

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

## **Mikrosporidiové infekce lidí**

Vypracovala: Markéta Pelikánová

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

České Budějovice, 2009

**Pelikánová M., 2009:** Mikrosporidiové infekce lidí. [Human microsporidial infection]. 34 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

**Annotation:**

The most common microsporidial species infecting humans are *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. The prevalence of microsporidial infections among human populations was screened. Microsporidia from stool samples were detected using microscopy and molecular methods. Four genotypes of *Encephalitozoon* spp. (*E. cuniculi* type I and type II, *E. hellem* 1A and *E. intestinalis*), four genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* (EbpA, BEB4, BFRmr2, Isolate 5) and three new genotypes of *E. bieneusi* (*E.b.NEW1–E.b.NEW3*) with the total prevalence of 44.8 %.

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

Markéta Pelikánová

.....

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli za odborné vedení a pomoc, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Velký dík patří také celému kolektivu laboratoře veterinární a lékařské protistologie za cenné rady a odbornou pomoc. Mnohokrát také děkuji externímu studentovi Danielu Bradymu za pomoc se zpracováním vzorků. Všem děkuji za trpělivost a podporu.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	MIKROSPORIDIE .....	1
1.1.1	<i>Taxonomie</i> .....	1
1.1.2	<i>Fylogeneze</i> .....	1
1.1.3	<i>Struktura</i> .....	2
1.1.4	<i>Životní cyklus</i> .....	2
1.2	MIKROSPORIDIE U LIDÍ.....	3
1.2.1	<i>Druhy lidských mikrosporidií</i> .....	3
1.2.2	<i>Přenos a zdroje mikrosporidiové infekce</i> .....	7
1.2.3	<i>Onemocnění a léčba mikrosporidióz</i> .....	8
1.3	ZOONOTICKÝ POTENCIÁL MIKROSPORIDIÍ .....	9
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL</b> .....	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>METODY</b> .....	<b>13</b>
4.1	BARVENÍ SPŮR POMOCÍ CALCOFLUORU WHITE M2R (VÁVRA AND CHALUPSKÝ 1982).....	13
4.2	EXTRAKCE DNA ZE VZORKŮ STOLICE .....	14
4.3	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	14
4.4	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA .....	16
4.5	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO SEKVENCI .....	16
4.6	SEKVENACE A FYLOGENETICKÁ ANALÝZA VÝSLEDKŮ .....	16
4.7	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ .....	17
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>18</b>
5.1	VYHODNOCENÍ VZORKŮ POMOCÍ CALCOFLUORU WHITE M2R .....	18
5.2	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ METODOU PCR.....	19
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚRY</b> .....	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>27</b>

# 1 Úvod

## 1.1 Mikrosporidie

### 1.1.1 Taxonomie

Mikrosporidie jsou eukaryotní obligátní intracelulární paraziti. První mikrosporidie (*Nosema bombycis*) byla identifikována u housenky bource morušového v roce 1857 a byla zařazena do kmene Schyzomyceta (Nägeli 1857). Roku 1976 biolog Sprague ustanovil nový kmen Mikrospora, který byl uveden jako podříše Protozoa uvnitř říše Protista. Kmen Mikrospora byl následně přejmenován na kmen Mikrosporidia, podle původního názvu zaznamenaném Balbianim roku 1882. Mikrosporidie jsou původci pébriny u bource morušového, onemocnění včel, ryb a lidí s oslabeným imunitním systémem (Nägeli 1857; Wittner 1999). Dodnes bylo rozpoznáno na 1200 druhů v 150 rodech vyskytujících se u bezobratlých i obratlovců, včetně člověka (Wittner 1999).

### 1.1.2 Fylogeneze

Po popsání genu malé podjednotky rRNA u mikrosporidie *Variamorpha necatrix* bylo navrženo, že mikrosporidie jsou příbuznější prokaryotickým organismům více než eukaryotickým. Nepřítomnost pravého Golgiho aparátu a mitochondrií tuto teorii potvrzovala. Studium genové sekvence pro  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulin, podjednotky RNA polymerázy II, vazebného proteinu TATA-box, translačních elongačních faktorů EF-1 $\alpha$  a EF-2, glutamylové syntézy tRNA a mitochondriového HSP70 byl potvrzen bližší vztah mezi mikrosporidii a houbami (Keeling et Fast 2002). Toto tvrzení podporují i výsledky molekulární sekvenace genomu *Encephalitozoon cuniculi*. Mikrosporidie neobsahují mitochondrie, avšak gen mitochondrií HSP70 byl nalezen a tudíž je předpokládána sekundární ztráta mitochondrií (Keeling et al. 2000; Vivarés et al. 2002).

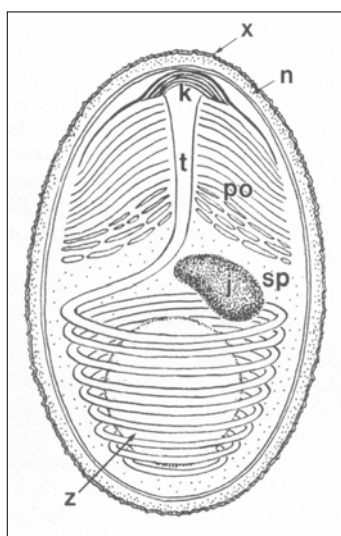
Podle posledních poznatků jsou mikrosporidie řazeny k houbám, přičemž se vyvinuly z hub po divergenci kmene Chytridiomycetes. Řazení do systému je však stále nejasné.

Kmen Mikrosporidia se dělí na dvě třídy Haplophasea (rody *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*) a Diplophasea (rody *Brachiola*, *Nosema*, *Vittaforma*) podle počtu utvořených jader. Haplophasea obsahují jedno jádro a Diplophasea mají v průběhu vývojového cyklu jádra dvě, tzv. diplokaryon (Sprague et al. 1992).

### 1.1.3 Struktura

Infekční stádium mikrosporidií je spóra (Obr.1). Má tvar oválný, hruškovitý i kulovitý a je poměrně odolná vůči podmínkám vnějšího prostředí. Stěna spóry je třívrstevná. Skládá se z vnější elektrodenzní exospory z glykoproteinů, elektronlucentní endospory z chitinu a vnitřní plazmatické membrány. Dominantní součástí spóry je vystřelovací aparát se spirálně svinutou pólovou trubicí složenou z několika bílkovinných vrstev, která je v anteriorní části spóry ukotvená kotevním diskem. Spóra obsahuje zárodečnou buňku - sporoplasma s jedním (monokaryon) nebo dvěma jádry (diplokaryon), volnými ribozomy, hrubým endoplazmatickým retikulem, váčky podobnými Golgimu aparátu (polaroplast) a vakuolou, která se nachází v posteriorní části spóry. Mikrosporidie nemají peroxisomy ani mitochondrie. Spóry mají běžně velikost 1 – 3  $\mu\text{m}$  na 1,5 – 4  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 1: Schéma spóry mikrosporidií (podle Lom et Dyková 1992)**



- j – jádro
- k – kotevní disk
- n – endospora
- po – polaroplast
- sp – sporoplasma
- t – pólová trubice
- x – exospora
- z – zadní vakuola

### 1.1.4 Životní cyklus

Mikrosporidiové infekce savců většinou vznikají inhalací spór nebo příjmem potravy obsahující spóry, např. nedostatečně tepelně upraveného masa. U šelem (lišek, psů) a občas u primátů, hlodavců, koňů a králíků byl zjištěn přenos vertikální (transplacentární) (Snowden et al. 1998; Didier et al. 1998a, 2000). Vzácně se může infekce přenášet přímým kontaktem, např. přes poranění (Canning et Lom 1986).

Nejčastěji mikrosporidie infikují epiteliální buňky vystylající gastrointestinální a dýchací trakt. Ve vhodných podmínkách po pozření či inhalaci hostitelem začne spóra bobtnat a zvýší se její vnitřní tlak. Na zvýšení osmotického tlaku uvnitř spóry se podílí rozklad molekul discharidu trehalózy na monomery glukózy (Undeen et Meer 1998). Stoupající množství rozpuštěných molekul uvnitř spóry má za následek větší příjem vody. V důsledku toho bobtná zadní vakuola a polaroplast. Vysoký tlak zapříčiní prolomení kotevního disku a obrácení pólové trubice naruby, která vystřelí ze spóry a kanálkem v pólové trubici je hostitelská buňka injikována sporoplazmou. Sporoplazma je jednoduchá buňka bez obvyklých buněčných komponent. Po 15 – 20 minutách se v sporoplazmě začíná utvářet endoplazmatické retikulum, sporoplazma se mění v meront a probíhá diferenciací organel (Vávra 1976). Poté meront projde několika rozmnožovacími cykly zahrnujících merogonii či schizogonii. Merogonie je nepohlavní rozmnožování a probíhá při ní mnohonásobné dělení buněk. Meront podstupuje jaderné dělení, které je běžně intranukleární mitóza. Zcela výjimečně bylo pozorováno meiotické dělení. Meront prochází sporogonií, utvářejí se tak sporoblasty a ty dále dozrávají ve spóry. U rodu *Encephalitozoon* probíhá vývoj v tzv. parazitoformní vakuole, která je od hostitelské cytoplazmy oddělena membránou. V hostitelské buňce se může vyskytovat i více parazitoformních vakuol, ty se postupným dozráváním a množením spór zvětšují a vyvíjejí tlak na membránu hostitelské buňky, která následně praská. Oproti tomu u mikrosporidie *Enterocytozoon bieneusi* probíhá vývoj přímo v cytoplazmě hostitelské buňky, zde dochází v brzkých stádiích k jadernému dělení a vytvářejí se multinukleární merogoniální plasmodia, v nichž se formují jednotlivé spóry. Spóry jsou běžně vylučovány se stolicí. Infekce se většinou vyskytuje v tenkém střevě a žlučových cestách a pokud tu zůstane až do smrti hostitele, poté se spóry vyloučí s postupným rozkladem tkání.

## 1.2 Mikrosporidie u lidí

### 1.2.1 Druhy lidských mikrosporidií

#### 1.2.1.1 *Enterocytozoon bieneusi*

Čleď Enterocytozoonidae obsahuje dva rody, rod *Nucleospora* a rod *Enterocytozoon*. Do rodu *Nucleospora* řadíme jednak druh *Nucleospora salmonis*, vnitrojadernou mikrosporidii lososovitých ryb, a jednak druh *Nucleospora secunda*, mikrosporidii infikující teplovodní

afričké ryby. Rod *Enterocytozoon* zahrnuje jediný druh *Enterocytozoon bieneusi*. *Enterocytozoon bieneusi* je nejčastějším původcem lidských mikrosporidiových infekcí u lidí, způsobuje 30 – 50 % chronických průjmů (Shadduck et Orenstein 1993). Poprvé byl objeven roku 1985 u HIV pacienta s chronickým průjmem pomocí elektronové mikroskopie (Desportes et al. 1985). Po propuknutí epidemie AIDS se výzkum tohoto druhu velice rozrostl (Ambroise-Thomas 2000). Infekce postihuje osoby imunodeficitní i imunokompetentní, hlavně starší lidi, děti, cestovatele a pacienty po transplantaci. Nejčastěji *E. bieneusi* infikuje střevo hostitele, především enterocyty duodena a jejunu. Tato mikrosporidie napadá také buňky epitelu žlučových cest a dýchacích cest a vzácněji i další tkáně. Často se vyskytují systémové infekce. Spóry tohoto druhu byly nalezeny nejen u lidí ale také u prasat, hovězího dobytka, lam, koz, králíků, koček, psů, primátů i u šelem. Na základě rozdílů v ITS (internal transcribed spacers) sekvencích rRNA bylo dosud popsáno 81 genotypů, z nichž 26 bylo popsáno striktně u lidí a 8 bylo popsáno jak u lidí tak zvířat (Tab. 1) (Santín et Fayer 2009). Odlišnosti v jednotlivých kmenech tohoto druhu způsobuje polymorfismus, jenž je vysvětlen nekódujícími částmi genomu, jako ITS sekvence rRNA genu.



**Tab. 1: Genotypy *Enterocytozoon bieneusi* detekované pomocí ITS (podle Santín et Fayer 2009)**

hostitel	genotyp	číslo sekvence v GenBank	synonymum (číslo sekvence v GenBank)
lidé	genotyp A	AF101197	Peru1 (AY371276)
	genotyp B	AF101198	Type I (AF242475)
	genotyp C	AF101199	Type II (AF242476)
	genotyp Q	AF267147	-
	genotyp R	AY945808	-
	genotyp S	AY945809	-
	genotyp T	AY945810	-
	genotyp U	AY945811	-
	genotyp V	AY945812	-
	genotyp W	AY945813	-
	Type III	AF242477	-
	Type V	AF242479	-
	Peru3	AY371278	-
	Peru7	AY371282	-
	Peru8	AY371283	-
	Peru11	AY371286	Peru12 (EF014428)
	Peru13	EF014429	-
	Peru15	EF014431	-
	CAF1	DQ683746	-
	CAF2	DQ683747	-
	CAF3	DQ683748	-
CAF4	DQ683749	-	
HAN1	EF458627	-	
NIA1	EF458628	-	
UG2145	AF502396	-	
genotyp 17	EU140500	-	
člověk, bobr, liška, mýval, ondatra	WL15	AY237223	WL16 (AY237224) Peru14 (EF014430)
člověk, bobr, skot, pes, jestřáb, liška, makak, ondatra, prase, mýval	genotyp D	AF101200	PigITS9 (AF348477) WL8 (AY237216) Peru9 (AY371284) PtEb VI (DQ885582) CEbC (EF139197)
člověk, ptáci, skot, pes	Peru6	AY371281	PtEbl (DQ425107) PtEbVII (DQ885583)
člověk, bobr, liška, ondatra, vydra, prase, mýval	EbpC	AF076042	E (AF135832) WL13 (AY237221) WL17 (AY237225) Peru4 (AY371279)
člověk, kočka	Peru10	AY371285	-
člověk, morče	Peru16	EF014427	-
člověk, kočka, pes, liška	WL11	AY237219	Peru5 (AY371280)
člověk, kočka, pes, skot	Type IV	AF242478	K (AF267141) Peru2 (AY371277) PtEb III (DQ885579) BEB5 (AY331009) BEB5-var (AY331010)

### **1.2.1.2 *Encephalitozoon spp.***

Do rodu *Encephalitozoon* spadají čtyři morfologicky neodlišitelné druhy mikrosporidií, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* a *E. lacerate*.

### **1.2.1.3 *Encephalitozoon intestinalis***

Prvně byl identifikován u AIDS pacienta a chronickým průjmem (Blanshard et al. 1992). Původní název *Septata intestinalis* byl odvozen od přepážky mezi vývojovými stádii a sporami v parazitoformní vakuole (Cali et al. 1993). Později byl reklasifikován Hartskeerlem (1995) do rodu *Encephalitozoon*. Je druhou nejčastější příčinou lidských mikrosporidiových infekcí (Mathis et al. 2005). Spóry mají velikost  $2 \times 1,2 \mu\text{m}$  a pólóvá trubice tvoří 4 až 7 závitů. *Encephalitozoon intestinalis* infikuje především enterocyty, makrofágy *lamina propria*, fibroblasty a buňky endotelu *lamina propria*, ale i colon a hepatobiliární trakt a může diseminovat do různých orgánů zahrnujících mozek, játra, ledviny, slezinu a rektum (Kotler et Orenstein 1999). Po těle se rozšiřuje hematogenní cestou prostřednictvím makrofágů, ve kterých jsou mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* schopny přežít a množit se (Oborná 1999). *Encephalitozoon intestinalis* byl nalezen i u domácích zvířat a městských holubů (Jeong et al. 2007) a předpokládá se že může být přenášen antropozoonoticky (Graczyk et al. 2002).

Na rozdíl od ostatních druhů rodu *Encephalitozoon*, pro které byly identifikovány různé genotypy s rozdílnou biologií a epidemiologií, se *E. intestinalis* jeví jako velmi homogenní druh a nebyly pozorovány žádné rozdíly v ITS sekvencích různých izolátů (Didier et al. 1996b, Liguory et al. 2000).

### **1.2.1.4 *Encephalitozoon hellem***

Tato mikrosporidie byla nalezena u pacientů z několika zemí, nejvíce z USA, Švýcarska, Itálie, Německa a z africké Tanzánie. *Encephalitozoon hellem* je třetí nejčastější mikrosporidie způsobující lidské infekce. Byl izolován z rohovkové tkáně a ze stěrů spojivky tří AIDS pacientů trpící keratokonjunktivitidou (Didier et al. 1991). Spóry byly také izolovány ze slin, nasálního sekretu a moči HIV pacientů (Orenstein et al. 1990; Weber et al. 1993). Nikdy nebyly provedeny epidemiologické studie, ale bylo zjištěno, že tento druh způsobuje hlavně oční infekce, infekce horních a dolních cest dýchacích a urogenitálního traktu. Může dojít i k orální či oční autoinokulaci (Schwartz et al. 1993). *Encephalitozoon hellem* neinfikuje pouze lidi, ale za jeho primární hostitele jsou

považováni ptáci, především papoušci, ale též pštrosi a kolibříci. U zvířecích hostitelů tato mikrosporidie působí těžké ledvinové a střevní infekce. Obecně se předpokládá, že je možný přenos infekce mezi ptačími hostiteli a lidmi, avšak toto nebylo nikdy plně prokázáno.

Vnitrodruhová genotypová variabilita *E. hellem* je založena na sekvenci ITS rRNA genů, dvou intergenických spacerů (IGS-TH a IGS-HZ) a v genu pro PTP (polar tube protein). Všech pět popsaných genotypů bylo identifikováno v lidských vzorcích. U ptáků byl dosud popsán výskyt genotypů 1 a 3 (Suter et al. 1998, Snowden et al. 2000, Haro et al. 2005, Kašičková et al. 2007).

#### **1.2.1.5 *Encephalitozoon cuniculi***

Tento druh byl poprvé u lidí rozpoznán roku 1959. Byla to vůbec první odhalená mikrosporidiová infekce. Spóry byly identifikovány v mozkomíšního moku japonského chlapce pracujícího na zvířecí farmě (Matsubayashi et al. 1959). Pojmenován byl již v roce 1923 (Levaditi et al. 1923). *Encephalitozoon cuniculi* se vyskytuje u pacientů, kteří prodělali tropickou nemoc nebo navštívili tropické země, dále pacienty s onemocněním ledvin, psychickými poruchami či neurologickými problémy. *Encephalitozoon cuniculi* infikuje také další savce – hlodavce, zajíce, šelmy, přežvýkavce a primáty (Canning et Hollister 1987; Didier et al. 1998b). Byly zaznamenány přenosy infekce ze zvířat, narozdíl od přenosu infekce mezi pacienty. Na základě molekulárních a imunologických metod rozeznáváme tři genotypy: genotyp I byl nalezen u králíků a lidí, genotyp II u myší a polárních lišek a genotyp III u psů a lidí (Didier et al. 1995).

#### **1.2.1.6 *Další druhy mikrosporidií vyskytující se u lidí***

*Vittaforma corneae*, *Pleistophora ronneafiei*, *Trachipleistophora* spp., *Brachiola* spp., *Trachipleistophora hominis*, *Brachiola algerae*, *Nosema ocularum*, *Microsporidium ceylonensis*, *Microsporidium africanum*.

### **1.2.2 Přenos a zdroje mikrosporidiové infekce**

Mikrosporidiové infekce se mohou přenášet několika způsoby. Rozlišujeme přenos vertikální a horizontální. Vertikálním přenosem se rozumí přenos infekce z matky na potomka. Tento způsob byl popsán u hlodavců, králíků, šelem a primátů (Snowden et al.

1998; Snowden et Shadduck 1999; Didier et al. 1998). U lidí nebyl dosud tento přenos zaznamenán. Horizontální přenos představuje šíření infekce trávicí, dýchací soustavou, tzn. inhalací kontaminovaného vzduchu, požíváním kontaminovaného jídla a vody. Infekce se přenáší také fekálně-orální a orálně-orální transmisí (Bryan et Schwartz 1999; Deplazes et al. 2000; Mota et al. 2000; Weber et al. 2000). Rizikovější skupinou jsou lidé pracující s vodou, provozující homosexuální praktiky a užívající nitrožilně drogy. Spóry jsou poté vylučovány močí a stolicí. U lidí i zvířat bylo popsáno mnoho stejných mikrosporidií a prokázaly se zoonotické nákazy lidí pocházející ze zvířat.

Hlavními zdroji infekce je voda, jídlo a hmyz. Ve vodě spóry dlouhodobě přežívají a byly nalezeny ve vodě podzemní, povrchové i odpadní. Vzhledem k relativně malé velikosti spor je nedokáží v současné době používané systémy zachytit a infekční dávka pro člověka je poměrně malá (Franzen et Müller 1999). Proto se především v Americe snaží hygienici vyvinout specializované filtrační systémy schopné zachytit i spóry mikrosporidií a usilují o přidání *E. bienersi* a *E. intestinalis* na seznam z vody pocházejících patogenů. Voda je nejčastěji kontaminována zvířecími výkaly a spóry jsou detekovány v okolí čističek odpadních vod.

Přenos infekce potravou se rozmohl především díky globalizaci produkce, rychlejšímu transportu potravin a změnám ve způsobu konzumace jídla. Infekce se často vyskytuje u cestovatelů konzumujících pochoutky tamních kuchyní. Zdrojem infekce může být i mikrosporidii infikované/kontaminované maso, což dokládá případ HIV pacienta, v jehož případě byla mikrosporidiová infekce spojována s pravidelnou konzumací nedovařeného hovězího masa (Hutin et al. 1998). Nicméně v případě dostatečné tepelné úpravy potravin je riziko infekce téměř nulové.

### **1.2.3 Onemocnění a léčba mikrosporidiózy**

Průběh onemocnění mikrosporidiózou závisí plně na imunitě hostitele. Klinické projevy se objeví do 2-3 týdnů po infekci.

Nejčastějším příznakem mikrosporidiózy je chronický průjem, trpí jím především pacienti s oslabenou imunitou a AIDS pacienti, kteří mají méně než 100 CD4<sup>+</sup>T buněk na 1 µl krve. Průjem je většinou doprovázen horečkou, zimnicí, ztrátou chuti k jídlu, úbytkem váhy, tuků, D-xylózy, vitamínu B12 a celkovým chřadnutím. Lidem po transplantaci a následné imunosupresivní léčbě způsobují mikrosporidie průjem, zimnici, zvracení a únavu (Kotler et Orenstein 1998; Gumbo et al. 1999). S případnou infekcí žlučníku souvisí cholangitida

a cholecystitida. Mikrosporidie *Vittaforma corneae*, *Brachiola algerae* a druhy rodu *Nosema* napadají i oko, nejvíce rohovku, což způsobuje rozostřené vidění až protržení rohovky u imunokompetentních pacientů (Friedberg et Ritterband 1999; Font et al. 2003). Rizikovou skupinou jsou děti a starší lidé, jimž hůře pracuje imunitní systém a jsou hodně náchylní k vnějším vlivům.

Léčba mikrosporidióz je zatím v počátcích. Nejúčinnějším se zdá být albendazol, anthelmitikum, které inhibuje polymeraci  $\beta$ -tubulinu (Gross 2003) a vykazuje též antimykotickou aktivitu. Nicméně úplně účinkuje jen na druhy rodu *Encephalitozoon*. Na *E. bienewisi* je vhodnější fumagilin, antibiotikum produkované houbou *Aspergillus fumigatus*, který je však pro lidský organismus toxický a způsobuje neutropenii a trombocytopenii (Molina et al. 2002). Vědci se snaží syntetizovat látku netoxickou, avšak stejně účinnou. Zatím se zkouší syntetický fumagilin TNP-470 a další látky, např. azithromycin, furazolidon, itraconazol, metronidazol, nitazoxanid, otreotidin, sinefungin (Didier 2005). Pro infekce očí se používá lokální steroidní léčba.

### 1.3 Zoonotický potenciál mikrosporidií

Nejnovější studie zabývající se genotypy *E. bienewisi* poukazují na zoonotický potenciál tohoto druhu. Z 81 identifikovaných genotypů bylo 26 nalezeno pouze u lidí a 8 u lidí i jiných hostitelů, především prasat, bobrů, lišek, mývalů, ondatr, skotu, psů, ještěbů, makaků, ptáků, morčat a koček (Santín et Fayer 2009). Studie v Thajsku ukázala, že genotyp E, D, O a PigEBITS 7 se vyskytuje jak u lidí tak u prasat. Genotyp E a D se objevil u lidí i jiných zvířat a genotyp O a PigEBITS 7 jen u HIV pozitivních pacientů, avšak už dřív byl identifikován u prasat v Německu (Dengjel et al. 2001) a Americe (Buckholt et al. 2002). Z fylogenetických analýz vyplývá blízký vztah mezi zvířecími a lidskými izoláty a tudíž je zoonotický potenciál velmi pravděpodobný z důvodů absence transmisních bariér. I další druhy mikrosporidií vykazují vysoký zoonotický potenciál. *Encephalitozoon cuniculi* byl popsán ze psů, myši a králíků (Didier et al. 1996a). Doposud byly u lidí nalezeny genotypy I a III, což poukazuje na to, že lidské infekce *E. cuniculi* by mohly být zoonotického původu (Deplazes et al. 1996; Didier et al. 1996a; Rinder et al. 1998; Rossi et al. 1998; Snowden et al. 1999; Tosoni et al. 2002). V trusu městských holubů ve Španělsku byl nalezen druh *E. bienewisi* (prevalence 9,7 %), *E. intestinalis* (4 %) a *E. hellem* (0,8 %). Byl to vůbec první případ identifikace *E. intestinalis* a *E. hellem*

u holubů. Rizikovou skupinou proto jsou děti a starší lidé, nejčastější návštěvníci parků (Haro et al. 2005).

Fakt, že mikrosporidie infikující lidi byly identifikovány u různých zvířat a zároveň v environmentálních vzorcích povrchových vod naznačuje, že kontakt se zvířaty a kontaminovanou vodou představuje potenciální zdroj infekce (Dowd et al. 1998; Cotte et al. 1999; Fournier et al. 2000).

## 2 Cíle práce

1. Mikroskopicky vyšetřit vzorky stolice různých skupin lidí na přítomnost spór mikrosporidií.
2. Pomocí specifických molekulárních metod tyto vzorky stolice vyšetřit na přítomnost nejběžnějších druhů lidských mikrosporidií, *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon* spp.
3. Zhodnotit vlastní výsledky a porovnat výskyt mikrosporidiových infekcí lidí v České republice s literárními zdroji.

### 3 Materiál

Vzorky stolice různých skupin lidí nám byly dodávány ze Zdravotního ústavu se sídlem v Praze. V průběhu 2 let byly získány jak vzorky občanů s českou národností, které byly opakovaně (většinou tři po sobě následující odběry v rozmezí týdne) odebírány z důvodu zažívacích problémů, tak vzorky zahraničních studentů studujících na českých univerzitách, kteří byli z preventivních důvodů jednorázově koprologicky vyšetřeni. Vzorky byly do zpracování uchovávány v chladícím boxu při 4°C.

Celkem bylo vyšetřeno 680 vzorků od 384 pacientů, z nichž 248 bylo české národnosti a 136 bylo zahraničních studentů. Věková a pohlavní struktura lidí, od kterých byly vzorky odebírány je uvedena v tabulce (Tab. 2). Nejvíce lidí spadalo do věkové kategorie mezi 20-ti a 50-ti roky života. Zastoupení žen a mužů ve sledovaném vzorku populace bylo vyrovnané. U některých jedinců nebyl znám věk. Většina cizinců spadala do věkových skupin 12 – 19 let (65 jedinců) a 20 – 50 let (62 jedinců) a mužů bylo nepatrně více než žen, 77 resp. 59.

**Tab. 2: Věková a pohlavní struktura lidí účastnících se výzkumu**

věk / pohlaví	muži	ženy	celkem	procentuální vyjádření
0 – 5	22	18	<b>40</b>	10,4 %
6 – 11	30	27	<b>57</b>	14,8 %
12 – 19	37	48	<b>85</b>	22,1 %
20 – 50	83	77	<b>160</b>	41,7 %
50+	15	20	<b>35</b>	9,1 %
věk neznámý	3	4	<b>7</b>	1,9 %
<b>celkem</b>	<b>190</b>	<b>194</b>	<b>384</b>	
procentuální vyjádření	49,5 %	50,5 %		



## 4 Metody

Vzorky stolice byly vyšetřeny pomocí dvou diagnostických metod. Mikroskopicky prohlížením nátěrů stolice obarvených Calcofluorem a pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

### 4.1 Barvení spór pomocí Calcofluoru White M2R (Vávra and Chalupský 1982)

Vzorky stolice rozetřené na podložní skličku byly fixovány methanolem a ponechány zaschnout 2 minuty. Následovalo barvení 1% Calcofluorem White M2R v PBS (fosfátový pufr, pH 7,2 – 7,4) po dobu 10 minut. Poté byla podložní sklička opláchnuta PBS a dobarvena 0,5% Evansovou modří ve vodě po dobu 30 sekund. Podložní skličko bylo opět opláchnuto PBS a ponecháno zaschnout. Takto obarvené vzorky stolice byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX70) při zvětšení 1000× s olejovou imerzí při vlnové délce 490 nm. Calcofluor White M2R se specificky váže na polymery hexapyranózy v  $\beta$ -konfiguraci a může být proto využit pro detekci celulózy a chitinu (Maeda et Ishida 1967). Použití Calcofluoru White M2R pro fluorescenční mikroskopii bylo zavedeno Vávrou a Chalupským (1982). Myšlenka byla založena na přítomnosti  $\alpha$ -chitinu ve vnitřní vrstvě (endospóře) stěny spóry (Vávra 1976). Obarvené spóry mikrosporidií mají oválný tvar a pod mikroskopem svítí jasně modrobíle.

Jako pozitivní kontrola byly použity obarvené spóry *E.intestinalis* a *E. bieneusi* v koncentraci  $10^7$  spór na ml. *Encephalitozoon intestinalis* původně izolovaný z HIV-pozitivního pacienta (Didier et al. 1996b) je dlouhodobě udržován ve tkáňové kultuře buněk Vero E6 ve sbírce laboratoře veterinární a lékařské protistologie Parazitologického ústavu BC AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. U druhu *E. bieneusi* byly použity spóry ze stolice *E. bieneusi*-pozitivního HIV-AIDS pacienta z Limy (Peru), která byla poskytnuta Dr. G. S. Visvesvarou, CDC Atlanta, GA, USA.

## 4.2 Extrakce DNA ze vzorků stolice

K 180-200 mg stolice bylo přidáno 200 µl ASL pufru a 150 mg skleněných partikulích o průměru 0,5 mm. Poté bylo provedeno rozbíjení potenciálně přítomných spór pomocí homogenizátoru (FastPrep®-24, M.P. Biomedicals, CA, USA) po dobu 1 minuty při maximální rychlosti (6,5 m/s). Dále bylo postupováno podle návodu výrobce komerčně dodávaného izolačního kitu QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

## 4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Celkový objem reakční směsi pro každou PCR byl 25 µl (Tab. 3). Byly prováděny vždy dvě sady PCR s různými sety primerů, jedna na prokázání přítomnosti *E. bieneusi* a druhá pro *Encephalitozoon* spp. (Tab. 4, Tab. 5). Součástí každé sady PCR byla pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA vyizolovaná z kultury *E. intestinalis* v koncentraci  $3 \times 10^7$  spór na ml nebo ze stolice *E. bieneusi*-pozitivního HIV-AIDS pacienta (viz výše).

**Tab. 3: Reakční směs pro PCR (pro 1 reakci)**

Použitý roztok	objem
pufr (10x)	2,50 µl
dNTP's (1 mM)	0,50 µl
primer 5' (10 µM)	0,50 µl
primer 3' (10 µM)	0,50 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,50 µl
BSA (10mg/ml)*	1,00 µl
Taq polymeráza (TOP-BIO, 1 U/µl)	0,63 µl
deionizovaná H <sub>2</sub> O (PCR H <sub>2</sub> O)	13,87 µl
templátová DNA	5,00 µl
<b>celkem</b>	<b>25,00 µl</b>

\* pouze u primární PCR na úkor přidávané deionizovaná H<sub>2</sub>O

**Tab. 4: Primery pro *Enterocytozoon bieneusi***

primery	sekvence
<b>primární PCR</b>	
MSP-1 (15-mer)	TGA ATG (G,T)GT CCC TGT
MSP-2B (16-mer)	GTT CAT TCG CAC TAC T
<b>sekundární PCR</b>	
MSP-3 (24-mer)	GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G)(C,T) TAT
MSP-4B (26-mer)	CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG

**Tab. 5: Primery pro *Encephalitozoon spp.***

primery	sekvence
<b>primární PCR</b>	
MSP-1 (15-mer)	TGA ATG (G,T)GT CCC TGT
MSP-2A (15-mer)	TCA CTC GCC GCT ACT
<b>sekundární PCR</b>	
MSP-3 (24-mer)	GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G)(C,T)TAT
MSP-4A (27-mer)	CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT

Pro nested primery MSP byl daný amplifikační program na termocykleru (Little Genius, BIOER): počáteční denaturace při 94 °C – 3 minuty, denaturace při 94 °C – 45 sekund, nasedání primerů při 54 °C – 45 sekund, syntéza nového řetězce při 72 °C – 1 minuta. Celkem proběhlo 35 cyklů. Následné dosyntetizování nového řetězce při 72 °C trvalo 7 minut.

## 4.4 Gelová elektroforéza

Použité roztoky:

- 50× TAE pufr (242 g Tris báze; 47,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA)
- Agaróza
- Ethidium bromid
- 100 bp DNA ladder

Pomocí gelové elektroforézy byla ověřována délka DNA fragmentů. Gelová elektroforéza je metoda, při níž dochází k rozdělení DNA fragmentů v agaróze podle molekulových hmotností působením elektrického pole.

Gelová elektroforéza byla prováděna za použití 1% agarózového gelu v 1× TAE pufru s přídatkem ethidium bromidu (výsledná koncentrace v gelu byla 0,5 µg/ml) při napětí 70 V po dobu potřebnou pro separaci fragmentů DNA. Rozdělené DNA fragmenty byly vizualizovány UV transiluminátorem při vlnové délce 302 nm.

## 4.5 Příprava vzorků pro sekvenci

Z gelu vyříznuté požadované fragmenty DNA byly vloženy do čisté 1,5 ml mikrozkuřavky. DNA byla z excise gelu vyizolována pomocí komerčně dodávaného kitu QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) podle návodu výrobce. Vyizolovaná DNA byla vysušena ve vakuovém evaporizátoru (DyNAVap, Labnet) a poté do doby sekvenace uskladněna při teplotě +4 °C.

## 4.6 Sekvence a fylogenetická analýza výsledků

Vysušený vzorek DNA byl zaslán ke zpracování do Laboratoř genomiky BC AVČR, v.v.i. Sekvenační reakce byla provedena za použití sekundárních primerů a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) na sekvenátoru ABI3730XL. Výsledné sekvence byly zpárovány pomocí program Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd; <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) a uspořádány a porovnány se sekvencemi

uloženými v GenBank pomocí programů ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX>) a BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences).

Porovnání genetické podobnosti nově získaných sekvencí a sekvencí *E. bieneusi* uvedených v GenBank bylo provedeno pomocí neighbor-joining (NJ) v programu PAUP\* ver. 4.0b8a (Phylogenetic Analysis Using Parsimony; Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA). Standardně bylo použito 10 replikací s náhodným pořadím sekvencí. Statistická podpora stromu byla vyjádřena jako hodnota bootstrapu, která byla vypočítána při 500 opakováních. Pro vizualizaci fylogenetické analýzy byl použit grafický výstup TreeView 32 1.6.1. Pouze kompletní ITS sekvence byly zařazeny do analýzy. V případě více pojmenování identických sekvencí byl použit první publikovaný název. Nejvíce odlišná sekvence *E. bieneusi* získaná ze psa (GenBank accession no. DQ885585) byla použita jako outgroup.

#### **4.7 Statistické vyhodnocení výsledků**

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit software Statistica 5.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA, 1997). Pomocí Chi-square testu byly porovnávány jednotlivé četnosti výskytu mikrosporidií a bylo zjišťováno, zda získané hodnoty prevalence v jednotlivých skupinách lidí jsou statisticky průkazné na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ .

## 5 Výsledky

### 5.1 Vyhodnocení vzorků pomocí Calcofluoru White M2R

Mikroskopicky bylo vyšetřeno všech 680 vzorků lidské stolice od 384 pacientů. Celkem bylo detekováno 74 (10,9 %) pozitivních vzorků celkem od 70-ti lidí. Z tabulky 6 vyplývá, že nejčastěji byly mikrosporidie detekovány ve vzorcích pastovité stolice (11,7 %), méně ve formované (10,7 %) a průjmové (8,9 %), nicméně rozdíly nebyly statisticky významné ( $p>0,05$ ).

**Tab. 6: Výsledky vyšetření vzorků pomocí Calcofluoru White M2R**

konzistence stolice/ vyhodnocení vzorků	pozitivní	celkem vyšetřených	prevalence v kategorii
formovaná	47	<b>438</b>	10,7 %
pastovitá	23	<b>197</b>	11,7 %
průjem	4	<b>45</b>	8,9 %
<b>celkem</b>	<b>74</b>	<b>680</b>	10,9 %

Nejvyšší četnost mikroskopicky pozitivních jedinců byla zaznamenána ve věkové kategorii 6 – 11 let (29,8 %), nejméně pak ve věkové kategorii 12 – 19 (7,1 %). Mikrosporidie byly prokázány u 30 mužů a 40 žen (Tab. 7). Nakaženo bylo 61 Čechů z 248 (24,6 %) a 9 cizinců ze 136 (6,6 %).

**Tab. 7: Prevalence mikrosporidií v závislosti na věku a pohlaví - mikroskopie**

věk / pohlaví	muži	ženy	celkem	prevalence v kategorii
0 – 5	6	3	<b>9</b>	22,5 %
6 – 11	9	8	<b>17</b>	29,8 %
12 – 19	1	5	<b>6</b>	7,1 %
20 – 50	12	19	<b>31</b>	19,4 %
50+	2	5	<b>7</b>	20,0 %
věk neznámý	0	0	<b>0</b>	0
<b>celkem</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>70</b>	
prevalence v kategorii	15,8 %	20,6 %		

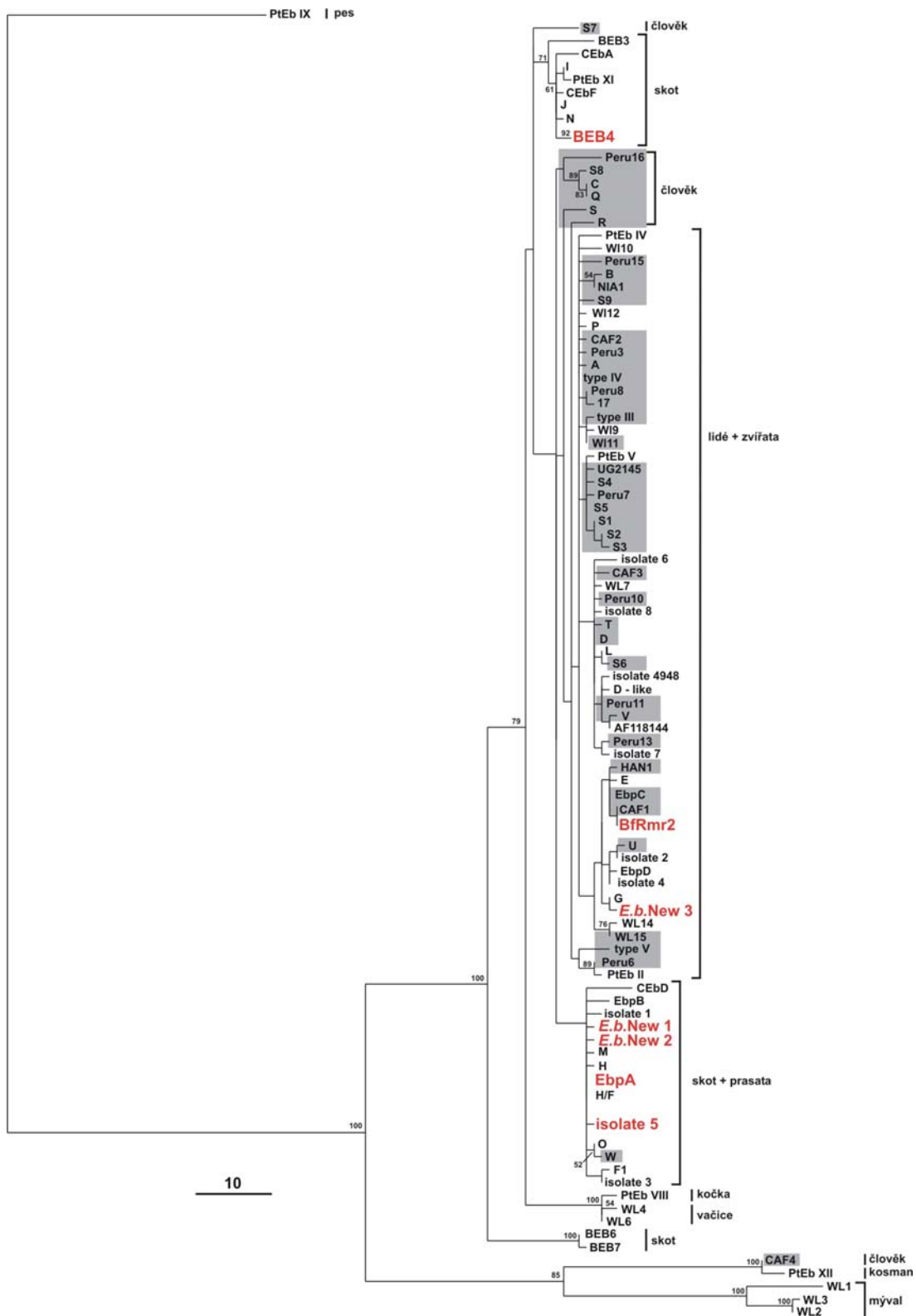
## 5.2 Vyhodnocení výsledků metodou PCR

Pomocí PCR bylo vyšetřeno 384 vzorků, od každého pacienta vždy jeden vzorek vybraný na základě mikroskopického vyšetření. Bylo získáno celkem 23 PCR produktů *E. bieneusi* a 149 *Encephalitozoon* spp., přičemž u 14 vzorků byla detekována *E. bieneusi* a *Encephalitozoon* spp. smíšená infekce. Všechny vzorky mikroskopicky vyhodnocené jako pozitivní byly pozitivní i pomocí PCR. U 226 vzorků nebyla prokázána přítomnost mikrosporidií.

V rámci druhu *E. bieneusi* bylo identifikováno 7 genotypů (Tab. 8). Kromě genotypů EbpA, BFRmr2, Isolate 5 a BEB4, které byly již dříve popsány u skotu a prasat, byly detekovány 3 dosud nepopsané genotypy, které byly pracovníě označeny *E.b.NEW1–E.b.NEW3*. Bylo detekováno 10 případů infekce EbpA, 3 případy BFRmr2, 3 případy Isolate 5, po 1 případu *E.b.New1* a *E.b.New2* a BEB4 a 4 případy *E.b.NEW3*.

Pomocí fylogenetické analýzy NJ byl získán nezakořeněný strom rozdělující *E. bieneusi* do několika skupin (Obr. 2). Hlavní skupina obsahovala většinu dříve publikovaných sekvencí včetně nových sekvencí *E.b.NEW1–E.b.NEW3*. Sekvence spadající do této skupiny byly získány ze širokého spektra hostitelů zahrnujících člověka i zvířata. Ostatní skupiny obsahovaly sekvence izolované především ze zvířat vyjma CAF4. Všechny námi detekované genotypy byly identické nebo příbuzné genotypům dříve popsáných z prasat a skotu.

U rodu *Encephalitozoon* spp. byl detekován *E. cuniculi* typ I a II, *E. hellem* 1A a *E. intestinalis* (Tab. 8). Nejvíce rozšířeným druhem rodu *Encephalitozoon* byl *E. cuniculi* typ II (110 případů) následován *E. hellem* 1A (19 případů). *Encephalitozoon cuniculi* typ I byl identifikován ve čtyřech a *E. intestinalis* pouze ve dvou vzorcích. Navíc byla detekována smíšená infekce *E. bieneusi* genotyp EbpA s *E. cuniculi* typ II v sedmi případech, *E. bieneusi* genotyp NEW3 s *E. hellem* 1A a *E. bieneusi* Isolate 5 s *E. hellem* 1A ve dvou případech. Jedenkrát byly detekovány *E. bieneusi* genotyp BFRmr2 s *E. cuniculi* typ II, *E. bieneusi* genotyp BEB4 s *E. cuniculi* typ II a *E. bieneusi* genotyp EbpA s *E. hellem* 1A.



Obr. 2: Neighbor-joining strom zkonstruovaný na základě ITS sekvencí SSU rRNA genu *Enterocytozoon bieneusi*. PtEb IX byl stanoven jako outgroupový taxon. Jsou uvedeny hodnoty bootstrapů nad 50 %. Genotypy identifikované v této práci jsou zvýrazněny červeně, genotypy popsané z člověka jsou šedivě podbarveny.



Nejvyšší četnost PCR pozitivních jedinců byla zaznamenána ve věkové kategorii 50+ let (54,3 %), nejméně pak ve věkové kategorii 0 – 5 let (25 %). Mikrosporidie byly prokázány u 75 mužů a 83 žen (Tab. 8). Infikováno bylo 57 cizinců nejčastěji ve věku 12 – 19 let, z toho 10 jedinců bylo pozitivních na *E. bienewisi* a 47 na *Encephalitozoon* spp. Nejvíce se u cizinců také vyskytovaly smíšené infekce.

**Tab. 8: Výskyt mikrosporidií v závislosti na věku a pohlaví – PCR**

věk / pohlaví	muži (počet infikovaných)	ženy (počet infikovaných)	celkem	prevalence v kategorii
0 – 5	<i>E.c.</i> II (3) <i>E.h.</i> 1A (1) <i>E.i.</i> (1) <i>E.b.</i> EbpA+ <i>E.c.</i> II (1)	<i>E.c.</i> II (1) <i>E.h.</i> 1A (1) <i>E.i.</i> (1) <i>E.b.</i> EbpA+ <i>E.c.</i> II (1)	<b>10</b>	25,0 %
6 – 11	<i>E.c.</i> II (11) <i>E.h.</i> 1A (2) <i>E.c.</i> I (1) <i>E.b.</i> NEW3+ <i>E.h.</i> 1A (1)	<i>E.c.</i> II (10) <i>E.h.</i> 1A (1) <i>E.b.</i> EbpA (1)	<b>27</b>	47,4 %
12 – 19	<i>E.c.</i> II (9) <i>E.h.</i> 1A (1) <i>E.b.</i> EbpA (1) <i>E.b.</i> BFRmr2 (1) <i>E.b.</i> NEW2 (1) <i>E.b.</i> NEW3 (1) <i>E.b.</i> EbpA+ <i>E.c.</i> II (1)	<i>E.c.</i> II (17) <i>E.b.</i> Isolate 5 (1) <i>E.b.</i> EbpA+ <i>E.c.</i> II (1) <i>E.b.</i> BFRmr2+ <i>E.c.</i> II (1) <i>E.b.</i> NEW3+ <i>E.h.</i> 1A (1) <i>E.b.</i> EbpA+ <i>E.h.</i> 1A (1)	<b>37</b>	43,5 %
20 – 50	<i>E.c.</i> II (20) <i>E.h.</i> 1A (5) <i>E.c.</i> I (1) <i>E.b.</i> NEW1 (1) <i>E.b.</i> EbpA+ <i>E.c.</i> II (1) <i>E.b.</i> Isolate5+ <i>E.h.</i> 1A (1) <i>E.b.</i> BEB4+ <i>E.c.</i> II (1)	<i>E.c.</i> II (23) <i>E.h.</i> 1A (5) <i>E.c.</i> I (2) <i>E.b.</i> BFRmr2 (1) <i>E.b.</i> NEW3 (1) <i>E.b.</i> EbpA+ <i>E.c.</i> II (2) <i>E.b.</i> Isolate5+ <i>E.h.</i> 1A (1)	<b>65</b>	40,6 %
50+	<i>E.c.</i> II (8) <i>E.h.</i> 1A (1)	<i>E.c.</i> II (8) <i>E.h.</i> 1A (2)	<b>19</b>	54,3 %
věk neznámý	0	0	<b>0</b>	0
<b>celkem</b>	<b>75</b>	<b>83</b>	<b>158</b>	
prevalence v kategorii	39,5 %	42,8 %		

*E.c.*: *Encephalitozoon cuniculi*; *E.h.*: *E. hellem*; *E.i.*: *E. intestinalis*; *E.b.*: *Enterobytosoon bienewisi*

Z tabulky 9 vyplývá, že celková prevalence mikrosporidií byla 44,8 % a nejčastěji byly mikrosporidie pomocí PCR detekovány ve vzorcích pastovité stolice (48,7 %), méně ve formované (43,6 %) a průjmové (37,5 %), nicméně rozdíly nebyly statisticky významné ( $p>0,05$ ).

**Tab. 9: Výsledky vyšetření vzorků pomocí PCR**

konzistence stolice/ vyhodnocení vzorků	<i>E. bieneusi</i>	<i>Encephalitozoon</i> <i>spp.</i>	<b>celkem vyšetřených</b>	prevalence v kategorii
formovaná	18	87	<b>241</b>	43,6 %
pastovitá	4	54	<b>119</b>	48,7 %
průjem	1	8	<b>24</b>	37,5 %
<b>celkem</b>	<b>23</b>	<b>149</b>	<b>384</b>	44,8 %

## 6 Diskuze

V práci jsem se zaměřila na mikrosporidie nejčastěji se vyskytující u lidí, *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon* spp. Mikrosporidie jsou kosmopolitně rozšířené a jejich spóry dokážou přežít dlouho i v nepříznivých podmínkách. Nejčastěji se tyto mikrosporidie vyskytují u osob s oslabenou imunitou, jako jsou AIDS pacienti, lidé po transplantaci orgánů, pacienti trpící rakovinou, cestovatelé, děti a starší lidé (Bryan et Schwartz 1999; Deplazes et al. 2000; Didier et al. 2004).

Zdravotní stav lidí, jejichž vzorky stolice jsme vyšetřovali, nám nebyl znám. Výsledky byly tudíž vyhodnoceny jen s ohledem na věk a pohlaví osob, nicméně lze předpokládat, že se jednalo o imunokompetentní jedince. Celkem bylo vyšetřeno 384 lidí (od 0,5 roku po 85 let). Nejčastěji se vyskytovala stolice pastovitá, poté formovaná a nejméně jsme měli k dispozici průjmovitou stolicí. Zatímco nejvíce spór mikrosporidií obsahovala stolice pastovitá, v průjmovitých vzorcích byly mikrosporidie detekovány nejméně často. Naše výsledky jsou celkem překvapivé, jelikož studie probíhající jinde ve světě ukazují větší prevalenci u průjmových stolic. Např. v Německu byla zjištěna prevalence u pacientů s průjmem 36 %, zatímco u pacientů bez průjmu pouze 4,3 % (Sobottka et al. 1998).

Je obtížné porovnávat naše výsledky s jinými, jelikož je přítomno mnoho rozdílností ve věku pacientů, pohlaví, zdravotním stavu, životních podmínkách, geografické lokalizaci výzkumů apod.

Vyšetření calcofluorem ukázalo celkovou prevalenci 10,9 %. Podobných výsledků bylo dosaženo touto metodou v Etiopii, kdy celková prevalence byla 7,6 % (Endeshaw et al. 2006). Z toho lze usoudit, že geografická poloha, sociální a ekonomická úroveň významně neovlivňuje celkový výskyt spór mikrosporidií v lidské populaci.

Na základě mikroskopie byla nejpromořenější věková skupina od 6-ti do 11-ti let (29,8 %), a nejméně se spóry mikrosporidií vyskytovaly u teenagerů (7,1 %). Studie jiných autorů však ukazují, že teenageři jsou velmi rizikovou skupinou. V Kamerunu vykazovali nejvyšší prevalenci (81,5 %) právě teenageři (Nkinin et al. 2007). Nižší výskyt mikrosporidií v této věkové kategorii může být způsoben vyšší životní úrovní v podmínkách České republiky a jiné zoohygienické návyky.

Přesnější metodou pro důkaz mikrosporidií v lidské stolici je PCR a následná sekvenace, s jejíž pomocí můžeme určit přesný druh mikrosporidie i genotyp. Vyšetření vzorků metodou PCR má větší záchytnost než mikroskopické vyšetření (Fayer et al. 2003). To se

potvrdilo i v našem případě, kdy prevalence při vyšetření calcofluorem byla 10,9 %, zatímco pomocí PCR byla celková prevalence vyšší, 44,8 %.

*Enterocytozoon bieneusi* je nejčastěji se vyskytující lidskou mikrosporidií s prevalencí přesahující 50 % (Mathis et al. 2005). U HIV pacientů je prevalence v rozmezí 2 – 78 % (Matos et al. 2009). Avšak u HIV pacientů bez průjmů se tato mikrosporidie vyskytuje v 1,4 – 4,3 %. Také ve studii zabývající se prevalencí *E. bieneusi* u HIV-séronegativních pacientů s průjmem z Kanárských ostrovů byla tato mikrosporidie detekována v 11,5 % vzorků stolice (Abreu-Acosta et al. 2005), což je v rozporu s našimi výsledky, kde byl *E. bieneusi* nejčastěji identifikován ve vzorcích formované stolice (7,5 %). V rozvojových zemích, kde je vyšší výskyt pacientů s AIDS, by se měly mikrosporidie vyskytovat častěji, ale nedávná studie to průkazně nepotvrdila (Matos et al. 2009). V rozvojových zemích lidé s HIV a průjmem vykazovaly prevalenci 2,5 – 51 %, s HIV a bez průjmů 4,6 % a lidé bez onemocnění virem HIV a s nebo bez průjmovitých onemocnění 9 – 58,1 % (Matos et al. 2009). Počet pacientů s HIV v rozvojových zemích postupně klesá díky souvislé antiretrovirální terapii, proto se rozšíření mikrosporidií již tolik neliší od promoření ve vyspělých zemích. Průzkum uskutečněný v Etiopii detekoval *E. bieneusi* v 77 % případů a *E. intestinalis* v 15,4 %, tím bylo potvrzeno, že se v lidské stolici nemusí striktně vyskytovat jen *Enterocytozoon bieneusi*, ale také druhy rodu *Encephalitozoon* spp. Smíšená infekce byla odhalena v 7,7 % (Endeshaw et al. 2006). Dále se ve stolici může vyskytovat druh *Vittaforma corneae* (Matos et al. 2009). V naší studii byla smíšená infekce detekována ve 14 případech, vždy se jednalo o *E. bieneusi* s *Encephalitozoon* spp. z důvodu metodické nedostatečnosti pro případné rozlišení smíšené infekce jednotlivými druhy rodu *Encephalitozoon*.

Jelikož nám není znám zdravotní stav pacientů ani sociální podmínky, můžeme se pouze domnívat, proč u lidí žijících v České republice je prevalence výskytu mikrosporidií 44,8 %. Nejpravděpodobnějším vysvětlením by mohl být zoonotický potenciál studovaných mikrosporidií. Několik studií potvrzuje častý výskyt mikrosporidií u prasat, skotu (Deplazes et al. 1996; Rinder et al. 2000), v zajetí chovaných zvířat (Bornay-Llinares et al. 1998), ale i ptáků (Kašičková et al. 2007), nejvíce u městských holubů ve Španělsku s prevalencí 29 % (Haro et al. 2005) a Holandsku s prevalencí 11 % (Bart et al. 2008). Tomu nasvědčuje i náš nález genotypů *E. bieneusi* (EbpA, BFRmr2, Isolate 5 a BEB4) a genotypů rodu *Encephalitozoon* spp. (*E. cuniculi* typ I, typ II, *E. intestinalis*, *E. hellem* 1A). Většina genotypů *E. bieneusi* detekovaných v naší práci nebyla doposud popsána

u lidí. *Enterocytozoon bieneusi* genotyp EBpA byl detekován u skotu a prasat (Breitenmoser et al. 1999; Rinder et al. 2000), genotypy Isolate 5 a BFRmr2 u prasat (Buckhotlt et al. 2002; Reetz et al. 2009) a genotyp BEB4 u skotu (Sulaiman et al. 2004). Tři genotypy dosud nebyly popsány a pracovníě jsme je nazvali genotyp *E.b.NEW1* – *E.b.NEW3*. *Encephalitozoon cuniculi* typ I se nejvíce vyskytuje u králíků, byl detekován u dvou z šesti pacientů ve Švýcarsku, kteří přišli do styku s králíky (Mathis et al. 1997; Weber et al. 1997). Typ II nebyl dosud u lidí popsán, byl detekován jen u myši, potkanů a polárních lišek (Hersteinsson et al. 1993). Jeho výskyt u lidí ale není překvapivý z důvodu širokého hostitelského spektra ostatních typů druhu *E. cuniculi* a bylo jen otázkou času, kdy bude u člověka nalezen. Zdrojem infekce mohou být myším trusem kontaminované potraviny. *Encephalitozoon hellem* 1A byl identifikován ve vzorcích z HIV-pozitivních pacientů ze Španělska, Itálie a USA (Haro et al. 2003). *Encephalitozoon intestinalis* je druhá nejčastější mikrosporidie infikující lidi, největší prevalenci vykazují AIDS pacienti (Mathis et al. 2005). Je tudíž s podivem, že se v našich vzorcích objevil jen dvakrát.

Výsledky naší práce jsou překvapivé, ukázalo se, že výskyt mikrosporidií v populaci je vyšší než se dosud předpokládalo. Za rizikové faktory infekce lidí mikrosporidiiemi lze na základě detekovaných genotypů považovat kontakt s infikovanými zvířaty, požití kontaminované vody či potravin. Pro bližší posouzení zdrojů lidské infekce bude nutné provést rozsáhlejší studii se zaměřením na environmentální kontaminace spórami mikrosporidií a rezervoárová zvířata.

## 7 Závěry

1. Vyšetření stolice lidí pomocí barvení spór calcofluorem ukázalo celkovou prevalenci 10,9 %. Nejvíce se spóry vyskytovaly u dětí mezi 6-ti až 11-ti lety. Nejčastěji byly mikrosporidie detekovány ve vzorcích pastovité stolice.
2. Pomocí metody PCR byla zjištěna celková prevalence 44,8 % s nejvyšším výskytem u lidí starších 50-ti let. Nejčastěji byly mikrosporidie detekovány ve vzorcích pastovité stolice.
3. Nejčastěji se vyskytující mikrosporidií byl druh *Encephalitozoon cuniculi* typ II, který nebyl dosud u lidí zachycen. Detekovány byly pouze dva genotypy již dříve nalezené u lidí, *E. cuniculi* typ I a *E. hellem* 1A. *Encephalitozoon intestinalis*, druhá nejrozšířenější lidská mikrosporidie, byl identifikován pouze ve 2 případech.  
*Enterocytozoon bieneusi*, mikrosporidie nejběžnější pro člověka, byla zachycena v nejmenším počtu. Byly identifikovány čtyři dříve u zvířat popsané (EbpA, BEB4, BFRmr2, Isolate 5) a tři nové genotypy (*E.b.NEW1* – *E.b.NEW3*).
4. Získané výsledky potvrzují hypotézu o celosvětovém, na životní úrovni nezávyslém rozšíření mikrosporidií, ukazují na absenci přenosových bariér mezi zvířaty a lidmi a naznačují výskyt asymptomatických infekcí imunokompetentních hostitelů.

## 8 Literatura

- Abreu-Acosta N., Lorenzo-Morales J., Leal-Guio Y., Coronado-Alvarez N., Foronda P., Alcoba-Florez J., Izquierdo F., Batista-Díaz N., Del Aguila C., Valladares B., 2005:** *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99: 848-855.
- Ambroise - Thomas P., 2000:** Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. *Int. J. of Parasitol.* 30: 1361-1367.
- Bart A., Wentink-Bonnema E.M., Heddema E.R., Buijs J., van Gool T., 2008:** Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in Amsterdam, The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7056-7058.
- Blanshard C., Hollister W.S., Peacock C.S., Tovey D.G., Ellis D.S., Canning E.U., Gazzard B.G., 1992:** Simultaneous infection with two types of intestinal microsporidia in a patient with AIDS. *Gut* 33: 418-420.
- Bornay-Llinares F.J., da Silva A.J., Moura H., Schwartz D.A., Visvesvara G.S., Pieniazek N.J., Cruz-Lopez A., Hernandez-Jauregui P., Guerrero J., Enriquez 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.
- 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., Schwartz D.A., 1999:** Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner M., Weiss L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 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., Kotler D.P., Orenstein J.M., 1993:** *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40: 101-112.

- Cannig E.U., Lom J., 1986:** The Microsporidia of Vertebrates. Academic Press, New York, pp. 289.
- Canning E.U., Hollister W.S., 1987:** Microsporidia of mammals-widespread pathogens or opportunistic curiosities. Parasitol. Today 3: 267-273.
- 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.
- 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., Müller 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., Bernard F., Cochand-Priollet B., Lavergne A., Ravisse P., Modigliani 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., Vossbrinck C.R., Baker M.D., Rogers L.B., Bertucci D.C., Shadduck J.A., 1995:** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology 111: 411-421.
- Didier E.S., Visvesvara G.S., Baker M.D., Rogers L.B., Bertucci D.C., De Groote, Vossbrinck C.R., 1996a:** A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. J. Clin. Microbiol. 34: 2835-2837.



- Didier E.S., Rogers L.B., Orenstein J.M., Baker M.D., Vossbrinck C.R., van Gool T., Hartskeerl R., Soave R., Beudet L.M., 1996b:** Characterization of three *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.F., Shadduck J.A., 1998a:** Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv. Parasitol.* 40: 283-320.
- Didier E.S., Snowden K.F., Shadduck J.A., 1998b:** Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv. Parasitol.* 40: 279-316.
- Didier E.S., Didier P.J., Snowden K.F., Shadduck J.A., 2000:** Microsporidiosis in mammals. *Microbiol. Infect.* 2: 709-720.
- Didier E.S., Stovall M.E., Green L.C., Brindley P.J., Sestak K., Didier P.J., 2004:** Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.* 126: 145-166.
- Didier E.S., 2005:** Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica* 94: 61-76.
- Dowd S., Gerba S., Pepper I., 1998:** Confirmation of the human pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3332-3335.
- Endeshaw T., Kebede A., Verweij J.J., Zewide A., Tsige K., Abraham Y., Wolday D., Woldemichael T., Messele T., Polderman A.M., Petros B., 2006:** Intestinal microsporidiosis in diarrheal patients infected with human immunodeficiency virus-1 in Addis Ababa, Ethiopia. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59: 306-310.
- Fayer R., Santin M., Palmer R., 2003:** Comparison of microscopy and PCR for detection of three species of *Encephalitozoon* in feces. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50: 572-573.
- Font R.L., Su G.W., Matoba A.Y., 2003:** Microsporidial stromal keratitis. *Arch. Ophthalmol.* 121: 1045-1047.
- Fournier S., Liguory O., Santillana-Hayat M., Guillot E., Sarfati C., Dumoutier N., Molina J.M., Derouin F., 2000:** Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29: 95-100.
- 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: Wittner M., Weiss L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 293-314.
- Graczyk T.K., Bosco-Nizeyi J., da Silva A.J., Moura I.N.S., Pieniazek N.J., Cranfield M.R., Lindquist H.D.A., 2002:** A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitol. Res.* 88: 926-931.
- Gross U., 2003:** Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitol. Res.* 90: S14-S18.
- Gumbo T., Hobbs R.E., Carlyn C., Hall G., Isada C.M., 1999:** Microsporidia infection in transplant patients. *Transplantation* 67: 482-484.
- 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.
- Haro M., Izquierdo F., Henriques-Gil N., Andrés I., Alonso F., Fenoy S., del Águila C., 2005:** First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3153-3157.
- Hartskeerl R.A., Didier S.E., Varner P.W., Didier P.J., Aldras M.A., Millichamp J.N., van Gool T., Schuitema A.R.J., Didier E.S., Terpstra W.J., 1995:** Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler, Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* 110: 277-285.
- Hersteinsson P., Gunnarsson E., Hjartardottir S., Skirnisson K., 1993:** Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland, 1986 to 1989. *J. Wildl. Dis.* 29: 341-344.
- Hutin Y.J., Sombardier M.N., Liguory O., Sarfati C., Derouin F., Modai J., Molina J.M., 1998:** Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J. Infect. Dis.* 178: 904-907.
- Jeong D.K., Won G.Y., Park B.K., Hur J., You J.Y., Kang S.J., Oh I.G., Lee Y.S., Stein B.D., Lee J.H., 2007:** Occurrence and genotypic characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs with diarrhea. *Parasitol. Res.* 102: 123-128.

- Kašičková D., Sak B., Kváč M., Ditrich O., 2007:** Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host – cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. Parasitol. Res. 101: 1685-1688.
- 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., Fast N.M., 2002:** Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Ann. Rev. Microbiol. 56: 93-116.
- Kotler D.P., Orenstein J.M., 1998:** Clinical syndromes associated with microsporidiosis 40: 321–349.
- Kotler D., Orenstein J.M., 1999:** Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: Wittner M., Weiss L. (eds.), The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 258-292.
- 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.
- Liguory O., Fournier S., Sarfati C., Derouin F., Molina J.M., 2000:** Genetic homology among thirteen *Encephalitozoon intestinalis* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. J. Clin. Microbiol. 38: 2389-2391.
- Lom J., Dyková I., 1992:** Protozoan Parasites of Fishes, Elsevier, Amsterdam, pp. 315.
- Maeda H., Ishida N., 1967:** Specificity of binding of hexapyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. J. Biochem. 62: 276-278.
- Mathis A., Michel M., Kuster H., Muller C., Weber R., Deplazes P., 1997:** Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. Parasitology 114: 29-35.
- Mathis A., Weber R., Deplazes P., 2005:** Zoonotic potential of the microsporidia. Clin. Microbiol. Rev. 18: 423-445.
- Matos O., Sak B., Lobo M.L., Kučerová Z., Xiao L., Kváč M., Antunes F., Květoňová D., Secor W.E., 2009:** Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* infection in humans. J. Euk. Microbiol., *in press*.
- Matsubayashi M., 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., Tourneur M., Sarfati C., Chevret S., de Gouvello A., Gobert J.G., Balkan S., Derouin F., 2002:** Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. N.

- Engl. J. Med. 346: 1963-1969, and Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 090 Study Group.
- 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.
- Nägeli K., 1857:** Über die neue Krankheit die Seidenraupe unde verwandet Organismen. *Bot. Zeitung.* 15: 760-761.
- Nkinin S.W., Asonganyi T., Didier E.S., Kaneshiro E.S., 2007:** Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2841-2846.
- Oborná R., 1999:** Mikrosporidióza působená druhem *Encephalitozoon intestinalis* na modelu imunodeficientní SCID myši. Magisterská diplomová práce. Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice. 36 pp.
- Orenstein J. M., Seedor J., Friedberg D.N., S. S. M., Tierno P.M., Charles N.C., M. D. M., Lowder C.Y., McMahon J.T., Longworth D.L., Rutherford I., Yee R.W., Martinez A., Tio F., Held K., 1990:** Microsporidian keratoconjunctivitis in patients with AIDS. *Morb. Mort. Wkly. Rep.* 39: 188-189.
- Reetz J., Nöckler K., Reckinger S., Vargas M.M., Weiske W., Broglia A., 2009:** Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitol Int.* in press
- Rinder H., Katzwinkel-Wladarsch S., Thomschke A., Löscher T., 1998:** Strain differentiation in microsporidia. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 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.
- Rossi P., la Rosa G., Ludovisi A., Tamburrini A., Gomez Morales M.A., Pozio E., 1998:** Identification of human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *Int. J. Parasitol.* 28: 1361-1366.
- Santín M., Fayer R., 2009:** *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the ITS sequence – a consensus. *Eukaryot. Cell*, in press.
- Shadduck J.A., Orenstein J.M., 1993:** Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch. Pathol. Lab Med.* 117: 1215-1219.

- Schwartz D. A., Visvesvara G.S., Dieneshouse M.C., Weber R., Font R.L., Wilson L.A., Corrent G., Serdarevic O.N., Rosberger D.F., Keenen P.C., Grossniklaus H.E., Hewan-Lowe K., Bryan R.T., 1993:** Pathologic features and immunofluorescent antibody demonstration of ocular microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) in seven patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* 115: 285-292.
- 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: Wittner M., Weiss L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 393-419.
- Snowden K., Logan K., Phalen D.N., 2000:** Isolation and characterization of an avian isolate of *Encephalitozoon hellem*. *Parasitology* 121: 9-14.
- Sobottka I., Schwartz D.A., Schottelius J., Visvesvara G.S., Pieniazek N.J., Schmetz C., Kock N.P., Laufs R., Albrecht H., 1998.** Prevalence and clinical significance of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with and without diarrhea in Germany: a prospective coprodiagnostic study. *Clin. Infect. Dis.* 26: 475-80.
- Sprague V., Becnel J.J., Hazard E.I., 1992:** Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 285-395.
- Sulaiman I.M., Fayer R., Yang C., Santin M., Matos O., Xiao L., 2004:** Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitol. Res.* 92: 328-334.
- Suter C., Mathis A., Hoop R., Deplazes P., 1998:** *Encephalitozoon hellem* infection in a yellow-streaked lory (*Chalcopsitta scintillata*) imported from Indonesia. *Vet. Rec.* 143: 694-695.
- Tosoni A., Nebuloni M., Ferri A., Bonetto S., Antinori S., Scaglia M., Xiao L., Moura H., Visvesvara G.S., Vago L., Costanzi G., 2002:** Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. *Mod. Pathol.* 15: 577-583.
- Undeen A.H., Meer R.K.V., 1998:** Microsporidian Intrasporic Sugars and Their Role in Germination. *J. Invert. Pathol.* 73: 294-302.

- Vávra J., 1976:** The structure of microsporidia. Bulla L.A., Cheng T.C. (eds.): Comparative Pathobiology. Vol. 1. Biology of the microsporidia. Plenum Press, N.Y., London, pp. 89-93.
- Vávra J., Chalupský J., 1982:** Fluorescence staining of “Calcofluor White M2R”. J. Protozool. 29 (Suppl.): 503.
- Vivarés C.P., Gouy M., Thoarat F., Méténier G., 2002:** Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. Curr. Opin. Microbiol. 5: 499-505.
- Weber R., Kuster H., Visvesvara G.S., Bryan R.T., Schwartz D.A., Lüthy 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., Deplazes P., Flepp M., Mathis A., Baumann R., Sauer B., Kuster H., Lüthy 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., Deplazes P., Schwartz D., 2000:** Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. Contrib. Microbiol. 6: 166-192.
- Wittner M., 1999:** Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. In: Wittner M., Weiss L.M. (eds.): The microsporidia and Microsporidiosis. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, pp. 1-6.