů *E. bieneusi*. V Buckholtově studii byl vyizolován genotyp D, který byl původně objeven u lidí, typ F původně nalezen právě u prasat a bylo objeveno 9 dalších do té doby neobjevených genotypů. Ty byly označeny za PigEBITS1 až 9. Tyto typy byly přítomny ve vzorcích trusu i žluče (Buckholt et al. 2002).

Ve Švýcarsku byly studovány vzorky trusu 109 prasat, 24 krav, koní a lišek na přítomnost *E. bieneusi*, které poté byly srovnávány s druhy izolovanými z 13 HIV-pozitivních pacientů žijících ve Švýcarsku. U zkoumaných zvířat byla zjištěna infekce pouze u prasat, mezi kterými bylo 35 % pozitivních na *E. bieneusi*. Analýza ITS sekvencí odhalila u prasat 4 odlišné genotypy, které byly velmi blízké genotypům vyizolovaným z lidských vzorků. Ty byly totožné z 96,3 až 98,8 %. Odlišné hodnoty prevalence, ve srovnání s výzkumem prováděným v Massachusetts, mohou odrážet geografické a sezónní odchylky, nebo odlišnosti v citlivosti použitých technik. Také byl prokázán nárůst infekce v teplejším období, tedy na jaře a v létě (Breitenmoser et al. 1999).

*E. bieneusi* vyskytující se u selat může způsobovat průjmové onemocnění. Ve studii prováděné v Korejské republice bylo sledováno 472 selat, ze kterých 237 mělo průjmy. Z 237 selat s průjmem bylo 38, tedy 16 %, pozitivních na *E. bieneusi*. Ze 235 selat bez průjmů bylo 29 pozitivních na *E. bieneusi*, což odpovídá 12 %. Tento druh byl nalezen pouze u selat mladší jednoho týdne a částečně i u selat starých jeden až dva týdny. Tento organismus může způsobovat asymptomatické infekce u starších selat (starších čtyř týdnů), u nichž nebyly významné rozdíly v míře výskytu jedinců s a bez průjmu. Metodou PCR bylo odhaleno pět odlišných genotypů (PEbA-PEbE). Čtyři genotypy (PEbA-PEbD) byly shodné s genotypy původně nalezenými u prasat, zatímco pátý genotyp (PEbE) byl identifikován jako typ CAF1, který byl původně nalezen v lidských vzorcích, což naznačuje, že tento genotyp je

nejvzdáleněji příbuzný ostatním genotypům a to znamená, že PEbE by mohl být potenciální spojkou mezi lidmi a prasaty (Du-Kyung Jeong et al. 2007).

V roce 2000 byl detegován pomocí PCR *E. bieneusi* u telat. Jedná se o první detekci u tohoto hostitele. Z 28 vzorků trusu byly 3 pozitivní. U tří infikovaných telat byly nalezeny dva odlišné genotypy. Jeden byl nazván genotyp I a byl nalezen u dvou telat, druhý byl genotyp J, který byl identifikován u třetího telete. V průběhu této studie byly vyšetřovány i vzorky trusu prasat, u kterých byly objeveny dosud neznámé genotypy: genotyp G a genotyp H. Oba tyto genotypy byly izolovány z prasat trpících průjmem. U prasat byl nalezen i genotyp F. U jednoho z prasat byly detekovány smíšená infekce oběma odlišnými genotypy, a to G a H. Tyto genotypy mohou reprezentovat dvě třídy rDNA genů v jednom a tom samém druhu *E. bieneusi*. Zajímavé je, že jeden genotyp (G) ukazuje blízký vztah ke genotypu vyskytujícímu se u člověka (C), zatímco druhý genotyp (H) je mnohem více příbuzný jiným druhům izolovaných z prasat (Rinder et al. 2000).

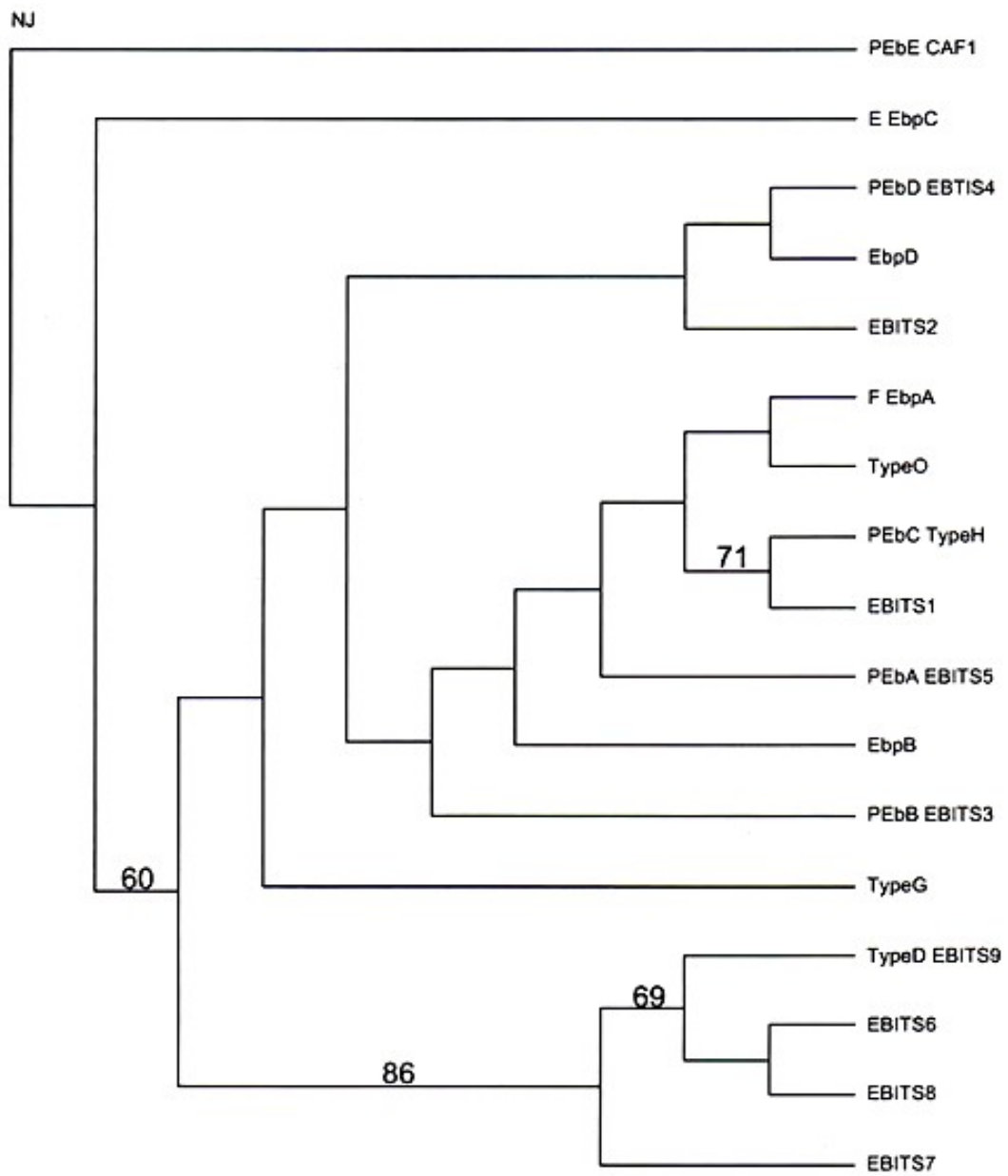
*E. bieneusi* se vyskytuje u širokého spektra domácích zvířat, čemuž nasvědčuje studie prováděná v Galicii ve Španělsku. Zde bylo odebráno celkem 87 vzorků trusu, které pocházely od 75 domácích zvířat. Bylo vyšetřeno 22 králíků, 17 psů, 10 koček, 4 prasata, 2 osli, 10 koní, 7 koz a 3 krávy, které pocházeli z vesnic v provinciích Pontevedra a Ourense. Pomocí světelné mikroskopie bylo odhaleno malé množství spór o velikosti asi 1 až 1,5  $\mu\text{m}$ , v některých případech až 2,5  $\mu\text{m}$ . Metoda PCR odhalila, že *E. bieneusi* byl přítomen u dvou psů (11,7 %) a jedné kozy (14,2 %) (Lores et al. 2002).

Experimentální infekce prasat byla provedena v roce 1998. Při tomto pokusu bylo použito 29 novorozených selat. Většina selat byla infikována po 24 hodinách dávkami spór *E. bieneusi* lidských a opičích izolátů. U těchto infikovaných a kontrolních selat byly denně sledovány příznaky infekce, změny hmotnosti a vylučování spór v trusu. Selata byla zabita v odlišných fázích infekce a jejich části trávicího traktu a střeva byla vyšetřena pomocí histologie, imunohistologie a hybridizačními analýzami. Výsledkem toho pokusu byla úspěšná infekce *E. bieneusi* všech infikovaných selat bez ohledu na původ spór a imunitní stav jedince. U medikamentózně imunosuprimovaných jedinců došlo k dřívějšímu počátku vylučování spór, jejichž množství u nich bylo také kvantitativně větší ve srovnání se s neimunosuprimovanými selaty. Lidské a opičí izoláty shodně a stejně rychle infikovaly gnotobiotická selata a vzorky izolované z nakažených selat pak byly stejně infekční i pro další selata. To ukazuje, že se *E. bieneusi* z jednoho vzorku může potencionálně dále šířit mezi selaty. Vylučování spór v trusu probíhalo u všech zvířat až do konce pokusu, nejdelší doba

byla 50 dní. U zvířat se objevily malé, nebo žádné příznaky průjmu a ztráty tělesné hmotnosti. Je možné, že nedostatek příznaků mohl být důsledkem krátké doby pozorování. U selat došlo k infekci enterocytů a střevních buněk. Nebyl žádný důkaz infekce hepatobiliárního stromu a jiných viscerálních orgánů selat během tohoto experimentu. Model selete tak může být nyní používán pro vyhodnocení terapeutických faktorů při infekci *E. bieneusi*. Infikovaná selata mohou být také použita pro vytváření parazitického materiálu pro následný laboratorní výzkum zahrnující genomové knihovny a parazitické antigeny pro specifickou produkci protilátek (Kondova et al. 1998).

Žlučový systém prasat byl poprvé experimentálně použit ke kultivaci *E. bieneusi* v roce 2000. K tomu bylo použito 6 zdravých čtyřtýdenních selat, pocházejících ze stejného vrhu. Dvě z nich byla podrobena imunosupresivní terapii po dobu prvních čtyř týdnů. Tři ze selat, kde 1 bylo imunosuprimováno, byla orálně inokulována spórami *E. bieneusi*. Ostatní selata byla injekčně inokulována přímo do žlučníku stejným množstvím spór. Všech 6 selat bylo opětovně infikováno devět týdnů po první inokulaci. U zvířat byly týdně kontrolovány symptomy, změny tělesné hmotnosti a přítomnost vylučovaných spór v trusu a žluči. Detekce těchto parazitů v trusu a žluči modifikovaným Trichromem a PCR amplifikací byla použita ke kultivaci *E. bieneusi* ve zvířatech. V trusu byly spóry detegovány pouze u dvou prasat během prvního týdne po opakované infekci. Všech 6 zvířat bylo pozitivních na infekci *E. bieneusi* bez ohledu na jejich imunitní stav. Imunosupresivní léčba neměla vliv na dobu vylučování spór v trusu a žluči. U třech selat bylo znatelné dřívější zastavení vylučování spór v trusu než u ostatních zvířat, ale vylučování spór ve žluči pokračovalo. Vylučování spór žlučí bylo zaznamenáno nejdříve pět týdnů po první inokulaci, zatímco v trusu byly spóry přítomny již od prvních dnů po inokulaci. Spóry ve žluči byly u zvířat objeveny mezi pátým a dvanáctým týdnem pokusu. Množství spór ve žluči se ke konci pokusu zvyšovalo, zatímco ve vzorcích trusu již nebyli paraziti detegováni (Lee 2000).

**Obr. 3:** Fylogenetické vztahy prasečích genotypů *E. bieneusi* ( Du-Kyung Jeong et al. 2007)



## **3 METODY**

### **3.1 Detekce spór v trusu**

Spóry mikrosporidií jsou běžně detekovány mikroskopicky a to použitím barvení Calcofluor White M2R (Vávra et al. 1993). Vzorky trusu jsou rozetřeny na podložní sklíčko, nechány uschnout a fixovány methanolem po dobu 2 minut. Spóry jsou zviditelněny barvením 0,1% calcofluorem M2R (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) v PBS po dobu 10 minut. Ke snadnějšímu odlišení spór jsou nátěry dobarveny 0,5% Evansovou modří. Vzorky jsou prohlíženy fluorescenčním mikroskopem Olympus IX70 s použitím UV filtru o vlnové délce 490 nm při zvětšení 1000krát s olejovou imerzí.

### **3.2 Molekulární charakteristika mikrosporidiálních druhů a genotypů**

#### **3.2.1 Izolace DNA**

0,2 až 0,3 gramů každého vzorku trusu je homogenizováno skleněnými kuličkami o průměru 0,5 mm pomocí Mini-BeadBeateru (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) po dobu 120 sekund a rychlosti 5000 rpm. DNA je extrahována pomocí QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) podle výrobcova návodu. Získaná DNA je poté skladována při -20 °C.

#### **3.2.2 Molekulární identifikace a charakterizace *E. bienersi***

Nested PCR protokol, který odlišuje *E. bienersi* od ostatních mikrosporidií, které běžně nalézáme u člověka, je používán k amplifikaci 508 bp fragmentu malé podjednotky rRNA genu sestávajícího z 122 bp na 3'-konci SSU rRNA genu, 243 bp ITS a 143 bp na 5'-konci LSU rRNA genu (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996). Pro primární a sekundární amplifikaci jsou používány sady primerů MSP-1 a MSP-2B, MSP-3 a MSP-4B. PCR amplifikace sestává z 35 cyklů. Získané produkty jsou elektroforeticky rozděleny ve 2% agarózovém gelu a zviditelněny ethidium bromidem při koncentraci 0,2 mg/ml.



Všechny produkty amplifikace jsou sekvenovány v obou směrech pomocí BigDye Terminator chemistries (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s použitím sekundárních primerů MSP-3 a MSP-4B a sekvenovány pomocí ABI PRISM 3031 sekvenátoru (Applied Biosystems). Výsledné sekvence jsou analyzovány pomocí programu ChromasPro Version 1.32 (Technelysium Pty. Ltd., Qld, Australia) a Clustal X (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) a srovnány s referenčními sekvencemi GenBank.

## 4 DISKUSE

V roce 1996 byl *E. bienersi* poprvé popsán u prasat a od tohoto roku bylo provedeno mnoho studií, během nichž bylo detekováno několik odlišných genotypů *E. bienersi* infikující prasata. Některé z těchto genotypů se velmi podobají genotypům *E. bienersi* vyizolovaným z lidských vzorků, kde je shoda v sekvencích genu pro podjednotky ribozómů 96,3 až 98,8 % (Breitenmoser et al. 1999), což naznačuje potencionální roli prasat jako zdroj lidské infekce. Podle studií Deplazese a Breitenmosera s kolektivy byly u prasat pozorovány prevalence 32 až 35 %. Rozdíly v hodnotách prevalencí mohou odrážet odlišnosti v citlivosti použitých technik, ale i geografické a sezónní odchylky, kdy v teplejším období byl zaznamenán vyšší podíl mikrosporidálních infekcí (Deplazes et al. 1996, Breitenmoser et al. 1999). *E. bienersi* u prasat postihuje především žlučový systém a zažívací trakt, což může být občas doprovázeno průjmami. V roce 1998 byla poprvé úspěšně provedena experimentální infekce prasat, ke které byly použity opičí a lidské izoláty *E. bienersi*. Nebyl sledován rozdíl v infektivitě lidských a opičích izolátů, navíc si spóry pasažované přes selata ponechávaly původní infektivitu a virulenci pro další selata (Kondova et al. 1998). V roce 2000 byl pro kultivaci úspěšně použit prasečí žlučový systém (Lee 2000). Vzhledem k obtížné in vitro kultivaci umožňuje vnímavost selat k různým izolátům *E. bienersi* využití těchto hostitelů jako modelového organismu za účelem terapeutického testování, pomnožení původních izolátů pro další laboratorní výzkumy zahrnující sestavení genových knihoven nebo získání parazitických antigenů pro produkci specifických protilátek..

*Enterocytozoon bienersi* byl popsán i u jiných hospodářských zvířat. U telat byly v roce 2000 detekovány dva genotypy a to genotyp I a genotyp J (Rinder et al. 2000). Přítomnost tohoto parazita byla prokázána i u králíků, oslů, koní a koz (Lores et al. 2002).

I v České republice lze předpokládat výskyt mikrosporidiových infekcí u hospodářských zvířat, zejména v chovech prasat. Výsledky získané vyšetřováním různých věkových kategorií prasat na farmách v České republice ukazují, že prevalence *E. bienersi* v chovech je velmi vysoká, dosahující až 94 %. Navíc byly identifikovány genotypy *E. bienersi* potencionálně patogenní pro člověka, jmenovitě genotyp-D a Peru9 (Sak et al. 2008).

Prasata jsou přirozeně infikována druhem *Enterocytozoon bienersi*, který se vyskytuje i u jiných živočichů včetně člověka. Doposud nebyla prasata a jiná hospodářská zvířata

studována jako možný rezervoár mikrosporidiové infekce. Tak by se spóry uvolňovaly do půdy, kde by mohly zvyšovat riziko vzniku infekce u kteréhokoliv živočicha. Toto by znamenalo i hrozbu kontaminace půdy a prostředí prostřednictvím zemědělských postupů, například hnojením chlévskou mrvou. Z takto kontaminovaných půd se spóry mohou snadno dostat do podzemních vod a tak se může zvyšovat riziko vzniku infekce pro člověka a jiné živočichy. Tento model by mohl vysvětlovat výskyt některých genotypů *E. bienersi* jak u lidí tak u prasat.

## **5 ZÁMĚRY DO BUDOUCNA**

Na základě této literární rešerše se v magisterském studiu zaměřím na praktickou stránku tohoto problému. Již v uplynulém studiu jsem si vyzkoušela některé postupy související s tímto tématem. V budoucím výzkumu budu postupovat podle navržené metodiky, kde budu detekovat různé prasečí genotypy *E. bieneusi*.

## 6 SEZNAM LITERATURY

- Aldras, A.M., Orenstein, J.M., Kotler, D.P., Shaddock, J.A., Didier, E.S., 1994.** Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 32:608-612.
- Ashton, N., Wirashinha, P.A., 1973.** Encephalitozoonosis (Nosematosis) of the cornea. *Br J Ophthalmol* 57:669-674.
- Asmuth, D.M., De Girolami, P.C., Federman, M., Ezratty, C.R., Pleskow, D.K., Desai, G., Wanke, C.A., 1994.** Clinical features of microsporidiosis in patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 18:819-825.
- Balbiani, G., 1882.** Sur les microsporidies ou psorospermies des articules. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci Paris* 95:1168-1171.
- Beaugerie, L., Teilhac, M.F., Deluol, A., Fritsch, J., Girard, P., Rozenbaum, W., Le Quintrec, Y., Chatelet, F., 1992.** Cholengiopathy associated with Microsporidia infection of the common bile duct mucosa in patient with HIV infection. *Ann. Intern. Med.* 117:401-402.
- Beauvais, B., Sarfati, C., Challier, S., Derouin, F., 1994.** In vitro model to assess the effect of antimicrobial agents on *Enterocytozoon cuniculi*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2440-2448.
- Black, S.S., Steinohrt, L.A., Bertucci, D.C., Rogers, L.B., Didier, E.S., 1997.** *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet. Pathol.* 34:189-198.
- Bornay-llinares, F.J., da Silva, A.j., Moura, H., Schwarz, D.A., Visvesvara, G.S., Pieniazek, N.J., Cruz-Lopéz, A., Hernández-Jauregui, P., Guerrero, J., Enriquez, F.J., 1998.** Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* infection in mammals other than humans. *J. Infect. Dis.* 178:820-826.
- Breitenmoser, A.C., Mathis, A., Burgi, E., Weber, R., Deplazes, P., 1999.** High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology* 118:447-453.
- Bryan, R.T., Cali, A., Owen, R.L., Spencer, H.C., 1991.** Microsporidia: Opportunistic pathogens in patients with AIDS. *Prog Clin Parasitol* 2:1-26.

- Bryan, R.T., Schwarz, D.A., 1999.** Epidemiology of microsporidiosis, in M. Wittner and L. Weiss, Editors, *The Microsporidia and Microsporidiosis*, American Society of Microbiology, Washington, DC (1999):502-516.
- Buckholt, M.A., Lee, J.H., Tzipori, S., 2002.** Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2595-2599.
- Cali, A., 1991.** General microsporidian features and recent findings on AIDS isolates. *J. Protozool.* 38:625-630.
- Cali, A., Takvorian, P., 1999.** Developmental morphology and life cycle of the microsporidia, in M. Wittner and L. Weiss, Editors, *The Microsporidia and Microsporidiosis*, American Society of Microbiology, Washington, DC (1999):85-128.
- Canning, E.U., 1988.** Molecular division and chromosome cycle in microsporidia. *Biosystems* 21:333-340.
- Caramello, P., Mazzucco, G., Romeo, M., Ullio, A., De Rosa, G., Lucchini, A., Forno, B., Brancale, T., Macor, A., Preziosi, C., Gioannini, P., 1995.** Clinical and microscopical features of small-intestinalis microsporidiosis in patients with AIDS. *Infection* 23:362-368.
- Carter, P.L., MacPherson, D.W., McKenzie, R.A., 1996.** Modified technique to recover microsporidian spores in sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed fecal samples by light microscopy and correlation with transmission electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.* 34:2670-2673.
- Carville, A., Mansfield, K., Widmar, G., Lackner, A., Kotler, D., Wiest, P., et al., 1997.** Development and application of genetic probes for detection of *Enterocytozoon bieneusi* in formalin fixed stools and in intestinal biopsy specimens from infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 4:405-408.
- Cavalier-Smith, T., 1998.** A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Cam. Philos. Soc.* 73:203-266.
- Centre for Disease Control: microsporidia keratoconjunctivitis in patient with AIDS, 1990.** *MMWR* 39:188-189.
- Connolly, G.M., Ellis, D.S., Williams, J.E., Tovey, G., Gazzard, B.G., 1991.** Use electron microscopy in examination of fecal and rectal and jejunal biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 44:313-316.

- Conteas, C.N., Berlin, O.G., Ash, L.R., Pruthi, J.S., 2000.** Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63:121–127.
- Conteas, C.N., Sowerby, T., Berlin, O.G.W., Dahlan, F., Nguyen, A., Porschen, R., Donovan, J., Lariviere, M., Orenstein, J.M., 1996.** Fluorescence technique for diagnosing intestinal microsporidiosis in stool, enteric fluid, and biopsy specimens from acquired immunodeficiency syndrome patients with chronic diarrhea. *Arch. Pthol. Lab., Med.* 120:847-853.
- Cornet, M., Romand, S., Warszawski, J., Bourée, P., 1996.** Factors associated with microsporidial and cryptosporidial diarrhea in HIV infected patients. *Parasite* 4:397-401.
- Cotte, L., Rabodonirina, M., Chapuis, F., Bailly, F., Bissuel, F., Raynal, C., Gelas, P., Persat, F., Piens, M.A., Trepo, C., 1999.** Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection, *J. Infect. Dis.* 180:2003–2008.
- Cox, J:C., Hamilton, R.C., Attwood, H.D., 1979.** An investigation of route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J. Protozool.* 26:260-265.
- Coyle, C., Kent, M., Tanowitz, H.B., Wittner, M, Weiss, L.M., 1998.** TNP-470 is an effective antimicrosporidial agent, *J. Infect. Dis.* 177:515–518.
- Croft, S.L., Williams, J., McGowan, I., 1997.** Intestinal microsporidiosis. *Semin. Gastroenterol.* 8:45-55.
- Current, W.L., Owen, R.L., 1989.** Cryptosporidiosis and microsporidiosis, in: *Enteric Infection Mechanisms, Manifestation and Management*, 11<sup>th</sup> Ed. Farthing, M.J.G., Keusch, G.T., editors. London, Chapman and Hall:203-207.
- Curry, A., Canning, E.U., 1993.** Human microsporidiosis. *J.infectz.* 27:229-236.
- da Silva, A.J., Slemenda, S.B., Visvesvara, G.S., Schwarz, D.A., Wolcox, C.M., Wallace, S., et al. 1997.** Detection *Septata intestinalis* (microsporidia) Cali et al. 1993 using polymerase chain reaction primers targening the small subunit ribosomal RNA coding region. *Mol Diagn* 2:47-52.
- Dascomb, K., Frazer, T., Clark, R.A., Kissinger, P., Didier, E., 2000.** Microsporidiosis and HIV, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 24:290–292.
- del Aguila, C., Izquierdo, F., Navajas, R., Pieniazek, N.J., Miró, G., Alonso, A., da Silva, A., Fenoy, S., 1999.** *Enterocytozoon bienewisi* in animals: rabbits and dogy as new hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:8-9S.

- del Aguila, C., Lopez-Velez, R., Fenoy, S., Turrientes, C., Cobo, J., Navajas, R., Visvesvara, G.S., Croppo, G.P., da Silva, A.J., Peniazek, N.J., 1997.** Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* 35:1862-1866.
- Dengjel, B.M., Zahler, M., Hermanns, W., Heinritzi, K., Spillmann, T., Thomschke, A., Loscher, T., Gothe, R., Rinder, H., 2001.** Zoonic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J. Clin. Microbiol.* 39:4495-4499.
- Deplazes, P., Mathis, A., Muller, C., Weber, R., 1996.** Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:93S.
- Deplazes, P., Mathis, A., Weber, R., 2000.** Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds, *Contrib. Microbiol.* 6:236–260.
- Desportes I., Le Charpentier, Y., Galian, A., 1985.** Occurrence of a new microsporidian, *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool* 32:250-254.
- Desportes-Livage, I., 2000.** Biology of microsporidia, *Contrib. Microbiol.* 6, 140–165.
- Desser, S.S., Hong, H., Yang, Y.J., 1992.** Ultrastructure of the development of species of *Encephalitozoon* culture from the eye of an AIDS patient. *Parasitol. Res.* 78:677-683.
- Didier, E.S., Kotler, D.P., Dieterich, D.T., Orenstein, J.M., Aldra, A.M., Davis, R., 1993.** Serologic studies in human microsporidiosis. *AIDS* 7: S8-S11.
- Didier, E.S., Snowden, K.F., Shadduck, J.A., 1998.** Biology of microsporidian species infecting mammals, *Adv. Parasitol.* 40:283–320.
- Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K., Didier, P.J., 2004.** Epidemiology of mikrosporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parazitol.* 126: 145-166.
- Didier, E.S., Varner, P.W., Didier, P.J., Aldras, A.M., Millichamp, N.J., Murphy-Corb, M., Shadduck, J.A., 1994.** Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkey. *Folia Parasitol.(Prague)* 41:1-11.
- Dore, S.E., Marriott, D.J., Hing, M.C., Harkness, J.L., Field, A.S., 1995.** Disseminated microsporidiosi due to *Septata intestinalis* in nine patients infected with the human immunodeficiency virus: response to therapy with albendazole. *Clin. Infect.Dis.* 21:70-76.



- Dowd, S.E., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 1998.** Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Vittaforma corneae* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3332-3335.
- Du-Kyung Jeong, Ga-Yeon Won, Bae.Keun Park, Jin Hur, Ju-Yeon You, Su-Jin Kang, In-Gyeong Oh, Yun-Sik Lee, Barry D. Stein, John Hwa Lee 2007.** Occurrence and genotypic characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs with diarrhea. *Parasitol Res.* 102:123-128.
- Enriquez, F.J., Taren, D., Cruz-Lopez, A., Muramoto, M., Palting, J.D., Cruz P., 1998.** Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. *Clin. Infect. Dis.* 26:1227-1229.
- Ergens, R., Lom, J., 1970.** Původci parazitálních nemocí ryb. Praha, Academica 1970:383.
- Franzen, C., Müller, A., 1999.** Cryptosporidia and microsporidia—waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34:245–262.
- Friedberg, D.N., Ritterband, D.C., 1999.** Ocular Microsporidiosis, in: *The Microsporidia and Microsporidiosis*, Wittner M., Weiss, L.M., editoes. Washington DC, Am Soc Microbiol, 193-314.
- Gannon, J., 1980.** The cause of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab. Anim.* 14:189-192.
- Haro, M., Henriques-Gil, N., Fenoy, S., Izquierdo, F, Alonso, F., Del Águila, C, 2005.** Detection and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in pigeons. *The Journal of Eukaryotic Biology* 53: S58-S60.
- He, Q., Leitch, G.J., Visvesvara, G.S. Wallace, S., 1996.** Effects of nifedipine, metronidazole and nitric oxide donors on spore germination and cell infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Enterocytozoon cuniculi*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 179-185.
- Henriksen, P., 1986.** The prevalence of encephalitozoonosis in danish farmed foxes. *Nord. Veterinaermed.* 38:167-172.
- Hollister, W.S., Canning, E.U., Viney, M., 1989.** Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in stray dogs as determined by an ELISA. *Vet. Rec.* 124:332-336.
- Hollister, W.S., Canning, E.U., Weidner, E., Field, A.S., Kench, J., Marriott, D.J., 1996.** Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n.g., n.sp. after in vitro isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. *Parasitology* 112:143-154.

- Hollister, W.S., Canning, E.U., Willcox, A., 1991.** Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serologic tests. *Parasitology* 102:33-34.
- Chan, M., Theng, J.T., Li, L., Tan, D.T., 2003.** Microsporidial keratokonjunctivitis in healthy individuals: a case series, *Ophthalmology* 110:1420-1425.
- Chu, P., Wesr, A.B., 1996.** *Encephalitozoon intestinalis*. Cytologic, histologic, and electron microscopic features of a systemic intestinal pathogen. *Am. J. Clin. Pathol.* 106:606-614.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E. Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G, et al., 2002.** Genome sequence and gene compaction of the eukaryotic parasite *Enterocytozoon cuniculi*. *Nature* 414:450-453.
- Keeling, P.J., Fast, N.M., 2002.** Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:93-116.
- Keeling, P.J., Luker, M.A., Palmer, J.D., 2000.** Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* 17:23-31.
- Kondova, I., Mansfield, M., Buckholt, M.A., Stein, B., Widmer, G., Carville, A., Lackner, A., Tzipori, S., 1998.** Transmission and serial propagation of *Enterocytozoon bieneusi* from humans and rhesus macaques in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 66:5515-5519.
- Kotler, D., Orenstein, J.M., 1999.** Clinical syndromes associated with microsporidiosis, in M. Wittner and L. Weiss, Editors, *The Microsporidia and Microsporidiosis.*, American Society of Microbiology, Washington, DC:258–292.
- Kotler, D.P., Francisco, A., Clayton, F., Scholes, J.V., Orenstein, J.M., 1990.** Small intestinal injury and parasitic diseases in AIDS. *Ann. Intern. Med.* 113:444-449.
- Kotler, D.P., Giang, T.T., Garro, M.L., Orenstein, J.M., 1994.** Light microscopic in patients with AIDS. *Am. J. Gastroenterol.* 89:540-544.
- Kotler, D.P., Orenstein, J.M., 1998.** Clinical syndromes associated with microsporidiosis 40: 321–349.
- Koudela, B., Vitovec, J., Kucerova, Z., Ditrich, O., Trávníček, J., 1993.** The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Fol. Parasitol. (Prague)* 40:279-286.
- Lee, J.H. 2000.** Using pig biliary system, in vivo propagation of *Enterocytozoon bieneusi*, an AIDS-related zoonotic pathogen. *J. Vet. Sci.* 1(2):105-111.

- Liguory, O., David, F., Sarfati, C., Derouin, F., Molina, J.M., 1998.** Determination of types *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from patients with intestinal mikrosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1882-1885.
- Linguory, O., David, F., Sarfati, C., Schuitema, R.J., Hartskeel, R.A., derouin, F., et al. 1997.** Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* using polymerase chain reaction in stool specimens. *AIDS* 11:723-726.
- Lobo, M.L., Xiao, I., Cama, V., Magalhães, N., Antunes, F., Matos, O., 2006.** Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. *Applied Environmental Microbiology* 11:7380-7382.
- Lores, B., del Aquila, C., Aries, C., 2002.** *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia), in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Mam, Inst. Oswaldo Cruz* 97:941-945.
- Lowder, C.Y., 1993.** Ocular microsporidiosis. *Int Ophthalmol Clin* 33:145-151.
- Maeda, H., Ishida, N., 1967.** Specificity of binding of hexapyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J.Biochem.* 62:276-278.
- Mansfield, K.G., Carville, A., Shvetz, D., MacKey, J., Tzipori, S., Lackner, A.A., 1997.** Identification of *Enterocytozoon bieneusi*-like microsporidian parasite in simian-immunodeficiency.virus-inoculated macaques with hepatobiliary disease. *Am. J. Pathol.* 150:1395-1405.
- Margileth, A.M., Strano, A.J., Chandra, R., et al., 1973.** Disseminated nosematosis in an immunologically compromised infant. *Arch Pathol.* 95:145-150.
- Marshall, M. M., Naumovitz, D., Ortega, Sterling, C. R., 1997.** Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:67-85.
- Mathias, A., Rainer, W., Deplazes, P. 2005.** Zoonotic potential of Microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* 18:423-445.
- Matsubayashi, H., Koike, T., Makata, T., Hagiwara, S., 1959.** A case of *Enterocytozoon* like body infection in man. *Arch. Pathol* 67:181-187.
- McDougall, R.J., Tandy, M.W., boreham, R.E., Stenzel, D.J., O'Donoghue, 1993.** Incidental finding of microsporidian parasite from an AIDS patient. *J. Clin, Microbiol.* 31:436-439.
- McInnes, E.F., Stewart, C.G., 1991.** The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 62:51-54.

- McWhinney, P.H.M., Nathwani, D., Green, S.T., 1991.** Microsporidia detected in association with AIDS-related sclerosing cholangitis. *AIDS* 5:1394-1395.
- McWilliam, L.J., Curry, A., 1990.** Intestinal microsporidiosis in AIDS. *J. Clin. Pathol.* 43:173-174.
- Molina, J.M., Tourneur, M., Sarfati, C., Chevret, S., de Gouvello, A., Gobert, J.G., Balkan, S., Derouin, F., Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 090 Study Group, 2002.** Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis, *N. Engl. J. Med.* 346:1963–1969.
- Mota, P., Rauch, C.A., Edberg, S.C., 2000.** Microsporidia and Cyclospora: epidemiology and assessment of risk from the environment, *Crit. Rev. Microbiol.* 26:69–90.
- Muller, A., Stellermann, K., Hrtmann, P., Schrappe, M., Fatkenheuer, G., Salzberger, B., et al., 1999.** A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporida in clinic stool specimens. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:243-246.
- Naegeli, K.W., 1857.** Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot. Z.* 15:760-761.
- Orenstein, J.M., Gaetz, H.P., Yachnis, A.T., Frankel, S.S., Mertens, R.B., Didier, E.S., 1997.** Disseminated microsporidiosis in AIDS: are any organs spared. *AIDS* 11:385-386.
- Peacock, C.S., Blanshard, C., Tovey, D.G., Ellis, D.S., Gazzard, B.G., 1994.** Histological diagnosis of intestinal microsporidiosis in patient with AIDS. *J Clin Pathol* 44:558-563.
- Pol, S., Romana, C.A., Richard, S., 1993.** Microsporidia infection in patient with the acquired immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. *N. Engl. J. Med.* 328:95-99.
- Remadi, S., Dumais, J., Wafa, K., MacGee, W., 1995.** Pulmonary microsporidiosis in patient with the acquired immunodeficiency syndrome. A case report. *Acta Cytol.* 39:1112-1116.
- Rinder, H., Katzwinkel-Wladarsch, S., Löscher, T., 1997.** Evidence of the existence of genetically distinct strains of *Enterocytozoon bieneusi*. *Parasitology research* 83:670-672.
- Rinder, H., Katzwinkel-Wladarsch, S., Thomschke, A., Löscher, T., 1999.** Strain differentiation in microsporidia. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* 23: 433-437.

- Rinder, H., Thomschke, A., Dengjel, B., Gothe, R., Loscher, T., Zahler, M., 2000.** Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. *J. Parasitol.* 86:185-188.
- Sak, B., Kváč, M., Hanzlíková D., Cama, V., 2008.** First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet Parasitol.* In press.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2005.** *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle in the eastern United States. *Parasitology Research* 97:535-538.
- Shadduck, J.A., 1989.** Human microsporidiosis and AIDS. *Rev Infect Dis* 11:203-207.
- Shadduck, J.A., Meccoli, R.A., Davis, R., Font, R.L., 1990.** Isolation of microsporidian from a human patient. *J Infect Dis* 162:773-776.
- Shadduck, J.A., Orenstein, J.M., 1993.** Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch. Pathol. Lab Med.* 117:1215-1219.
- Shaduck J.A., 1969.** *Nosema cuniculi*: In vitro isolation. *Science* 166:516-517.
- Schwarz, D.A., Bryan, R.T., Weber, R., Visvesvara, G.S., 1994.** Microsporidiosis in HIV-positive patients: current methods for diagnosis using biopsy, cytologic, ultrastructural, immunological, and tissue culture techniques. *Folia Parasitol. (Prague)* 41:101-109.
- Slodkowitz-Kowalska, A., Graczyk, T., Tamang, L., Girouard, A., Majewska, A., 2007.** Asymptomatic *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in captive mammals. *Parasitology Research* 100: 505-509.
- Snowden, K.F., Didier, E.S., Orenstein, J.M., Shadduck, J.A., 1998.** Animal models of human microsporidial infections, *Lab. Anim. Sci.* 48:589–592.
- Snowden, K.F., Shadduck, J.A., 1999.** Microsporidia of higher vertebrates, in M. Wittner and L. Weiss, Editors, *The Microsporidia and Microsporidiosis*, American Society of Microbiology, Washington, DC (1999):393–419.
- Sobottka, I., Albrecht, H., Schottelius, J., Schmetz, C., Bentfeld, M., Lauff, R., Schwarz, D.A., 1995.** Self limited travelers diarrhea due to a dual infection with *Enterocytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium parvum* in an immunocompetent HIV-negative child. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:919-920.
- Sparfel, J. M., et al. 1997.** Detection of microsporidia and identification of *Enterocytozoon bieneusi* in surface water by filtration followed by specific PCR. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44: 78S.

- Strano, A.J., Cali, A., Necafie, R.C., 1976.** Microsporidiosis, in: Pathology of Tropical and Extraordinary Diseases. Binford, Ch., Connor, D.H., editors. Washington DC, Arm forces Inst Pathol: 336-9.
- Tereda, S., Reddy, K.R., Jeffers, L.J., Cali, A., Schiff, E.R., 1987.** Microsporidian hepatitis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* 107:61-62.
- Trammer, T., Dombrowski, F., Doehring, M., Maier, W.A., Seitz, H.M., 1997.** Opportunistic properties of *Nosema algerae* (Microspora), a mosquito parasite, in immunocompromised mice, *J. Eukaryot. Microbiol.* 44:258–262.
- Tzpori, S., Carville, A., Widmer G., Kotler, D., Mansfield, K., Lackner, A., 1997.** Transmission and establishment of *Enterocytozoon bieneusi*, derived from a human with AIDS, in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkey. *J. Infect. Dis.* 175:1016-1020.
- Undeen, A.H., Alger, N.E., 1976.** *Nosema algerae*: infection of the white mouse by a mosquito parasite, *Exp. Parasitol.* 40:86–88.
- Van Gool, T., Canning, E..U., Gilis, H., Van Der Bergh Weerman, M.A., Eeftinck Schattenkerk, J.K., Dankert, J.D., 1994.** *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of patient with a new cultivation method. *Parasitology* 109:281-289.
- Vavra, J., Larsson, R., 1999.** Structure of the microsporidia, in: M. Wittner and L. Weiss, Editors, *The Microsporidia and Microsporidiosis*, American Society of Microbiology, Washington, DC (1999):7–84.
- Velasquez, J.N., Carnevale, S., Labbe, J.H., Chertcoff, A., Cabrera, M.G. Oelemann, W., 1999.** In situ hybridization: A new molecular approach for diagnosis of the microsporidian parasite *Enterocytozoon bieneusi*. *Hum Pathol* 30:54-59.
- Visvesvara, G.S., da Silva, A.J., Croppo, G.P., Pieniatzek, N.J., Leitch, G.J., Ferguson, D., et al., 1995.** In vitro culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from urine of a patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 33:930-936.
- Visvesvara, G.S., Leitch, G.J., da Silva, A.J., Croppo, G.P., Moura, H., Wallace, S., et al., 1991.** Culture, electron microscopy and immunoblot studies on a microsporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. *J Protozool* 38:105S-111S.
- Vossbrick, C.R., Maddox, J.V., Friedman, E.S., Debrunner Vossbrick, B.A., Woese, C.R., 1987.** Ribosomal RNA sequence suggest microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326:411-414.

- Vossbrink, C.R., Baker, M.D., Didier, E.S., Debrunner-Vossbrink, B.A., Woese, C.R., 1993.** rDNA sequences of *Enterocytozoon hellem* and *Enterocytozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. *J Eukaryot Microbiol* 40:354-362.
- Weber, R., Bryan, R.T., 1994.** Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* 19:517-521.
- Weber, R., Bryan, R.T., Owen, R.L., Wilcox, C.M., Gorelkin, L., Visvesvara, G.S., 1992.** Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.* 326:161-166.
- Weber, R., Bryan, R.T., Schwarz, D.A., Owen, R.L., 1994.** Human microsporidial infection. *Clin. Microbiol Rev* 7:426-461.
- Weber, R., Deplazes, P., Flepp, M., Mathis, A., Baumann, R., Sauer, B., Kuster, H., Lüthy, R., 1997.** Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in patient with human immunodeficient virus infection. *N. Engl. J. Med.* 336:474-478.
- Weber, R., Deplazes, P., Schwartz, D., 2000.** Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis, *Contrib. Microbiol.* 6:166–192.
- Weber, R., Kuster, H., Keller, R., Bachi, T., Spycher, M.A., Briner, J., Russi, E., Lüthy, R., 1992.** Pulmonary and intestinal microsporidiosis in patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146:1603-1605.
- Weber, R., Schwarz, D.A., Deplazes, P., 1999.** Laboratory Diagnosis of Microsporidiosis, in: *The Microsporidia and Microsporidiosis*, Wittner, M., Weiss, L.M., editors, Washington DC, Am Soc Microbiol:315-362.
- Weiss, L.M., Cali, A., Levee, E., LaPlace, D., Tanowitz, H., Simon, D., Witter, M., 1992.** Diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection by western blot and the use of cross-reactive antigens for the possible detection of microsporidiosis in human. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47:456-462.
- Weiss, L.M., Vossbrink C.R., 1998.** Microsporidiosis: Molecular and Diagnostic Aspects. *Adv. Parasitol.* 40:351-385.
- Willson, R., Harrington, R., Stewart, B., Fritsche, T., 1995.** Human immunodeficiency virus 1-associated necrotizing cholangitis caused by infection with *Septata intestinalis*. *Gastroenterology* 108:247-251.