

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích



Bakalářská práce

***Trachipleistophora hominis v kultuře
in vitro***

Vypracovala: Lenka Moravcová

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

České Budějovice, 2008

Moravcová L., 2008: *Trachipleistophora hominis* v kultuře *in vitro*. [Trachipleistophora hominis, in vitro culture]. 46 pp., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Czech Republic.

Annotation:

While most of other mammalian microsporidia are successfully cultivated *in vitro*, we failed to cultivate the *Trachipleistophora hominis* in any cell lines used - MDCK (Madin-Darby canine kidney), Vero E6 (monkey kidney), HCT-8 (human ileocecal adenocarcinoma) and Hela (human epithelial carcinoma).

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 4. ledna 2008

Lenka Moravcová

.....

Poděkování:

Na tomto místě chci poděkovat především svému školiteli RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Můj dík patří také celému kolektivu laboratoře lékařské parazitologie za vytvoření přátelské atmosféry. Rovněž chci poděkovat za podporu své rodině.

OBSAH:

1. CÍLE PRÁCE.....	4
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	4
2.1 Mikrosporidie.....	4
2.2 Hospodářský a medicínský význam.....	4
2.3 Morfologie mikrosporidií.....	5
2.4 Stavba buňky.....	6
2.5 Infekce hostitelské buňky.....	7
2.6 Životní cyklus.....	8
2.7 Taxonomie.....	9
2.8 Mikrosporidie vyskytující se u člověka.....	9
2.9 Diagnostické metody a léčba mikrosporidiózy.....	10
2.10 SCID myši.....	10
2.11 <i>In vitro</i> kultivace medicínsky významných mikrosporidií.....	11
2.11.1 <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	11
2.11.2 <i>Encephalitozoon intestinalis</i>	14
2.11.3 <i>Encephalitozoon hellem</i>	16
2.11.4 <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	18
2.11.5 <i>Trachipleistophora hominis</i>	21
2.11.6 <i>Trachipleistophora extenrec</i>	23
2.11.7 <i>Trachipleistophora anthropophthera</i>	24
2.11.8 <i>Vittaforma corneae</i>	25
2.11.9 <i>Brachiola</i> spp.....	26
3. PŘEDBĚŽNÝ POKUS.....	28
3.1 MATERIÁL A METODY.....	28
3.1.1 MATERIÁL.....	28
3.1.1.1 Spory <i>Trachipleistophora hominis</i>	28
3.1.1.2 Myši.....	28
3.1.1.3 Buněčné linie.....	29
3.2.1 METODY.....	29
3.2.1.1 Infikování myší.....	29
3.2.1.2 Izolace spor z myši.....	29
3.2.1.3 Infikování buněčných linií.....	29
3.2.1.4 Vyhodnocení úspěšnosti infekce <i>in vitro</i>	30
3.2.1.5 Barvení spor pomocí roztoku Calcofluoru White M2R.....	30
4. ZÁMĚRY DO BUDOUCNA.....	32
5. LITERATURA.....	33

1. CÍLE PRÁCE

1. Kriticky zpracovat literární rešerši na dané téma

2. Předběžný pokus:

Pokusit se založit *in vitro* kulturu *Trachipleistophora hominis* s využitím laboratorních postupů zahrnujících práci s pokusnými zvířaty, s buněčnými kulturami a se sporami mikrosporidií.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou eukaryotní obligátní intracelulární paraziti řazení do samostatného kmene Mikrosporidia. Tento kmen zahrnuje přibližně 1200 známých druhů, řazených do 150 rodů (Keeling et Fast 2002).

Většina mikrosporidií jsou paraziti členovců a ryb (Wittner 1999). Nicméně některé mikrosporidie parazitují v teplokrevných obratlovcích včetně člověka (Canning et Lom 1986, Didier et al. 1998, Wittner 1999, Cali et Takvorian 2003).

Ačkoliv mikrosporidie byly dlouho považovány za Protozoa, výsledky fylogenetických analýz ukázaly, že jsou blízce příbuzné kmenu Fungi (Keeling et McFadden 1998, Weiss et Vossbrinck 1998). V současnosti jsou mikrosporidie zařazeny v rámci kmene Fungi (Keeling et al. 2000, Keeling 2003).

2.2 Hospodářský a medicínský význam

První mikrosporidie byla popsána v polovině devatenáctého století, když pebrine pustošila chovy bource morušového (*Bombix mori*) a hrozilo zničení celého hedvábného průmyslu v Evropě. Jako původce tohoto onemocnění byl pozorován mikroskopický parazit pojmenovaný v roce 1857 Nägelim jako *Nosema bombycis*.

V současné době mají mikrosporidie hlavní dopad především na komerční chov ryb, hedvábnictví a včelařství (Becnel et Andreadis 1999, Shaw et Kent 1999).

První mikrosporidie popsaná u savců byla *Encephalitozoon cuniculi*, původně popsaná u králíků v roce 1922. Tento druh je nyní známý u širokého spektra savčích hostitelů.

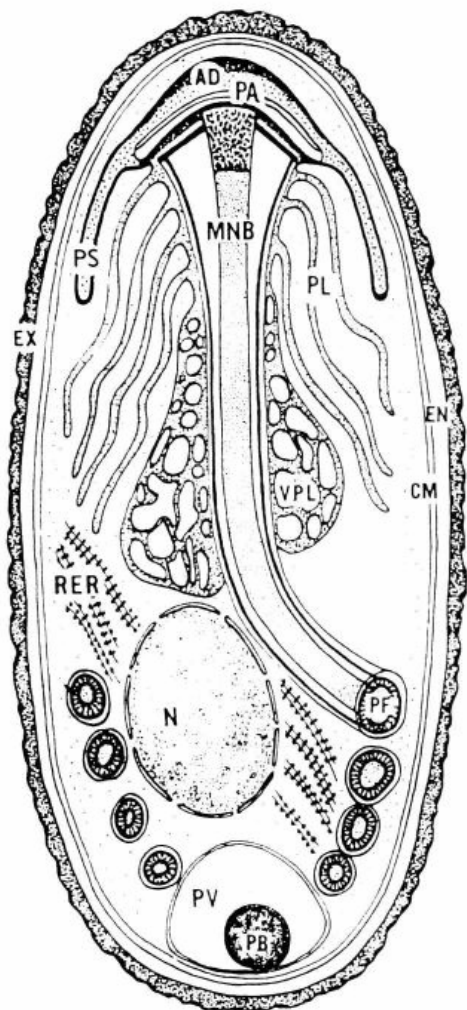
V roce 1959 byly poprvé zaznamenány případy lidských mikrosporidiových infekcí (Matsubayashi et al. 1959). Avšak tyto případy byly poměrně vzácné přibližně do poloviny sedmdesátých let dvacátého století. Tehdy dramaticky vzrostl počet zaznamenaných infekcí v důsledku nárůstu počtu imunodeficientních jedinců, buď postižených virem HIV, nebo s imunitou sníženou užíváním imunosuprimujících léků (Weber et al. 1994). Od té doby bylo popsáno mnoho dalších druhů a mikrosporidie nabyly na významu.

2.3 Morfologie mikrosporidií

Charakteristickým znakem mikrosporidií je tvorba spor (obr. 1), které jsou také infekčním stádiem. Spory jsou velice odolné vůči podmínkám vnějšího prostředí a jsou to jediná stádia, která jsou životaschopná mimo hostitelskou buňku.

Velikost spor se pohybuje od 1 μm u *Enterocytozoon bieneusi* do 40 μm u *Bacillidium filiferum*. Mohou být kulaté, oválné, tyčinkovité, hruškovité nebo srpkovité. Nicméně nejobvyklejší tvar je oválný. Některé mikrosporidie mají různý tvar v různých fázích svého vývojového cyklu. Stěna mikrosporidií je tvořena dvěma vrstvami, elektrodenzní exosporou, která je tvořena z glykoproteinu, a elektrolucentní endosporou, tvořenou chitinem a bílkovinami. Endospora je tenčí na vrcholku spory, v místě kotvícího disku. Pod vnitřní endosporou je plasmatická membrána.

Zralá spora obsahuje vystřelovací aparát, který je pro mikrosporidie typický. Tento aparát tvoří tři části: polaroplast, což je vlastně silně pozměněný Golgiho aparát; dlouhá dutá pólová trubice a posteriorní vakuola. Pólová trubice je v anteriorní části upevněna kotvícím diskem a rozeznáváme u ní dvě části. Anteriorní rovnou část, která je obklopena lamelárním polaroplastem a posteriorní část, která je stočená. Počet závitů a jejich uspořádání je druhově specifické. Pólová trubice měří od 0,1 μm do 0,2 μm v průměru a od 50 μm do 500 μm na délku (Keohane et Weiss 1999, Vávra et Larsson 1999).



Obr. 1: Struktura mikrosporidiální spory

(podle Vávra, 1976, upraveno)

AD - kotevní disk pólové trubice

CM - plazmatická membrána

EN - endospora

EX - exospora

MNB - rovná část pólové trubice

N - jádro

PA - pólový otvor

PB - posterosom

PF - pólová trubice, pólové vlákno

PL - lamelární polaroplast

PS - pólový vak

PV - posteriorní vakuola

RER - endoplazmatické retikulum
s ribozomy

VPL - měchýřkovitý polaroplast

2.4 Stavba buňky

Buňka mikrosporidií vykazuje řadu důležitých a jedinečných znaků. Nemá typický Golgiho aparát, peroxisomy ani hydrogenosomy (Vávra et Larsson 1999). Dlouho se předpokládalo, že mikrosporidie neobsahují ani mitochondrie. Byl u nich však nalezen gen pro HSP70 (heat shock protein), což naznačuje, že se mikrosporidie vyvinuly z předka, který mitochondrie obsahoval (Peyretailade et al. 1998). Za použití optické a transmisní elektronové mikroskopie byly v *Trachipleistophora hominis* objeveny početné drobné organely s dvojitou membránou, měřící přibližně 50 × 90 nm, které jsou považovány za reliktní mitochondrie (William et al. 2002). Tyto organely byly objeveny i v dalších prozkoumaných mikrosporidiích (Vávra 2005).

Mikrosporidie mají typické eukaryotní jádro, hladké i drsné endoplazmatické retikulum, vnitrobuněčný membránový systém a cytoskelet. Byla prokázána také přítomnost atypického Golgiho aparátu (Vávra et Larsson 1999).

Mikrosporidiální genom je mnohem menší, než by se u Eukaryot dalo očekávat. V rámci celého kmene se u všech doposud genotypizovaných druhů pohybuje od 2,3 Mbp do 19,5 Mbp. Navzdory jeho malé velikosti je ve všech dalších charakteristikách čistě eukaryotní: má mnohočetné lineární chromosomy, telomery a dělení blízké mitóze (Keeling et Fast 2002).

Ribozomy mikrosporidií jsou prokaryontního typu (70S), sestávající z malé podjednotky 16S a velké podjednotky 23S rRNA (ribosomální RNA). Sekvence odpovídající typicky eukaryotní 5,8S rRNA neexistuje v mikrosporidiích jako oddělená molekula, ale je začleněná do 23S rRNA (Canning et Vávra 2000).

2.5 Infekce hostitelské buňky

Mechanismus, kterým mikrosporidie pronikají do hostitelské buňky, je jedním z nejvíce sofistikovaných mechanismů vůbec. Tento mechanismus zajišťuje, že mikrosporidie je schopna proniknout do hostitelské buňky takřka nepozorovaně a zároveň je chráněna před obrannými mechanismy hostitele (Franzen 2005).

Byly objeveny dva způsoby, kterými mikrosporidie mohou pronikat do hostitelské buňky. Prvním způsobem je vystřelení pólové trubice. K vystřelení pólové trubice dochází za vhodných podmínek - změna pH, osmotického tlaku a iontových poměrů (Keohane et Weiss 1998). Mechanismus, kterým dochází k nárůstu osmotického tlaku uvnitř spory, není doposud zcela objasněn. Jednou z možných příčin je rozklad disacharidu trehalózy na monomery glukosy. Tímto se efektivně zvyšuje množství rozpuštěných molekul uvnitř spory, což vede k příjmu velkého množství vody a tím k narůstání osmotického tlaku (Keeling et Fast 2002). Při zvýšení osmotického tlaku uvnitř aktivované spory dojde k prolomení stěny v její anteriorní oblasti a vystřelení pólové trubice (Franzen 2005). Mechanismus vystřelení pólové trubice je často přirovnáván ke svlékání prstu rukavice zevnitř ven. Toto obracení začíná na vrcholku spory po prolomení její ztenčené stěny (Keohane et Weiss 1999). Jakmile je trubice plně vystřelena, přetrvávající tlak uvnitř spory

(pravděpodobně díky bobtnající posteriorní vakuole) skrz ni protlačí infekční sporoplasmu do hostitelské buňky. Přenos celé sporoplasmy trvá pouze 15 - 500 ms (Keeling et Fast 2002).

Další způsob, kterým mohou mikrosporidie pronikat do hostitelské buňky, je fagocytóza. Spora je fagocytována buňkou a fagozom s fagocytovou sporou dospívá v lysozom. Sporoplasma je schopna uniknout z dospělého lysozomu a infikovat cytoplasmu hostitelské buňky vystřelením pólové trubice (Franzen 2005).

2.6 Životní cyklus

Obecně může být životní cyklus mikrosporidií rozdělen do tří částí: infekční fáze, proliferativní fáze a fáze sporogonie (Cali et Takvorian 1999). Infekce většinou probíhá fekálně-orálním přenosem, ačkoliv i vertikální nebo transplacentární přenos je dosti běžný u masožravců (např. lišek a psů). U člověka zatím tento přenos nebyl zaznamenán (Didier et al. 1998).

Když se spora dostane do vhodného hostitele, sporoplasma je injikována do hostitelské buňky. V novém hostiteli zahájí sporoplasma reprodukci končící produkcí spor. Prvním krokem je dozrávání sporoplasmy v meronta, který se po období růstu a jaderného dělení dále dělí na dceřiné buňky, merozoity. Meronti a merozoiti jsou morfologicky identičtí. Sekrece elektrodenzního materiálu na povrch plazmatické membrány je ultrastrukturálním znakem, že parazit vstoupil do sporogoniální fáze reprodukce. Když je buňka pokryta elektrodenzním materiálem, je klasifikována jako sporont. Sporogonie zahrnuje dělení sporontů a jejich dceřiných buněk, až dokud není vytvořen konečný produkt dělení: sporoblast. Sporoblast dozrává a mění se na sporu (Vávra et Larsson 1999).

Některé mikrosporidie se vyvíjí přímo v cytoplasmě hostitelské buňky. Některé, jako například *Encephalitozoon cuniculi* a *Glugoides intestinalis*, prodělávají však svůj vývoj v parazitoformní vakuole. Tato vakuola odděluje cytoplasmu hostitelské buňky od mikrosporidie. Mechanismus, kterým mikrosporidie tuto vakuolu vytvářejí, není znám. V počátečních fázích vývoje se mikrosporidiová stádia nachází v těsné blízkosti membrány vakuoly. Během sporogonie se membrána

začíná oddělovat od povrchu parazita a sporoblasty a spory leží již volně ve středu vakuoly (Vávra et Larsson 1999, Franzen 2005).

2.7 Taxonomie

Dřívější taxonomie dělila mikrosporidie do dvou základních skupin, Pansporoblastia a Apansporoblastia v závislosti na přítomnosti nebo absenci sporoforního váčku (Canning et Lom 1986).

V současné době se mikrosporidie dělí také do dvou tříd, a to především podle buněčného cyklu, typu hostitele, morfologie spor a typu přenosu. Do třídy Dihaplophasea jsou řazeny mikrosporidie, jejichž jádro během životního cyklu tvoří diplokaryon, dvě trvale sdružená synchronně se dělící jádra. Do třídy Haplophasea řadíme ty mikrosporidie, které ve všech fázích svého vývojového cyklu mají pouze jedno izolované jádro (Sprague et al. 1992).

2.8 Mikrosporidie vyskytující se u člověka

Mikrosporidie, které způsobují onemocnění u člověka, pocházejí z osmi rodů - *Nosema*, *Vittaforma*, *Brachiola*, *Pleistophora*, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon* a *Trachipleistophora*. Všechny do současnosti nezařazené mikrosporidie jsou řazeny do rodu *Microsporidium* sp. (Juarez et al. 2005)

Mezi nejčastěji diagnostikované mikrosporidie u člověka patří *Enterocytozoon bieneusi*, který byl poprvé popsán jako gastrointestinální parazit způsobující kachexii (potenciálně smrtelné onemocnění) u AIDS pacientů. Nyní je známo, že *E. bieneusi* infikuje celou řadu lidských tkání a to především u AIDS a imunosuprimovaných pacientů. Příležitostně však infikuje i zdravé jedince (Sandfort et al. 1994)

Mikrosporidie se projevuje především u imunodeficientních jedinců, např. AIDS pacientů. U imunokompetentních lidí probíhá nemoc většinou asymptomaticky. Z tohoto důvodu jsou také mikrosporidie řazeny mezi parazity, kteří způsobují oportunní infekce.

Hlavním klinickým příznakem mikrosporidiové infekce bývá průjem. Nicméně se vzrůstajícím počtem mikrosporidií popsaných u lidí vzrůstá i počet nemocí, které

způsobují. Mezi další lidská onemocnění patří keratokonjunktivitida, pneumonie, bronchitida, nefritida, uretritida, prostatitida, hepatitida, encefalitida, myozitida a peritonitida (Weber et al. 1994, 1999; Franzen et Müller 2001).

2.9 Diagnostické metody a léčba mikrosporidiózy

Původně byla diagnóza mikrosporidií založena výhradně na transmisní elektronové mikroskopii. Mezi současné metody používané k detekci mikrosporidiózy patří světelná a elektronová mikroskopie, histologické, cytologické nebo serologické vyšetření, dále vyšetření pomocí molekulárních metod a kultivace. Pro monitorování terapie slouží cytologické metody; histologické metody zase umožňují pozorování mikrosporidií přímo ve tkáních (Garcia 2002).

V dnešní době se mikrosporidie diagnostikují z různého klinického materiálu. Jedná se o moč, stolicí, duodenální aspirát, mozkomíšní mok, sputum, bronchoalveolární laváž, nasální sekret, stěr spojivky, otisk rohovky a bioptický materiál.

K léčbě mikrosporidiózy se používá albendazol, což je širokospektrální antiparazitikum ze skupiny benzimidazolů. Jeho účinek spočívá v inhibici polymerace tubulinu. Albendazol je nepříliš účinný proti *E. bienensis*, ale je vysoce účinný vůči ostatním mikrosporidiím (Kotler et Orenstein 1999, Fournier et al. 2000). Fumagilin, ovalicin a jejich deriváty také vykazují antimikrosporidiální aktivitu. Účinek fumagilinu spočívá v ireverzibilní inhibici metionin aminopeptidázy typu 2 (MetAP2), která je kritickým enzymem pro modifikaci mnoha proteinů. Nevýhodou fumagilinu je však jeho toxicita (Zhang et al. 2005).

2.10 SCID myši

Pro studium různých aspektů oportunních infekcí u člověka i u živočichů jsou vhodným modelem imunodeficientní myši. Myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID - severe combined immunodeficient mice) byly vyvinuty na základě BALB/c myší genetickou autozomálně recesivní mutací na 16. genu. Díky této mutaci neprodukují SCID myši zralé T a B lymfocyty (Bosma et al. 1983). Tímto

defektem není však postižena nespecifická imunita. Hlavním cytotoxickým elementem jsou u těchto myši NK buňky (Heřmánek et al. 1993). Pro studium mikrosporidiózy navrhl SCID myši jako modelový organismus Koudela a kol. (Koudela et al. 1993).

2.11 *In vitro* kultivace medicínsky významných mikrosporidií

Před nástupem HIV a AIDS byla kultivace mikrosporidií zaměřena především na ekonomicky významné druhy. Mezi tyto druhy patří *Nosema apis* a *Nosema bombycis*, které parazitují u včel a bource morušového, dále *Ameson michaelis* a *Glugea stephan*, které infikují kraby a mořské ryby; *Nosema locustae* a *Vairimorpha necatrix*, oba biologické kontrolní agens zemědělských škůdců; *Brachiola (Nosema) algerae*, která infikuje *Anopheles* spp., přenašeče malárie; a *Vavraia culiceis*, která napadá *Culex* spp., přenašeče filarie (Jaronski 1984).

S narůstajícím počtem mikrosporidií popsaných u lidských hostitelů se započalo i s kultivací medicínsky významných rodů (Visvesvara 2002).

2.11.1 *Enterocytozoon bieneusi*

Desportes, Le Charpentier, Galian, Bernard, Cochand-Priollet, Larvergne, Ravisse et Modigliani, 1985

Jde jednoznačně o nejčastěji parazitující mikrosporidii u imunodeficientních i imunokompetentních lidí. Poprvé byla popsána v roce 1985 v enterocytech AIDS pacienta (Desportes et al. 1985) a nyní se předpokládá, že u více jak 30 % AIDS pacientů trpících chronickým průjmem je příčinou právě tato mikrosporidie (Weber et al. 1994).

Enterocytozoon bieneusi má výraznou tkáňovou afinitu k enterocytům duodena a jejunu, ale vyskytuje se i v dalších částech střeva a vzácněji v epitelu žlučových cest. Při těžkých imunodeficientních stavech diseminuje do epitelu dýchacích cest či dalších tkání a působí systémovou infekci. Při pozorování v elektronovém mikroskopu je tento druh charakteristický a dobře rozeznatelný. Mikrosporidie bývají lokalizovány mezi jádrem enterocytu a jeho kartáčovitým lemlem volně v cytoplasmě. Vývojová stádia jsou nejprve jednojadernými útvary, rychle dospívajícími v mnohojaderná kulovitá

plasmodia, ve kterých se záhy objevuje materiál budoucích organel spory v podobě denzních tubicovitých agregátů. Mnohoaderné plasmodium se nakonec rozpadne na velké množství spor s typickou ultrastrukturou. Pólové vlákno tvoří 6 závitů umístěných ve dvou paralelních trojicích. Spory jsou velmi drobné (1,6 μm \times 1,0 μm), tenkostěnné, ale relativně dobře odolné. Skutečnost, že *Enterocytozoon* tvoří budoucí organely spory již během časného vývoje plasmodia, je pravděpodobně přizpůsobením parazita životu v hostitelské buňce. Životnost enterocyty je krátká a zvláště infikované enterocyty jsou během několika málo dní vylučovány do střevního obsahu, kde se spory uvolní, vystřelí pólovou trubicí a injikují zárodky mikrosporidie do dalších buněk střevního epitelu.

Tato mikrosporidie byla pokládána za výhradního parazita člověka a kromě nejistého nálezu u ježka po dlouhou dobu nebyly známy infekce dalších živočichů. Více než 10 let po popisu druhu pak bylo zjištěno, že může infikovat i prasata (Deplazes et al. 1996) a dokonce se patrně podílet na život ohrožujících průjmech (Rinder et al. 1999).

Zpočátku se zdálo, že genotypizace odhalí rozdíly v infektivitě pro různé hostitele: lidské izoláty se lišily od 4 prasečích genotypů (Breitenmoser et al. 1999). Zdokonalení diagnostických metod přineslo obrat v pohledu na výskyt tohoto druhu, neboť se ukázalo, že *Enterocytozoon bieneusi* se vyskytuje v řadě genotypů v širokém hostitelském spektru, zahrnujícím kromě člověka a prasete hovězí dobytek, lamy, kozy, králíky, kočky, psy, makaky, kuřata a řadu divokých zvířat (Mathis et al. 1999, Rinder et al. 2000, Dengjel et al. 2001, Lores et al. 2002, Reetz et al. 2002, Sulaiman et al. 2003, 2004; Green et al. 2004). Počet dosud popsáných genotypů již přesáhl 50 a některé z nich možná představují odlišné druhy (Sulaiman et al. 2003). Lidské genotypy netvoří žádnou vyhraněnou skupinu a mnoho z nich je podobných prasečím a opičím. Experimentálně se též zdařily přenosy lidského izolátu na prase a makaka (Kondova et al. 1998, Green et al. 2004). Infekce lidí jsou také mnohem běžnější, než se zpočátku soudilo. Kromě imunodeficientních pacientů tato mikrosporidie infikuje i imunokompetentní jedince, především děti (Leelayoova et al. 2005), cestovatele (Fournier et al. 1998) a starší lidi (Lores et al. 2002). Infekce je většinou spojena s průjmovým onemocněním, ale někdy nejsou žádné klinické příznaky zaznamenány.

Doposud selhaly všechny snahy o udržení *Enterocytozoon bieneusi* ve stabilní *in vitro* kultuře. Při pokusech o založení stabilní kultury této mikrosporidie van Gool a

spol. (1994) injikovali do buněčných kultur vzorky stolice získané od několika pacientů, kteří byli podrobeni biopsii. Biopsie byla provedena za účelem potvrzení *E. bienewisi*. Nebyli však schopni docílit stabilní kultury *E. bienewisi*, namísto toho dosáhli zavedení stabilní kultury *Encephalitozoon intestinalis*. To bylo zřejmě způsobeno tím, že vzorky stolice obsahovaly oba druhy, *E. bienewisi* i *E. intestinalis*. Je známo, že někteří pacienti jsou současně infikováni oběma těmito rody. V těchto případech, *E. intestinalis*, kterou lze kultivovat poměrně snadněji, pravděpodobně roste rychleji a stabilizuje se, zatímco růst *E. bienewisi* selhává (Visvesvara 2002).

Visvesvarovi s kol. (1996) se podařilo docílit krátkodobých kultur některých izolátů *Enterocytozoon bienewisi*. Do buněčných linií Vero E6 (opičí fibroblasty) a HLF (lidské plicní fibroblasty) byly injikovány vzorky duodenálního aspirátu a vzorky biopsie. Tato kultura byla však v konečné fázi zničena koinfekcí adenovirem, který byl též přítomen v pacientových vzorcích. Centrifugované vzorky duodenálního aspirátu a výluhu z biopsie získané od jednoho pacienta byly injikovány do stejné kultivační nádoby. Po několika týdnech byly v kultuře pozorovány gram pozitivní spory podobné útvary, které měřily od 1 do 1,2 μm (Visvesvara et al. 1995). Při transmisní elektronové mikroskopii (TEM) byla odhalena různá stadia parazita, která byla ve shlucích, těsně nakupena u sebe. Proliferativní stadia byla charakterizována elektrocentní endosporou. Tato stadia byla také v těsném spojení s hostitelským endoplazmatickým retikulem a mitochondriemi. Zralé spory a sporoblasty obsahovaly dvojité řady závitů pólové trubice. Nicméně kultury se postupně zhoršovaly, až byly nakonec úplně ztraceny (Visvesvara 2002).

Nebyl žádný rozdíl mezi tím, zda bylo do kultivačního média EMEM (Eaglovo minimální esenciální médium) přidáno 5 % FBS (fetální bovinní sérum) a antibiotika nebo neesenciální aminokyseliny, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamin, 10 % FBS, 0,005 μg epidermálního růstového faktoru na ml, 5 μg transferinu na ml, 5 μg insulinu na 1 ml, 0,005 μg selenu, 0,0072 μg hydrokortizonu na ml, 50 μg gentamycinu na 1 ml a 5 μg amphotericinu B na 1 ml. Dokonce nebyl žádný rozdíl mezi tím, zda infikované buněčné kultury byly inkubovány v obyčejném laboratorním inkubátoru bez speciální atmosféry nebo v 5% CO_2 inkubátoru. Zatímco přidavek antibiotik může eliminovat bakteriální a houbové organismy, jestliže vzorky kontaminuje adenovirus, kultury s *E. bienewisi* jsou zničeny růstem tohoto viru (Visvesvara et al. 1996). Zatím nejsou známy

žádné účinné látky, které by dokázaly eliminovat pouze adenoviry bez současných negativních účinků na *E. bieneusi* (Visvesvara 2002).

2.11.2 *Encephalitozoon intestinalis*

(Cali, Kolter et Orenstein, 1993) Didier, Rogers, Orenstein, Baker, Vossbrinck, van Gool, Hartskeerl, Soave et Beaudet, 1996

Tento druh byl poprvé nalezen u AIDS pacienta trpícího chronickým průjmem (Blanshard et al. 1992). Původně byla tato mikrosporidie pojmenována jako *Septata intestinalis* (Cali et al. 1993) kvůli přítomnosti mimobuněčného materiálu, který rozděluje parazitoformní vakuolu na jednotlivé oblasti, septa. Na základě morfologických, imunologických, biochemických a genetických znaků byla *S. intestinalis* reklasifikována Hartskeerlem a spol. do rodu *Encephalitozoon* (Hartskeerl et al. 1995). Donedávna byl tento druh popsán pouze u člověka, později však byly protilátky imunologicky detekovány v trusu osla, psa, prasete, krávy a kozy (Bornay-Llinares et al. 1998). Tato mikrosporidie je druhou nejčastěji diagnostikovanou mikrosporidií u člověka.

Vývojový cyklus probíhá v parazitoformní vakuole, často těsně obklopené hostitelskými mitochondriemi. V průběhu celého cyklu jsou všechna vývojová stádia jednojaderná a leží v buňce ve velké vakuole, nedokonale rozdělené fibrilárními septy na nepravidelné komůrky. V proliferativní fázi se tvoří binárním dělením meronty, mají jednoduchou cytoplazmatickou membránu, izolované jádro a jednoduché cytoplazmatické organely. Meronty tohoto druhu jsou usazeny ve fibrilární síti, produkované buňkami parazita. Sporogonická fáze je charakterizována zesílením plazmalemy. Sporonty jsou často lokalizovány v centru parazitoformní vakuoly a dělí se binárně za vzniku sporoblastů. Následuje poslední dělení, během kterého se objevují organely typické pro sporu. Zralé spory měří 1,2 μm \times 2,0 μm a pólová trubice je stočená v jedné řadě do 4 - 7 závitů (Cali et al. 1993)

Encephalitozoon intestinalis se v hostiteli šíří hematogenní cestou prostřednictvím makrofágů (Oborná 1999). Infikuje především enterocyty, ale také makrofágy, fibroblasty a buňky endotelu *lamina propria*. Může diseminovat do řady dalších tkání mimo zažívací trakt či způsobit systémové infekce. V bioptickém

materiálu pozorovaném v elektronovém mikroskopu je tato mikrosporidie rozeznatelná od jiných druhů (Cali et al. 1993).

Do současnosti bylo v *in vitro* kultuře stabilizováno více než 27 izolátů této mikrosporidie - 10 izolátů bylo získáno z moči (van Gool et al. 1994, Molina et al. 1995, Visvesvara et al. 1995, Del Aguila et al. 1998, Deplazes et al. 1998), 8 ze stolice (van Gool et al. 1994), 4 ze sputa (Del Aguila et al. 1998), 3 z nasální sliznice (Doultree et al. 1995, Deplazes et al. 1996, 1998; Didier et al. 1996), 1 z bronchoalveolární laváže (BAL) (Didier et al. 1996), 1 z duodenálního aspirátu a z biopsie (Del Aguila et al. 1998). Buněčné linie použité k růstu této mikrosporidie zahrnovaly Vero E6 (opičí fibroblasty) a HLF (lidské plicní fibroblasty) (Visvesvara et al. 1995, Del Aguila et al. 1998), lidské buňky embryonálních plic (HEL) (Doultree et al. 1995), monocyty (MDM) (Doultree et al. 1995), MRC-5 (plicní fibroblasty) (Molina et al. 1995), RK-13 (králičí ledvinné buňky), MDCK (Madin-Darby psi ledvinné buňky), intestinální buňky (I 047), HT-29 (buňky lidského adenokarcinomu) a Caco-2 (lidské buňky tlustého střeva) (Didier et al. 1996). Byla použita média DMEM (Dulbeckem modifikované Eaglovo médium) (Visvesvara et al. 1995; Del Aguila et al. 1998), RPMI-1640 s přídavkem 10 % FBS (fetální bovinní sérum), 2 mM glutaminu, penicilinu a streptomycinu (Didier et al. 1996), a EMEM s přídavkem 5 % FBS, 100 U penicilinu a 100 µg streptomycinu na ml (Doultree et al. 1995).

Vzorky pacientů (moč, BAL - bronchoalveolární laváž, nasální epitel a sputum) byly zpracovány již dříve pro *E. cuniculi* a *E. hellem*. Vzorky duodenálního aspirátu a biopsie byly promyty solným roztokem, vzorky biopsie byly ještě před injikací do buněčných kultur rozmělněny a promyty (Del Aguila et al. 1998). Postup při úpravě vzorků stolice byl popsán van Goolem a spol. (1994). Vzorky stolice obsahující velké množství spor byly zahuštěny sedimentační metodou. Tyto vzorky byly získány z AIDS pacientů, u nichž byla biopsie pozitivní na *Enterocytozoon bieneusi*. Koncentrované vzorky byly poté suspendovány v roztoku antibiotik, který obsahoval 100 µg amoxilinu, vankomycinu a gentamycinu na ml a 50 µg flucytosinu na ml, umístěny na třepačku a inkubovány při 37 °C po 18 hodin. Poté byla směs centrifugována při 1550 g 10 min a sediment byl dvakrát promyt v PBS. Přibližně 400 µm této směsi bylo přidáno k narostlé kultuře RK-13 buněk (králičí ledvinné buňky) ukotvené na kolagenem ošetřené Transwell membráně (Costar) s velikostí pórů 0,4 µm a umístěné v šesti jamkovém kultivačním panelu s kultivačním médiem DMEM

s přidavkem 10 % FBS a 2,5 µg erytromycinu na 1 ml. Kultivační nádoba byla centrifugována 1070 g 30 minut, pH media se měnilo od 7 do 8. Po centrifugaci byla Transwell membrána dvakrát jemně promyta kultivačním médiem a kultivační nádoba obsahující Transwell membránu byla inkubována dva dny při 37 °C v CO₂ inkubátoru. Poté byla k Transwell membráně znovu přidána směs vzorku s antibiotiky. Každé dva dny bylo také vyměněno kultivační médium za čerstvé. Používáním těchto metod se van Gool a spol. pokoušeli docílit stabilní kultury *Enterocytozoon bieneusi*, namísto toho však získali stabilní kulturu *Encephalitozoon intestinalis* (van Gool et al. 1994).

Za použití metod původně popsanych pro manipulaci s *Encephalitozoon hellem* a *E. cuniculi* se podařilo Visvesvarovi (2002) dosáhnout stabilních kultur některých izolátů *E. intestinalis*. Běžně, po přidání parazita do kultivačních nádob a inkubaci po několik týdnů, bylo více než 85 % všech buněčných kultur infikováno. V tomto období bylo velké množství hostitelských buněk naplněno sporami a shluky spor byly také v kultivačním médiu. Buněčná suspenze obarvená Gramovým barvením také odhalila řetízky složené ze spor, každý řetízek ze dvou, tří, čtyř nebo dokonce osmi spor. Po několika měsících kultivace zničila *E. intestinalis* všechny hostitelské buňky v kulturách. V této fázi byly na povrchu kultivačních nádob zřetelné cytoskeletální elementy zničených hostitelských buněk a spory, některé z nich s vystřelenou pólovou trubicí. TEM odhalila vývoj parazita uvnitř parazitiformní vakuoly, která připomínala včelí plástev s přepážkami (Visvesvara 2002).

2.11.3 *Encephalitozoon hellem*

Didier, Didier, Friedberg, Stenson, Orenstein, Yee, Tio, Davis, Vossbrinck, Millichamp et Shaddock, 1991

Tento druh byl izolován z rohovkové tkáně a ze stěrů spojivky tří AIDS pacientů s keratokonjunktivitidou (Didier et al. 1991). Jde o třetí nejčastější mikrosporidii působící lidské infekce. Postihuje oči, dýchací a urogenitální trakt a působí i diseminované infekce (Schwartz et al. 1993, Weber et al. 1993, Didier et al. 1996). Morfologicky jej nelze odlišit od *Encephalitozoon cuniculi* ani s použitím elektronového mikroskopu. Původně byl odlišen na základě antigenních rozdílů (Didier et al. 1991), zatímco dnes k tomu slouží především molekulární analýzy.

Encephalitozoon hellem způsobuje onemocnění lidí a ptáků, které se u lidí většinou projevuje jako oportunní infekce u imunosuprimovaných jedinců. Nedávno byl rovněž diagnostikován u kaloně egyptského (*Rousettus aegyptiacus*), což rozšiřuje jeho hostitelské spektrum (Childs-Sanford et al. 2006). Klinické příznaky mohou být různé, od asymptomatického roznášení spor až po selhání postiženého orgánu. U lidí může mít infekce *E. hellem* následující klinické projevy: keratokonjunktivitida, sinusitida, rhinitida, pneumonie, nefritida, ureteritida, prostatitida, cystitida a diseminované infekce (Franzen et Müller 2001).

Spory *Encephalitozoon hellem* měří 1,0 - 1,5 × 2,0 - 2,5 μm, mají monokaryotické jádro a pólová trubice je stočena do 6 - 8 závitů.

Podobně jako u dalších druhů mikrosporidií (např. *Encephalitozoon cuniculi* a *Enterocytozoon bieneusi*), byla genetická a fenotypová vnitrodruhová variabilita objevena i u *Encephalitozoon hellem*. Jasný důkaz takové variability poskytl Xiao a kol. (2001). Analýzou nukleotidových sekvencí genu pro PTP (polar tube protein) rozdělili 24 lidských izolátů *E. hellem* do čtyř genotypů. V další studii byl mezi sedmi *E. hellem* izoláty, získaných z HIV pozitivních pacientů, analýzou genu pro PTP objeven další, pátý genotyp. Na základě typu repetice se rozlišují dvě alelické rodiny. První (genotyp 1A, 1C a 1D) má pouze 60 bp dlouhé repetice, druhá (genotyp 2B a 2C) má navíc i 66 bp repetice (Haro et al. 2003).

Didierová a spol. (1991) dosáhli úspěšné kultivace tří izolátů parazita v *in vitro* kultuře. Jeden z těchto izolátů byl získán z tkáně rohovky AIDS pacienta a další dva ze stěrů spojivky dalších dvou AIDS pacientů. Vzorky z tkání pacientů byly rozmělněny a injikovány do MDCK (Madin-Darby buňky psích ledvin) buněčné kultury, poté byly inkubovány při 37 °C. Bylo použito kultivační médium PRMI obsahující 5 % FBS. Ačkoliv tyto izoláty byly původně morfologicky identifikovány jako *E. cuniculi*, podle molekulárních analýz byly identifikovány jako *E. hellem* (Didier et al. 1991).

V současnosti je více než 30 izolátů *Encephalitozoon hellem* udržováno ve stabilních *in vitro* kulturách. Tyto izoláty pochází z různých částí světa (Velké Británie, Španělska, Švýcarska, Itálie a USA) a také z různých klinických vzorků. Některé ze stěrů rohovky a spojivky (Didier et al. 1991, 1996), moči (Visvesvara et al. 1991, 1994; Deplazes et al. 1996, 1998; Didier et al. 1996, Croppo et al. 1998), bronchoalveolární laváže (Gatti et al. 1997, Scaglia et al. 1994, 1997, 1998; Croppo et al. 1998), sputa (Visvesvara 2002), torakálního výplachu (Scaglia et al. 1994, 1997,

1998; Gatti et al. 1997) a nasální sliznice (Hollister et al. 1993, Croppo et al. 1998). Ke kultivaci těchto izolátů byly použity buněčné linie Vero E6, HLF, MRC-5, MDCK, RK-13 a fetální bovinní plicní fibroblasty. Jako kultivační médium bylo použito EMEM nebo RPMI-1400 s přidavkem FBS. Kultury byly kultivovány při 37 °C buď v inkubátoru s CO₂ nebo v běžném laboratorním inkubátoru bez speciální atmosféry.

Před přidáním spor do buněčných kultur se v různých laboratořích používají různé metody přípravy vzorku. Například Scaglia a spol. (1994) inkubovali vzorky v roztoku obsahujícím glutamin, 500 µg streptomycinu, 100 µg gentamycinu, 50 µg neomycinu a 25 µg amphotericinu B na 1 ml 2 hodiny při 37 °C.

Úspěšná stabilizace kultury je indikována zvýšeným výskytem spor v kultivačním médiu. Jak pokračuje rozvoj, ohniska infekce se rozšiřují a v několika málo týdnech je 70 - 80% buněk v kultuře infikováno. Hostitelské buňky jsou kompletně naplněny sporami (Visvesvara et al. 1996) a prohlížení TEM odhalí parazitoformní vakuoly naplněny jak vývojovými stádii, tak dospělými sporami (Visvesvara et al. 1999).

2.11.4 *Encephalitozoon cuniculi*

Levaditi, Nicolau et Schoen, 1923

Mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* byla poprvé izolována z mozku, míchy a ledvin králíka s motorickou paralýzou v roce 1922 (Wright et Craighead 1922) a v roce 1923 byla pojmenována (Levaditi et al. 1923).

Ze všech savčích druhů má pravděpodobně nejširší hostitelské spektrum a je také nejlépe prostudovanou mikrosporidií. Přirozené infekce byly zaznamenány u celé řady druhů savců, zahrnující hlodavce, zajíce, šelmy, přežvýkavce a také primáty (Canning et Hollister 1987, Didier et al. 1998).

Encephalitozoon cuniculi byl také první úspěšně izolovanou mikrosporidií ze savce převedenou do buněčné kultury (Shaddock 1969), což zajistilo dostatečný zdroj mikrosporidií pro vývoj diagnostických metod a studium experimentálních infekcí laboratorních zvířat.

Encephalitozoon cuniculi se vyvíjí intracelulárně v parazitoformní vakuole vytvořené z endoplazmatického retikula hostitelské buňky (Weidner 1975). Všechna

vývojová stádia mají během vývojového cyklu jednoduché jádro. Merogonie probíhá binárním dělením, meronti zůstávají v blízkosti membrány vakuoly. Jsou kulatí nebo ovální, někdy nepravidelných tvarů, velikost se pohybuje v rozmezí $2 - 6 \times 1 - 3 \mu\text{m}$. Sporonti se nacházejí volně v centru vakuoly. Sporogonie je většinou bisporoblastická, dávající vznik dvěma sporoblastům, ale byla zaznamenána i tetrasporoblastická. Po naplnění parazitoformní vakuoly sporami dochází k prasknutí stěny této vakuoly a posléze i ruptuře membrány hostitelské buňky, přičemž jsou infekční spory uvolněny do okolního prostředí. Velikost spor *E. cuniculi* se pohybuje mezi $2,0 - 2,5 \times 1,0 - 1,5 \mu\text{m}$ a pólová trubice tvoří 5 - 7 závitů v jedné řadě (Canning et Lom 1986).

Encephalitozoon cuniculi infikuje celou řadu hostitelských buněk jako jsou např. endoteliální buňky cév a tubulů ledvin, epiteliální buňky a ostatní typy buněk ve většině tkání, nejčastěji však v mozku a ledvinách (Gannon 1980), kde působí zánětlivé změny, které se klinicky projevují jako granulomatózní vaskularitida, meningoencefalitida a intersticiální nefritida. Je schopný přežít v buňkách hostitele navzdory aktivované imunitní odpovědi. Konkrétně přežívá v makrofázích, jejichž prostřednictvím se šíří do celého těla. Nejčastějším způsobem přenosu infekce je inhalace a ingesce. Infekční spory se do volného prostředí dostávají exkrementy - močí a výkaly. Bylo zjištěno, že velká část populace se během svého života s touto mikrosporidií setkala, protože mnoho jedinců bez klinických projevů infekce bylo serologicky pozitivních (10 - 14 % osob pobývajících v tropech) (Hollister et al. 1991, van Gool et al. 1997).

Na základě biochemických, imunologických a molekulárních rozdílů byly popsány tři genotypy (kmeny) *E. cuniculi*. Kmen I byl původně izolován a kultivován z králíků (Shaddock 1969), kmen II pochází z myši, ale později byl nalezen v norských polárních liškách (*Alopes lagopus*) (Didier et al. 1995) a kmen III byl původně popsán u domácích psů (Shaddock et al. 1978). Tyto kmeny nejsou přísně hostitelsky specifické. *Encephalitozoon cuniculi* kmen I a kmen III byly nalezeny u HIV-infikovaných jedinců, kmen I ve Švýcarsku (Deplazes et al. 1996) a kmen III v USA (Didier et al. 1996).

Lidské izoláty všech tří *Encephalitozoon* (*E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*) a izoláty *E. cuniculi* ze zvířat jsou morfologicky identické za použití světelné mikroskopie. Navíc *E. cuniculi* je morfologicky neodlišitelný od *E. hellem* jak světelnou tak elektronovou mikroskopií.

Do současnosti bylo do stabilní *in vitro* kultury zavedeno 13 izolátů *E. cuniculi* pocházejících z různých lidských vzorků, zahrnujících moč, bronchoalveolární laváž (BAL), sputum a tkáň mozku. Tyto izoláty pocházely z různých zemí - Velká Británie, Itálie, USA, Španělsko a Švýcarsko (Visvesvara 2002). Metody používané k zavedení kultury této mikrosporidie jsou poměrně jednoduché. Například De Groote a spol. (1995) docílili stabilní kultury *E. cuniculi* získané z moči a sputa AIDS pacienta za použití následujících technik. K zavedení kultury byl vzorek moči centrifugován při 1500 g a po centrifugaci byl odsán supernatant. Sediment byl dvakrát promyt pomocí centrifugace a sterilní destilované vody. Poté byl sediment přidán k buněčné kultuře Vero E6, která byla udržována v kultivačním médiu (EMEM) obohaceným o 2 mM glutamin, 10 % FBS, a 50 µg gentamycinu, 1 mg piperacillinu a 5 µg fungizonu na 1 ml. Tyto látky se do média přidávají, aby zabránily růstu bakterií a hub. Vzorek sputa byl ošetřen Sputolysinem a dvakrát promyt v 50 ml destilované vody. Poté byl odsán supernatant a sediment byl suspendován v 1 ml destilované vody a přidán do buněčné linie HLF (lidské plicní fibroblasty) s přidavkem stejných antibiotik jako v předchozím případě. Médium z každé kultivační nádoby bylo v první týdnu vyměňováno za čerstvé každý den a poté dvakrát týdně. Kultury byly inkubovány při 37 °C. Po čtyřech až šesti týdnech od přidání vzorků byla provedena kontrola. V kultivačním médiu bylo objeveno velké množství spor a mnoho Vero E6 i HLF buněk bylo zvětšeno a naplněno vývojovými stádii i zralými spory (Visvesvara et al. 1999). Byla provedena centrifugace a následně nátěr ze získaného sedimentu. Aby byla prokázána přítomnost spor, bylo použito barvení chromotropem 2R (Weber et al. 1992) nebo Gramovo barvení (Moura et al. 1997).

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) infikovaných buněčných linií odhalila přítomnost nerozdělené parazitoformní vakuoly, která obsahovala různá vývojová stádia. Mikrosporidie byly identifikovány jako *E. cuniculi* na základě PCR analýzy DNA získané z infikovaných kultur (De Groote et al. 1995).

V roce 1995 dosáhli zavedení stabilní *in vitro* kultury *E. cuniculi* také Hollisterová a spol. (1995). Použitá buněčná linie byla MDCK a použitý vzorek pocházel z moči AIDS pacienta. Vzorek byl centrifugován při 1500 g 30 min a sediment se spory byl resuspendován v médiu EMEM s přidavkem 200 U penicilinu, 200 µg streptomycinu a 2,5 µg fungizonu na 1 ml a inkubován 4 hodiny při 37 °C. Poté byla suspenze se spory centrifugována a spory byly resuspendovány

v EMEM s 10 % FBS a přidány do buněčné kultury MDCK. Buněčné kultury byly poté inkubovány v 5% CO₂ atmosféře. Izolát byl identifikován jako *E. cuniculi* na základě elektronové mikroskopie a DNA analýzy.

Následně bylo do stabilní *in vitro* kultury zavedeno mnoho izolátů *E. cuniculi*. Zejména sedm izolátů ze Švýcarska bylo stabilizováno v lidských embryonálních plicních fibroblastech (MRC-5) (Deplazes et al. 1996, Mathis et al. 1997, Weber et al. 1997, Deplazes et al. 1998). Tyto izoláty byly získány z moči, bronchoalveolární laváže (BAL), nasálního aspirátu a mozkomíšního moku. K zavedení stabilních kultur těchto izolátů byly použity promyté sedimenty z různých klinických vzorků. Sedimenty byly resuspendovány v 10 ml 5 mM HCl, inkubovány 10 min při laboratorní teplotě, následně dvakrát promyty Hanksovým balančním roztokem a přidány k buněčné linii MRC-5 v mediu EMEM s přídavkem 10 % FBS, 100 U penicilinu, 100 µg streptomycinu a 0,25 µg fungizonu na 1 ml a inkubovány v CO₂ atmosféře při 37 °C.

Ačkoliv mnoho izolátů *E. cuniculi* úspěšně roste za použití různých výše popsaných metod, u některých izolátů snahy o zavedení stabilní kultury selhávají i navzdory opakovaným snahám (Visvesvara 2002).

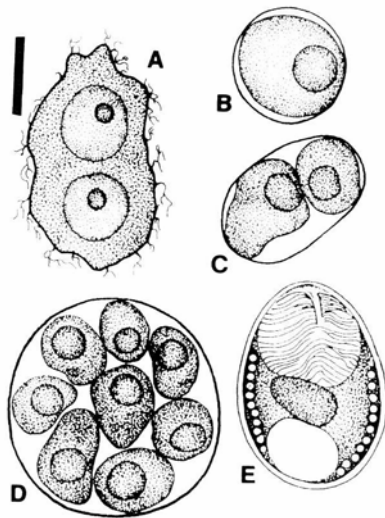
2.11.5 *Trachipleistophora hominis*

Hollister, Canning, Weidner, Field, Kench et Marriott, 1996

Trachipleistophora hominis byla jako nový druh popsána v roce 1996, kdy byla podle ultrastrukturálních znaků odlišena od rodu *Pleistophora* (Hollister et al. 1996).

Všechna vývojová stádia mají na vnější části plasmatické membrány elektrodenní povrchovou vrstvu. Jádro je po celou dobu vývoje parazita nepárové. Při merogonii dochází hlavně k binárnímu dělení binukleárních merontů za vzniku dvou jednojaderných merontů (obr. 2). Vícejaderní meronti se čtyřmi nebo více jádry se dělí plasmotomií, což je rozpad na menší části. Tyto části obsahují proměnlivý počet jader a dělení pokračuje až do vzniku jednojaderných merontů. Ve sporogoniální fázi dochází k oddělení sporontů od povrchové vrstvy, která dává základ sporoforní vakuole (Field et al. 1996). Uvnitř sporoforní vakuoly dochází k opakovanému binárnímu dělení za vzniku jednojaderných sporoblastů a spor. Se vzrůstajícím počtem

dělení dochází i ke zvětšování sporoforní vakuoly (Hollister et al. 1996, Canning et Vávra 2000). Sporoforní vakuola měří od 5 μm průměrně do 14 \times 11 μm a obsahuje od 2 do 32 spor. Spory jsou hruškovitého tvaru s výraznou posteriorní vakuolou a měří 4 \times 2,4 μm . Pólová trubice je stočena v 11 závitěch a plně vystřelená měří nejméně 75 μm (Hollister et al. 1996).



Obr. 2: *Trachipleistophora hominis*
(podle Canningové a Vávry, 2000, upraveno)

A - binukleární meront

B, C, D - zvětšující se sporoforní vakuola díky opakujícímu se binárnímu dělení při produkci sporoblastů

E - spora

měřítko 2 μm

Trachipleistophora hominis byla nalezena v kosterním svalstvu člověka. Poprvé byla izolována v roce 1985 z imunodeficientního pacienta, který však nebyl HIV pozitivní. Podruhé byla popsána u AIDS pacienta v roce 1993. Ve třetím případě, který byl diagnostikován v Austrálii, byla infekce nalezena kromě svalů i v epitelu rohovky a nasofaryngeálním sekretu (Hollister et al. 1996). Člověk je také jediným známým přirozeným hostitelem tohoto parazita (Garcia 2002). *Trachipleistophora hominis* je však schopna vyvíjet se ve tkáních moskytů, což podporuje myšlenku, že původně se člověk nakazil od bezobratlého hostitele této mikrosporidie (Koudela et al. 2004).

Typickými příznaky při infekci *T. hominis* je silná neustupující bolest svalů a vysoká horečka, obvykle kolem 40 °C. Při biopsii a histologii z postižených tkání bývají odhaleny typické rozsáhlé léze sestávající z centrální nekrotické oblasti, které jsou obklopeny silně infikovanými svalovými vlákny (Lafranchi-Tristem et al. 2001).

K léčbě *T. hominis* je úspěšně používán albendazol, sufadiazin a pyrimethamin (Field et al. 1996).

Hollisterová a spol. (1996) byli úspěšní při infekci buněčných linií stejně tak i při infekci athymických myší, dokonce i když materiál byl přijat až devět dní po tom,

co byl získán od pacienta. Purifikované spory, získané ze stěru rohovky a biopsie svalů, byly přidány k několika buněčným liniím – MDCK, RK-13 (králičí ledvinné buňky), COS-1 (buňky opičích ledvin), L6-C10 (lidská buněčná linie) a MM (myší myoblasty). Buněčné linie MDCK a RK-13 byly kultivovány v MEM s 10 % FBS; COS-1 a L6-C10 v DMEM s přidavkem 2 mM glutaminu a 10 % FBS a MM byly kultivovány v DMEM s 10 % FBS a 10 % koňského séra.

Za účelem získání spor z biopsie svalu byly tyto vzorky rozmělněny a inkubovány s přidavkem 0,25 % trypsinu při 37 °C po dobu 15 min. Poté byla tato suspenze dvakrát promyta centrifugováním a sediment byl navrstven na 50% Percoll v PBS. Po promytí byly spory resuspendovány v PBS a spočítány. Poté bylo do každé kultivační nádoby s buněčnou linií aplikováno 10^5 spor. Ačkoliv všechny použité buněčné linie podporovaly růst této mikrosporidie, buněčná linie COS-1 se nakonec ukázala pro růst *T. hominis* jako nevhodnější a nejvíce podporovala růst všech vývojových stádií. Druhou nejvhodnější se ukázala být buněčná linie RK-13. Byla popsána všechna vývojová stádia tohoto parazita a na základě analýz fotografií z TEM bylo usouzeno, že tento izolát se morfologicky liší od *Pleistophora* a proto byl ustanoven nový druh *T. hominis* (Hollister et al. 1996).

2.11.6 *Trachipleistophora extenrec*

Vávra, Horák, Modrý, Lukeš et Koudela, 2006

Tato mikrosporidie byla poprvé izolována ze svalových lézí bodláka páskovaného (*Hemicentetes semispinosus*), madagaskarského hmyzožravce. Vávrou a spol. (Vávra et al. 2006) byla spory *T. extenrec* intramuskulárně infikována SCID myš. Materiál získaný ze svalových lézí této myši byl použit pro popis tohoto nového parazita.

Všechna vývojová stádia této mikrosporidie byla pokryta elektrodenzní vrstvou, která se během sporogonie změnila na stěnu sporoforní vakuoly. Uvnitř sporoforní vakuoly dochází k dělení mnohojaderných plazmodií za vzniku 8, 16, 32 nebo i více spor. Spory jsou oválné a měří $4,7 \mu\text{m} \times 2,8 \mu\text{m}$, obsahují výraznou posteriorní vakuolu a pólová trubice je isofilární, stočená do 15 - 16 závitů (10 - 11 závitů kopíruje stěnu spory a další 4 - 5 závitů je umístěno v druhé linii lokalizované více ke středu spory).

Předpokládá se, že bodlíni se mikrosporidii *T. extenrec* infikovali ze své potravy. Vzhledem k tomu, že Vávrovi a spol. se podařilo infikovat imunodeficientní SCID myš, je tato mikrosporidie potenciálním parazitem i pro ostatní savce včetně člověka (Vávra et al. 2006)

Koudela a spol. opakovanými pokusy o kultivace potvrdili vystřelení pólových trubic spor v kultivačním mediu. Následný růst byl pozorován pouze v buňkách RK-13, přičemž v průběhu další kultivace docházelo k úbytku počtu sporoforních měchýřků a přerůstání neinfikovanými buňkami. Jako pozitivní kontrola kultivačních podmínek byla použita buněčná linie RK-13 infikovaná mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi*. (Koudela B., ústní sdělení).

2.11.7 *Trachipleistophora anthropophthera*

Vávra, Yachnis, Shadduck et Orenstein, 1998

Tato mikrosporidie byla poprvé popsána z diseminovaných infekcí AIDS pacientů (Yachnis et al. 1996, Vávra et al. 1998).

Poté byla tato mikrosporidie izolována z rohovky dvaadvaceti letého, HIV pozitivního muže, který trpěl chronickou keratitidou (Juarez et al. 2003). Materiál získaný ze stěru rohovky byl suspendován v PBS a takto připravený vzorek byl přidán do kultivační nádoby, která obsahovala fibroblasty z dospělého myšního mozku. Jako kultivační médium bylo použito MEM (minimální esenciální médium) s přidavkem 5 % FBS a. Kultivační nádoby byly inkubovány při 37 °C v 5% CO₂ inkubátoru.

Imunodeficientní lidé jsou jediným známým přirozeným hostitelem této mikrosporidie. *Trachipleistophora anthropophthera* nejčastěji způsobuje keratitidu a encefalitidu, může však diseminovat do řady orgánů (Visvesvara 2002)

Při vyšetření TEM a SEM (skenovací elektronový mikroskop) byly objeveny hojné oválné spory měřící 3,7 μm × 2,2 μm a kulaté spory měřící 1,7 μm × 1,6 μm. Spory obou tvarů byly v buněčné kultuře pozorovány dva týdny po inkubaci. Při TEM byly odhaleny dva typy sporoforních vakuol. Multisporogoniální vakuola obsahovala od 8 do 56 spor typu I. Bisporogoniální vakuola obsahovala pouze dvě spory typu II. Spory typu I mají tenkou elektrodenzní stěnu, zvlněnou exosporu a silnou elektrolucentní endosporu. Pólová trubice tohoto typu spor je anisofilární, stočena

v devíti silných závitech a dvou tenčích závitech posunutých ke středu spory. Spory typu II mají tenkou elektrodenzní exosporu a silnější elektrotransparentí endosporu. Pólová trubice je isofilární a je stočena ve 2 - 3 závitech. Existence tohoto dimorfismu spor, byla významným důkazem, že tento izolát je *Trachipleistophora anthropophthera* (Juarez et al. 2003).

2.11.8 *Vittaforma corneae*

(Shadduck, Meccoli, Davis et Font, 1990) Silveira et Canning, 1995

Tato mikrosporidie byla poprvé izolována z rohovky imunokompetentního pacienta (Shadduck et al. 1990) a později kultivována *in vitro* a pojmenována jako nový druh *Nosema corneum*. Tento druh byl zařazen do rodu *Nosema* na základě diplokaryotického uspořádání jádra a předpokládané disporoblastické sporogonie. Přítomnost cisterny hostitelského endoplazmatického retikula obklopující odděleně každého z parazitů byla tehdy označena jako neobvyklý jev pro rod *Nosema*.

Na základě pozorování ultrastruktury a po zjištění, že jediné čím se *Nosema corneum* podobá ostatním zástupcům rodu *Nosema*, je diplokaryotické jádro, bylo navrženo přearazení této mikrosporidie do jiného rodu. Bylo však zjištěno, že sporogonie není disporoblastická, ale polysporoblastická a že každý jedinec je po celý vývojový cyklus obklopen cisternou hostitelského endoplazmatického retikula, což nemá obdoby u žádného jiného diplokaryotického druhu mikrosporidií. Bylo tedy navrženo zavedení nového rodu, který byl podle tvaru spor pojmenován *Vittaforma* z latinského VITTA (pásek, stuha) a FORMA (tvar). Následovalo také upravení druhového jména podle latinské gramatiky z *corneum* na *corneae*.

Vittaforma corneae má po celou dobu vývojového cyklu jádro diplokaryotického uspořádání. Všechna vývojová stádia jsou individuálně obalena cisternou endoplazmatického retikula, na níž nasedají ribozomy hostitelské buňky. Merogonie probíhá binárním dělením, sporogonie je polysporoblastická dávající vznik 4 - 8 sporám. Velikost spor je 3,8 μm \times 1,2 μm a počet závitů pólové trubice se pohybuje od 5 do 7 závitů (Silveira et Canning 1995a,b).

První úspěšná kultivace této lidské mikrosporidie byla popsána Shadduckem a spol. (1990). Mikrosporidie identifikována jako *Nosema corneum* (dnes *Vittaforma*

corneae) byla izolována z biopsie rohovky pětáctyřicetiletého imunokompetentního muže. Shaddock a spol. (1990) použili několik metod k izolaci spor. Část rohovky byla rozmělněna a přímo přidána do tří různých buněčných linií: SIRC (buňky králičího rohovkového epitelu), MDCK a králičí embryonální fibroblasty, získané ze 14 - 16 denních plodů. Druhá část rohovkového epitelu byla ošetřena 0,1% trypsinem a 0,25% kolagenázou. Takto připravený vzorek byl poté přidán ke stejným buněčným liniím jako v předchozím případě. Buněčné kultury byly kultivovány v EMEM s přidavkem 5 % FBS a 0,1 % gentamycinu a inkubovány v inkubátoru s 5% CO₂ atmosférou. Po třiceti dnech byla ložiska infekce pozorována v buněčných liniích SIRC a MDCK, do kterých byla přidána rohovková tkáň ošetřená trypsinem a kolagenázou. Naproti tomu, nebyla objevena žádná infekce králičích embryonálních buněk ani žádná infekce v buněčných liniích, do kterých byla rohovková tkáň přidána přímo, bez ošetření trypsinem a kolagenázou.

Vittaforma corneae úspěšně roste v buněčných liniích Vero E6 a HLF a také v MDCK a RK-13. Na rozdíl od druhů rodu *Encephalitozoon* spory *V. corneae* v buněčné kultuře kompletně obklopují jádro hostitelské buňky.

Nedávno dosáhli zavedení stabilní buněčné kultury *V. corneae* i Deplazes a spol. (1998), kteří do buněčné linie MRC-5 aplikovali centrifugovaný vzorek moči.

2.11.9 *Brachiola* spp.

Rod *Brachiola* byl poprvé izolován ze skeletálních svalů AIDS pacienta, trpícího myositidou (Cali et al. 1998). Původně byla *Brachiola* zařazena do čeledi Nosematidae kvůli jejím vývojovým charakteristikám: diplokaryotické jádro, vývojová stádia v přímém kontaktu s hostitelskou cytoplazmou, nepřítomnost plazmodiálních stádií a disporogoniální sporogonie. Unikátním znakem rodu *Brachiola* je její tolerance k teplotě 37 °C. Spory jsou oválné a měří 2,9 μm × 2,0 μm, pólová trubice je stočena v 7 - 8 závitech.

V současnosti jsou do rodu *Brachiola* řazeni čtyři zástupci: *Brachiola vesicularum*; *Brachiola algerae*, dříve *Nosema algerae*; *Brachiola connori*, dříve *Nosema connori* a *Brachiola gambiae*, dříve *Nosema stegomyiae*. Všechny tyto druhy, kromě *B. gambiae*, byly diagnostikovány u člověka (Cali et al. 2004).

Brachiola algerae (původně *Nosema algerae*) Vávra et Undeen 1970 se vyskytuje jak u imunokompetentních hostitelů, kde způsobuje keratokonjunktivitidu, tak u imunodeficientních pacientů, u nichž způsobuje kožní infekce (Visvesvara 2002).

Nosema algerae získaná z moskytů (nyní reklasifikována na *Brachiola algerae* (Lowman et al. 2000)) byla kultivována v buňkách prasečích ledvin při teplotách 26 a 35 °C a spory získané z této *in vitro* kultivace byly schopny znovu infikovat moskyty (Undeen 1975). Nicméně, když byly kultury inkubovány při 37 a 38 °C, parazit byl sice schopný proniknout do buněčných linií, ale do tří dnů zahynul a neprodukoval žádné spory, při 38 °C nebylo dokonce zaznamenáno ani proniknutí do buněk. Nedávno však *Brachiola algerae* izolovaná z moskyta byla schopna růst a produkovat životaschopné spory při 37 °C (Moura et al. 1999).

Brachiola algerae, získaná z lidské infekce, byla úspěšně zavedena do stabilní *in vitro* kultury poměrně nedávno. Jako první byla stabilizována buněčná linie HLF (lidské plicní fibroblasty). Do této buněčné kultury byl přidán vzorek získaný ze stěru rohovky, do tohoto vzorku byla přidána stejná antibiotika, která byla již popsána pro *E. cuniculi* (De Groote et al. 1995). Následně byl tento izolát schopný růstu i v buněčné linii Vero E6. Druhý izolát *Brachiola algerae*, získaný ze stěrů kůže imunodeficientního dítěte, které bylo postiženo akutní leukémií, byl zaveden do stabilní *in vitro* kultury HLF a Vero E6 buněk. Spory a všechna vývojová stádia *B. algerae* se vyvíjí volně v cytoplazmě hostitelské buňky a v těžce infikovaných buňkách se spory stejně jako vývojová stádia objevují v těsné blízkosti jádra hostitelské buňky (Visvesvara 2002).

3. PŘEDBĚŽNÝ POKUS

V předběžném pokusu jsem se pokoušela o zavedení stabilní kultury *Trachipleistophora hominis* do čtyř buněčných linií - MDCK, Vero E6, HCT-8 a HeLa. Ukázalo se, že ani jedna z těchto buněčných linií není vhodná pro růst této mikrosporidie.

3.1 MATERIÁL A METODY

3.1.1 MATERIÁL

3.1.1.1 Spory *Trachipleistophora hominis*

Byly použity spory rodu *Trachipleistophora hominis*, které byly vyizolovány z AIDS pacienta Hollisterovou a kol. (1996). Spory byly uchovávány ve sterilní destilované vodě v lednici při 4°C.

3.1.1.2 Myši

Myši kmene SCID

V práci byly použity imunodeficientní myši kmene SCID obou pohlaví. Myši tohoto kmene původně pocházejí od Dr. G. C. Bosmy (Fox Chase Cancer Center Philadelphia, USA). SCID myši byly chovány v izolátorech (BEM Znojmo, Česká republika) s HEPA filtry, krmeny komerční směsí (TOP – VELAZ Praha, Česká republika) a napájeny vodou *ad libitum*. Všechny klece, podestýlka, potrava a voda byly před použitím sterilizovány.

3.1.1.3 Buněčné linie

Hela buňky

- lidské rakovinné buňky (rakovina děložního čípku)

HCT-8

- lidské buňky střevního adenokarcinomu

MDCK

- buňky z psích ledvin

Vero E6

- opičí fibroblasty

Buňky byly kultivovány v RPMI-1640 mediu s 2,5 % bovinního fetálního séra (ZVOS) a s přidavkem antibiotik a antimykotik (Sigma) při 37°C v termostatu.

3.2.1 METODY

3.2.1.1 Infikování myši

Myši byly infikovány za účelem udržení infekceschopných spor. Infekce myši byla prováděna intramuskulárně, do zadních končetin dávkou 10^4 spor v 50 μ l fyziologického roztoku (PBS).

3.2.1.2 Izolace spor z myši

Myši byly usmrceny a byla provedena pitva. V zadních končetinách byly objeveny rozsáhlé infekční léze bílé barvy. Tyto léze byly vyjmuty a byla připravena suspenze spor protlačením získaných exisí přes sítko. Počet spor v suspenzi byl stanoven počítáním v Bürkerově počítací komůrce.

3.2.1.3 Infikování buněčných linií

Buněčné linie byly kultivovány v kompletním kultivačním mediu RPMI-1640 s přidavkem 2,5 % bovinního séra. K plně narostlým buněčným liniím byla sterilně

přidána suspenze spor, 1 ml s obsahem 10^6 spor do každé buněčné linie. Buněčné linie s přidanou suspenzí byly kultivovány v termostatu při 37°C.

3.2.1.4 Vyhodnocení úspěšnosti infekce *in vitro*

Buněčné kultury byly po infekci průběžně kontrolovány a v rozmezí 1-2 týdnů od přidání spor byla provedena kontrola, zda jsou buňky infikovány. Buněčné linie byly několikrát promyty čistým médiem a poté byly buňky seškrábány ze dna kultivační nádoby. Jejich suspenze byla nanesena na podložní sklíčko, barvena Calcofluorem (Sigma) a prohlížena fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení $1000\times$ s olejovou imerzí při vlnové délce 490 nm.

3.2.1.5 Barvení spor pomocí roztoku Calcofluoru White M2R

Použité roztoky:

- Evansova modř (0,5% v PBS)
- Calcofluor White M2R (0,1% PBS)
- PBS (fosforečnan sodný 3,6 g, dihydrogenfosforečnan draselný 9,1 g, chlorid sodný 8,5 g, doplnit destilovanou vodou do 1 l; pH 7,2 - 7,4)

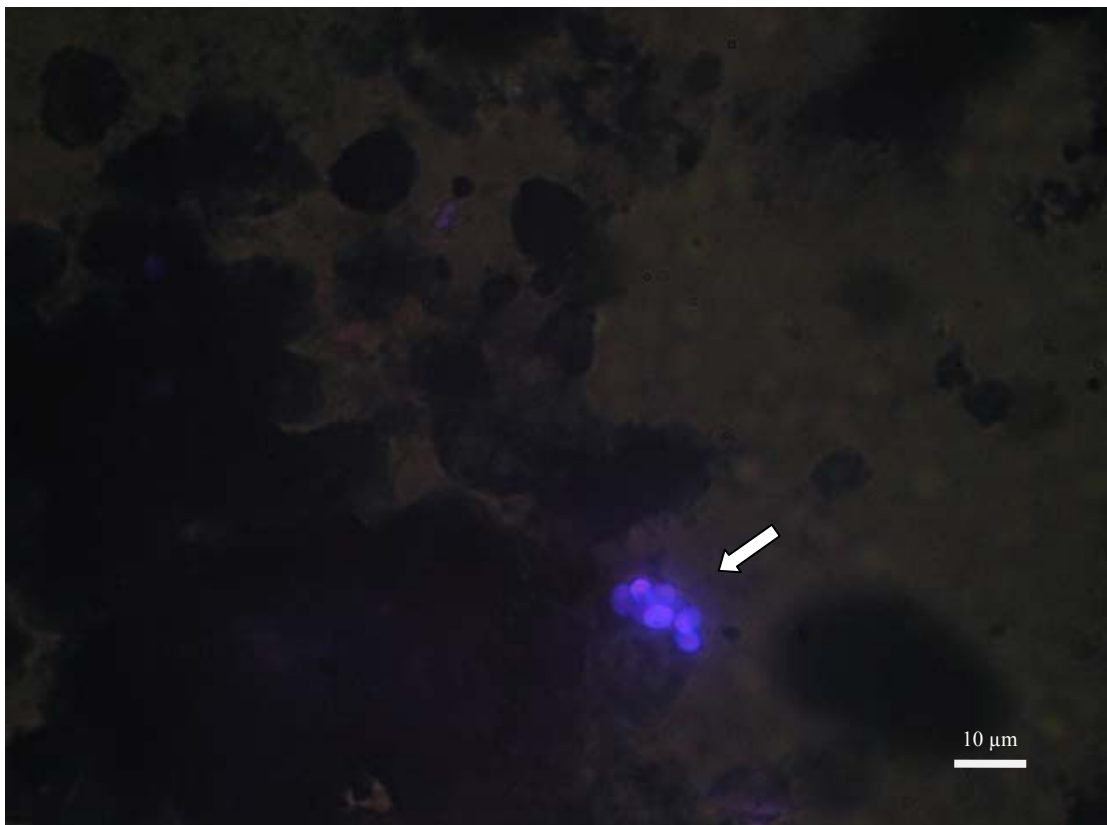
Postup:

1. Rozetření buněčné suspenze na podložní sklíčko, sklíčko ponecháno volně zaschnout
2. Fixace methanolem (2 min), opět ponecháno zaschnout
3. Barvení Calcofluorem (10 min)
4. Opláchnutí v PBS
5. Dobarvení Evansovou modří (30 s)
6. Opláchnutí v PBS a opět ponechání zaschnout

Takto připravená sklička byla prohlížena fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení $1000\times$ s olejovou imerzí při vlnové délce 490 nm.

Calcofluor White M2R (CFW) se specificky váže na polymery hexapyranózy v β -konfiguraci a může být proto využit pro detekci celulózy a chitinu (Maeda and Ishida, 1967). Použití CFW pro fluorescenční značení spor mikrosporidií bylo zavedeno Vávrou a Chalupským již v roce 1982. Myšlenka byla založena na přítomnosti α -chitinu ve vnitřní vrstvě (endospoře) stěny spory (Vávra, 1976). Obarvené spory mikrosporidií svítí jasně modrobíle.

Z počátku vyhodnocování úspěšnosti infekce jsem se mylně domnívala, že infekce buněčných linií byla úspěšná (obr. 3), následně jsem však tuto domněnku přehodnotila jako opakovaný výskyt shluků spor pocházejících z inkula.



Obr. 3 Příklad domnělé pozitivní infekce buněčné linie Vero E6. Vzorek suspenze obarvený Calcofluorem po vizualizaci UV světlem (OLYMPUS IX70) při zvětšení $1000\times$. Shluk spor je označen bílou šipkou.

4. ZÁMĚRY DO BUDOUCNA

Spory *Trachipleistophora hominis* dále uchovávám na parazitologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích a díky vyzkoušení některých postupů, běžně používaných při *in vitro* kultivaci mikrosporidií, jsem připravena s těmito sporami dále pracovat v magisterském stupni studia.

Na základě této rešerše a výsledků předběžných pokusů budu v další práci testovat buněčné linie odvozené od svalových buněk: L6 (kryší svalové buňky) - kultivační medium DMEM s přidavkem 10 % FBS, C2C12 (myší myoblasty) - kultivační medium DMEM s přidavkem 2 mM glutaminu a 10 - 15 % FBS, L6.C10 (kryší skeletární svalové myoblasty) - kultivační medium DMEM s přidavkem 2 mM glutaminu a 10 % FBS a L6.G8 (kryší skeletární svalové myoblasty) - kultivační medium DMEM s přidavkem 2 mM glutaminu a 10 % FBS. Kultivační teplota 37 °C.

Průběh infekce *T. hominis* v různých buněčných liniích bude vyhodnocen růstovými křivkami a dokumentován pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

5. LITERATURA

- Becnel J. J., Andreadis T. G. 1999:** Microsporidia of insects. In *The Microsporidian and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. et Weiss, L. M.) ASM Press, Washington D. C., 447-501
- Blanshard C., Ellis D. S., Tovey D. G., Dowell S., Gazzard B. G. 1992:** Treatment of intestinal microsporidiosis with albendazole in patients with AIDS. *AIDS* **6**, 311-313
- Bornay-Llinares F. J., da Silva A. J., Moura H., Schwarts D. A., Visvesvara G. S., Pieniazek N. J., Cruz-Lopez A., Hernandez-Jaurequi P., Guerrero J., Enrique F. J. 1998:** Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J. Infect. Dis.* **178**, 820-826
- Bosma G. C., Custer R. P., Bosma M. J. 1983:** A severe combined immunodeficiency mutant in the mouse. *Nature* **301**, 527-530
- 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. *Parasitol.* **118**, 447-453
- Cali A., Kotler D. P., Orenstein J. M. 1993:** *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhoea and dissemination in AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 101-112
- Cali A., Takvorian P. M. 1999:** Development morphology and life cycles of microsporidia. In *The Microsporidian and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. et Weiss, L. M.) ASM Press, Washington D. C. 85-128
- Cali A., Takvorian P. M. 2003:** Ultrastructure and development of *Pleistophora ronneafiei* n. sp., a microsporidium (Protista) in the skeletal muscle of an immunocompromised individual. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**, 77-85

- Cali A., Weiss L. M., Takvorian P. M. 2004:** An analysis of the microsporidian genus *Brachiola*, with comparisons of human and insect isolates of *Brachiola algerae*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **51(6)**, 678-685
- Cali, A., Takvorian, P. M., Lewin, S., Rendel, M., Sian, C. S., Wittner, M., Tanowitz H. B., Keohane E., Weiss L. M. 1998:** *Brachiola vesicularum*, n. g., n. sp., a new microsporidium associated with AIDS and myositis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 240-251
- Canning E. U., Hollister W. S. 1987:** Microsporidia of mammals-widespread pathogens or opportunistic curiosities? *Parasitol. today* **3**, 267-273
- Canning E. U., Lom J. 1986:** *The Microsporidia of Vertebrates*. Academic Press, Inc., NY, USA.
- Canning E. U., Vávra J. 2000:** Phylum Microsporidia. In *An Illustrated Guide to the Protozoa*, 2nd ed. (ed. Lee J. J., Leedale G. F., Bradbury P.) 39-126
- Croppo G. P., Visvesvara G. S., Leitch G. J., Wallace S., Schwartz D. A. 1998:** Western blot identification of the microsporidian *Encephalitozoon hellem* using immunoglobulin G monoclonal antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **122**, 182-186
- De Groot M. A., Visvesvara G. S., Wilson M. L., Pieniazek N. J., Slemenda S. B., da Silva A. J., Leitch G. J., Bryan R. T., Reves R. 1995:** Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J. Infect. Dis.* **171**, 375-1378
- Del Aguila C., Croppo G. P., Moura H., da Silva A. J., Leitch G. J., Moss D. M., Wallace S., Slemenda S. B., Pieniazek N. J., Visvesvara G. S. 1998:** Ultrastructure, immunofluorescence, Western blot, and PCR analysis of eight isolates of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* established in culture from sputum, urine samples and duodenal aspirates of five patients with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1201-1208
- Dengjel B., Zahler M., Hermanns W., Heinritzi K., Spillmann T., Thomschke A., Loscher T., Gothe R., Rinder H. 2001:** Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4495-4499

- Deplazes P., Mathis A., Baumgartner R., Tanner I., Weber R. 1996:** Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clin. Infect. Dis.* **22**, 557-559
- 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**, S93-S93
- Deplazes P., Mathis A., van Saanen M., Iten A., Keller R., Tanner I., Glauser M. P., Weber R., Canning E. U. 1998:** Dual microsporidial infection due to *Vittaforma corneae* and *Encephalitozoon hellem* in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 1521-1524
- Desportes I., Le Charpentier Y., Galian A., Bernard F., Cochand-Prioleet B., Lavergne A., Ravisse P., Modigliany R. 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
- Didier E. S., Didier P. J., Friedberg D. N., Stenson S. M., Orenstein J. M., Yee R. W., Tio F. O., Davis R. M., Vossbrinck C., Millichamp N., Shadduck J. A. 1991:** Isolation and characterization of a new human microsporidia, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.* **163**, 617-621
- Didier E. S., Rogers L. B., Brush A. D., Wong S., Traina-Dorge V., Bertucci D. 1996:** Diagnosis of disseminated microsporidian *Encephalitozoon hellem* infection by PCR-Southern analysis and successful treatment with albendazole and fumagillin. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 947-952
- Didier E. S., Rogers L. B., Orenstein J. M., Baker M. D., Vossbrinck C. R., van Gool T., Hartskeerl R., Soave R., Beaudet L. M. 1996:** Characterization of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**, 34-43
- Didier E. S., Snowden K. A., Shadduck J. A. 1998:** The biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv. Parasitol.* **40**, 279-316

- Didier E. S., Visvesvara G. S., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., De Groote M. A., Vossbrinck C. R. 1996:** A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to the *Encephalitozoon cuniculi* strain III originally isolated from domestic dogs. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2835-2837
- Didier E. S., Vossbrinck C. R., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., Shadduck J. A. 1995:** Identification and characterisation of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitol.* **111**, 411-422
- Doultree J. V., Maerz A. L., Ryan N. J., Baird R. W., Wright E., Crowe S. M., Marshall J. A. 1995:** *In vitro* growth of the microsporidian *Septata intestinalis* from an AIDS patient with disseminated illness. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 463-470
- Field A. S., Marriott D. J., Milliken S. T., Brew B. J., Canning E. U., Kench J. G., Darveniza P., Harkness J. L. 1996:** Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachiplestiphora hominis*, in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2803-2811
- Fournier S., Liguory O., Garrait V., Gangneux J. P., Sarfati C., Derouin F., Molina J. M. 1998:** Microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* infection as a possible cause of traveller's diarrhea. *Eur. J. Clin. L. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 743-744
- Fournier S., Liguory O., Sarfati C., David-Ouaknine F., Derouin F., Decazes J. M., Molina J. M. 2000:** Disseminated infection due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: case report and review. *HIV Med.* **1**, 155-161
- Franzen C. 2005:** How do microsporidia invade cells? *Fol. Parasitol.* **52**, 36-40
- Franzen C., Müller A. 2001:** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect.* **3**, 389-400
- Gannon J. 1980:** The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab. Anim.* **14**, 189-192
- Garcia L. S. 2002:** Laboratory identification of the Microsporidia. *J. Clinical. Microbiol.* **40**, 1892-1901

- Gatti S., Sacchi L., Novati S., Corona S., Bernuzzi A. M., Moura H., Pieniazek N. J., Visvesvara G. S., Scaglia M. 1997:** Extraintestinal microsporidiosis in AIDS patients: clinical features and advanced protocols for diagnosis and characterization of the isolates. *J. Eukaryot. Microbiol.* **44**, 79
- Green L. C., Didier P. J., Bowers L. C., Didier E. S. 2004:** Natural and experimental infection of immunocompromised rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* genotype D. *Microb. Infect.* 996-1002
- Haro M., del Águila C., Fenoy S., Henriques-Gil N. 2003:** Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4166-4171
- Hartskeerl R. A., van Gool T., Schuitema A. R., Didier E. S., Terpstra W. J. 1995:** Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitol.* **110**, 227-285
- Heřmánek J., Koudela B., Kučerová Z., Ditrich O., Trávníček J. 1993:** Prophylactic and therapeutic imine reconstitution of SCID mice infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Fol. Parasitol.* **40**, 287-291
- Hollister W. S., Canning E. U., Colbourn N. I., Aarons E. J. 1995:** *Encephalitozoon cuniculi* isolated from the urine of an AIDS patient, which differs from canine and murine isolates. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**, 367-372
- Hollister W. S., Canning E. U., Colbourn N. I., Curry A., Lacey C. J. N. 1993:** Characterization of *Encephalitozoon hellem* (Microspora) isolated from the nasal mucosa of a patient with AIDS. *Parasitol.* **107**, 351-358
- 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. *Parasitol.* **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 serological tests. *Parasitol.* **102**, 33-43
- Childs-Sanford S. E., Garner M. M., Raymond J. T., Didier E. S., Kollias G. V. 2006:** Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* in an egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*). *J. Comp. Pathol.* **134**, 370-373
- Jaronski S. T. 1984:** Microsporidia in cell culture. *Adv. Cell Cult.* **18**, 183-229
- Juarez S. I., Ichinose A., Jongwutiwes S., Yanagi T., Kanbara H. 2003:** A species of microsporidium isolated from an HIV-infected patient and identified as *Trachipleistophora anthropophthera* by transmission electron microscopy. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**, 576
- Juarez S. I., Putaporntip C., Jongwutiwes S., Ichinose A., Yanagi T., Kanbara H. 2005:** *In vitro* cultivation and elektron microscopy characterization of *Trachipleistophora anthropophthera* isolated from the cornea of an AIDS patient. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52(3)**, 179-190
- Keeling P. J. 2003:** Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies from a zygomycete origin of microsporidia. *Fung. Gen. Biol.* **38**, 298-309
- Keeling P. J., Fast N. M. 2002:** Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Ann. 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
- Keeling P. J., McFadden G. I. 1998:** Origins of Microsporidia. *T. Microbiol* **6**, 19-23
- Keohane E. M., Weiss L. M. 1998:** Characterisation and function of the microsporidian polar tube. *Fol. Parasitol.* **45**, 117-127
- Keohane E. M., Weiss L. M. 1999:** The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In *The Microsporidian and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. et Weiss, L. M.) ASM Press, Washington D. C. 196-224

- Kondova I., Mansfield K., 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. P., Orenstein J. M. 1999:** Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In *The Microsporidian and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. et Weiss, L. M.) ASM Press, Washington D. C., 258-292
- Koudela B., Vávra J., Canning E. U. 2004:** Experimental infection of severe combined immunodeficient (SCID) mice with human microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Parasitol.* **128**, 337-384
- Koudela B., Vítovec J., Kučerová Z., Ditrich O., Trávníček J. 1993:** The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Fol. Parasitol.* **40**, 279-286
- Lafranchi-Tristem N. J., Curry A., Cheney S. A., Canning E. U. 2001:** Growth of *Trachipleistophora hominis* (Microsporidia: Pleistophoridae) in C₂, C₁₂ mouse myoblast cells and response to treatment with albendazole. *Fol. Parasitol.* **48**, 192-200
- Leelayoova S., Subrungruang I., Rangsin R., Chavalitshewinkoon-Petmitr P., Worapong J., Naaglor T., Mungthin M. 2005:** Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* genotype a in a Thai orphanage. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**, 104-107
- Levaditi C., Nicolau S., Shoen R. 1923:** L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *C. R. Soc. Biol. Paris.* **89**, 984-986
- Lores B., del Aguila C., Arias C. 2002:** *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz* **97**, 941-945
- Lores B., Lopez-Miragaya I., Arias C., Fenoy S., Torres J., del Aguila C. 2002:** Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 918-921

- Lowman P. M., Takvorian P. M., Cali A. 2000:** The effects of elevated temperatures and various time-temperature combinations on the development of *Brachiola (Nosema) algerae* n. comb. in mammalian cell culture. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**, 227-234
- Maeda H., Ishida N. 1967:** Specificity of binding of hexapyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J. Biochem.* **62**, 276-278
- Mathis A., Breitenmoser A. C., Deplazes P. 1999:** Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. *Parasite* **6**, 189-193
- Mathis A., Michel M., Kuster H., Muller C., Weber R., Deplazes P. 1997:** Two *Encephalitozoon cuniculi* subtypes of human origin are infectious to rabbits. *Parasitol.* **114**, 29-35
- Matsubayashi H., Koike T., Mikata I., Takei H., Hagiwara S. 1959:** A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Arch. Pathol.* **67**, 181-187
- Molina J. M., Oksenhendler E., Beauvais B., Sarfati C., Jaccard A., Derouin F., Modai J. 1995:** Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in a patient with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *J. Infect. Dis.* **171**, 245-249
- Moura H. Schwartz, D. A., Bornay-Linares F., Sodré F. C., Wallace S., Visvesvara G. S. 1997:** A new and improved “quick-hot Gram-chromotrope” technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **121**, 888-893
- Moura H., da Silva A. J., Moura I. N. S., Schwartz D. A., Leitch G., Wallace S., Pieniazek N. J., Wirtz R. A., Visvesvara G. S. 1999:** Characterization of *Nosema algerae* isolates after continuous cultivation in mammalian cells at 37 °C. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**, 14-16
- Oborná R. 1999:** Mikrosporidióza působená druhem *Encephalitozoon intestinalis* na modelu imunodeficientní SCID myši. Magisterská diplomová práce. Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice

- Peyretilade E., Broussolle V., Peyret P., Méténier G., Gouy M., Vivarès C. P. 1998:** Microsporidia, amitochondrial protist, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 683-689
- Reetz J., Rinder H., Thomschke A., Manke H., Schwebs M., Bruderek A. 2002:** First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Internat J. Parasitol.* **32**, 785-787
- 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
- Rinder H., Thomschke A., Essig A., Heinritzi K., Gothe R., Zahler M. 1999:** Microsporidia in pigs with life-threatening diarrhoea *Tierarzt. Prax. Aus. Grossier. Nutzt.* **2**, 231-234
- Sandfort J., Hannemann A., Gelderblom H., Stark K., Owen R. L. 1994:** *Enterocytozoon bieneusi* infection in an immunocompetent patient who was not infected with the human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 514-516
- Scaglia M., Gatti S., Sacchi L., Corona S., Chichino S., Bernuzzi A. M., Barbarini G., Croppo G. P., Da Silva A. J., Pieniazek N. J., Visvesvara G. S. 1998:** Asymptomatic respiratory tract microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* in three patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 174-176
- Scaglia M., Sacchi L., Croppo G. P., da Silva A., Gatti S., Corona S., Orani A., Bernuzzi A. M., Pieniazek N. J., Slemenda S. B., Wallace S., Visvesvara G. S. 1997:** Pulmonary microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* in a patient with AIDS. *J. Infect.* **34**, 119-126
- Scaglia M., Sacchi L., Gatti S., Bernuzzi A. M., Polver P. D. P., Piacentini I., Concia E., Croppo G. P., Da Silva A. J., Pieniazek N. J., Slemenda S. B., Wallace S., Leitch G. J., Visvesvara G. S. 1994:** Isolation and identification of *Encephalitozoon hellem* from an Italian AIDS patient with disseminated microsporidiosis. *APMIS* **102**, 817-827

- Shadduck J. A. 1969:** *Nosema cuniculi*: *in vitro* isolation. *Science* **166**, 516-517
- Shadduck J. A., Bendele R., Robinson G. R. 1978:** Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Vet. Pathol.* **15**, 449-460
- Shadduck J. A., Meccoli R. A., Davis R., Font R. L. 1990:** Isolation of a microsporidian from a human patient. *J. Infect. Dis.* **162**, 773-776
- Shaw R. W., Kent M. L. 1999:** Fish Microsporidia. In *The Microsporidian and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. et Weiss, L. M.) ASM Press, Washington D. C. 418-446
- Schwartz D. A., Visvesvara G. S., Leitch G. J., Tashijan L., Pollack M., Holden J., Bryan R. T. 1993:** Pathology of symptomatic microsporidial (*Encephalitozoon hellem*) bronchiolitis in the acquired-immunodeficiency-syndrome-a new respiratory pathogen diagnosed from lung biopsy, bronchoalveolar lavage, sputum, and tissue culture. *Human Pathol.* **24**, 937-943
- Silveria H., Canning E. U. 1995a:** *Vittaforma corneae* n. comb. For the human microsporidium *Nosema corneum* Shadduck, Meccoli, Davis and Font, 1990, based on its ultrastructure in the liver of experimentally infected athymic mice. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**, 158-165
- Silveira H., Canning E. U. 1995b:** In vitro cultivation of the human microsporidium *Vittaforma corneae*: development and effect of albendazole. *Fol. Parasitol.* **42**, 241-250
- Sprague V., Becnel J. J., Hzard E. I. 1992:** Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 285-395
- Sulaiman I. M., Fayer R., Lal A. A., Trout J. M., Schaefer F. W., Xiao L. H. 2003:** Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4495-4501

- Sulaiman I. M., Fayer R., Yang C. F., Santin M., Matos O., Xiao L. H. 2004:** Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitol. Res.* **92**, 328-334
- Undeen A. H. 1975:** Growth of *Nosema algerae* in pig kidney cell cultures. *J. Protozool.* **22**, 107-110
- van Gool T., Canning E. U. Gilis H., van den Bergh Weerman M. A., Eeftinck Schattenkerk J. K. M., Dankert J. 1994:** *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology* **109**, 281-289
- van Gool T., Vetter J. C. M., Weinmayr B., Van Dam A., Derouin F., Dankert J. 1997:** High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *J. Infect. Dis.* **175**, 1020-1024
- Vávra J. 1976:** The structure of microsporidia. In *Comparative Pathobiology*. Vol. 1. *Biology of the microsporidia*. (ed. Bulla L. A., Cheng, T. C.) Plenum Press, N. Y., London, 1-86
- Vávra J. 2005:** Polar vesicles of microsporidia are mitochondrial remnants (“mitosomes“)? *Fol. Parasitol.* **52**, 193-195
- Vávra J., Horák A., Modrý D., Lukeš J., Koudela B. 2006:** *Trachipleistophora extenrec* n. sp. a new microsporidian (Fungi: Microsporidia) infecting mammals. *J. Eukaryot. Microbiol.* **53**, 464-476
- Vávra J., Larsson J. I. R. 1999:** Structure of the microsporidia. In *The Microsporidian and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. et Weiss, L. M.) ASM Press, Washington D. C. 7-84
- Vávra J., Undeen A. H. 1970:** *Nosema algerae* n. sp. (Cnidospora, Microsporidia) a pathogen in laboratory colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). *J. Protozool.* **17**, 240-249
- Vávra J., Yachnis A. T., Shadduck J. A., Orenstein J. M. 1998:** Microsporidia of the genus *Trachipleistophora*-causative agents of human microsporidiosis: Description

of *Trachipleistophora anthropophthera* n. sp. (Protozoa : Microsporidia) *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 273-283

Visvesvara G. S. 2002: *In Vitro* cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clin. Microb. Rev.* **15**, 401-413

Visvesvara G. S., da Silva A. J., Croppo G. P., Pieniazek N. J., Leitch G. J., Ferguson D., de Moura H., Wallace S., Slemenda S. B., Tyrrel I., Moore D. F., Meador J. 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., Slemenda S. B., Schwartz D. A., Moss D., Bryan R. T., Pieniazek N. J. 1994: Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2760-2768

Visvesvara G. S., Leitch G. J., Gorelkin L., Wilcox M. C., Weber R., Bryan R. T. 1995: Short term *in vitro* culture of *Enterocytozoon bieneusi* from four different patients with AIDS. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**, 506-510

Visvesvara G. S., Leitch G. J., Moura H., Wallace S., Weber R., Bryan R. T. 1991: Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a microsporidian isolated from the urine of a patient with AIDS. *J. Protozool.* **38**, 105S-111S

Visvesvara G. S., Leitch G. J., Wallace S., Seaba C., Erdman D., Ewing E. P. 1996: Adenovirus masquerading as microsporidia. *J. Parasitol.* **82**, 316-319

Visvesvara G. S., Moura H., Leitch G. J., Schwartz D. A. 1999: Culture and propagation of microsporidia. In *The Microsporidian and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. et Weiss, L. M.) ASM Press, Washington D. C. 363-392

Weber R., Bryan R. T., Owen R. L., Mel Wilcox C., 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., Schwartz D. A., Owen R. L. 1994:** Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 426-461
- Weber R., Deplazes P., Flepp M., Mathis A., Baumann R., Sauer B., Kuster H., Luthy R. 1997:** Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **336**, 474-478
- Weber R., Kuster H., Visvesvara G. S., Bryant R. T., Schwartz D. A., Luthy R. 1993:** Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* - pulmonary colonization, microhematuria, and mild conjunctivitis in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 415-419
- Weber R., Schwartz D. A., Deplazes P. 1999:** Laboratory diagnosis of microsporidiosis. In *The Microsporidian and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. et Weiss, L. M.) ASM Press, Washington D. C., 315-362
- Weidner E. 1975:** Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages. Parazitophorous vacuole growth and the absence of lysosomal fusion. *Z. Parasitenkd.* **47**, 1-9
- Weiss L. M., Vossbrinck C. R. 1998:** Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. *Adv. Parasitol.* **40**, 351-395
- Williams B. A. P., Hirt R. P., Lucocq J. M., Embley T. M. 2002:** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature.* **418**, 865-869
- Wittner M. 1999:** Historic perspectives on the microsporidia: expanding horizons. In *The Microsporidian and Microsporidiosis* (ed. Wittner, M. et Weiss, L. M.) ASM Press, Washington D. C. 1-6
- Wright J. H., Craighead E. M. 1922:** Infectious motor paralysis in young rabbits. *J. Exp. Microbiol.*, Washington DC, 1-6
- Xiao L., Li L., Moura H., Sulaiman I., Lal A. A., Gatti S., Scaglia M., Didier E. S., Visvesvara G. S. 2001:** Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2191-2196

Yachnis A. T., Berg J., MartinezSalazar A., Bender B. S., Diaz L., Rojiani A. M., Eskin T. A., Orenstein J. M. 1996: Disseminated microsporidiosis especially infecting the brain, heart, and kidneys - Report of a newly recognized pansporoblastic species in two symptomatic AIDS patients. *Am. J. Clin. Pathol.* **106**, 535-543

Zhang H., Huang H., Cali A., Takvorian P. M., Feng X., Zhou G., Weiss L. M. 2005: Investigations into microsporidian methionine aminopeptidase type 2: a therapeutic target for microsporidiosis. *Fol. Parasitol.* **52**, 182-192