

Małgorzata Bednarska*¹

¹Zakład Parazytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, Warszawa

Wpłynęło w lutym 2012 r.

1. Wstęp. 2. Pozycja systematyczna mikrosporydiów. 3. Charakterystyka spory. 4. Cykl rozwojowy mikrosporydiów. 5. Charakterystyka gatunków wykrywanych u ludzi. 5.1. *Enterocytozoon bieneusi*. 5.2. *Encephalitozoon* spp. 5.3. inne patogenne gatunki. 6. Chorobotwórczość. 7. Epidemiologia. 8. Mikrosporydioza w Polsce. 9. Drogi zarażenia i różnorodność genetyczna. 10. Diagnostyka mikrosporydiozy. 11. Leczenie. 12. Podsumowanie

Microsporidia – opportunistic pathogens of humans

Abstract: Microsporidia are small, unicellular, and obligatory intracellular parasites of vertebrates and invertebrates. Phylogenetic analysis has placed *Microsporidia* within the *Fungi*. They have very unusual organelles such as single polar tube, polaroplast and anchoring disc. The following genera have been associated with human infections: *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Anncaliia*, *Vittaforma*, *Brachiola*, *Nosema* and *Microsporidium*. These parasites are etiological agents of diarrhea and disseminated systemic microsporidiosis in immunodeficient or immunocompetent individuals: AIDS patients, organ transplant recipients, travelers, contact lens wearers, children and elderly people. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* are the most common causes of human infections. Microsporidian spores appear to be relatively resistant to environmental conditions, and species of microsporidia infecting humans have been identified in water sources and in free-ranging, domestic or farm animals, with a threat for waterborne, foodborne and zoonotic transmissions. Several methods are available for detection and species differentiation of microsporidia. Microscopy techniques allow the diagnosis of microsporidiosis but for genus and species determination the antigen-based and molecular methods must be used. The most effective drugs for treating microsporidiosis in humans include albendazole and fumagillin. The highly active antiretroviral therapy (HAART) reduces the prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected persons. Future studies shall focus on risk factors predisposing to microsporidiosis.

1. Introduction. 2. Taxonomy. 3. The characteristics of spores. 4. The life cycle. 5. Species infecting humans. 5.1. *Enterocytozoon bieneusi*. 5.2. *Encephalitozoon* spp. 5.3. Other pathogenic species. 6. Pathogenicity. 7. Epidemiology. 8. Microsporidiosis in Poland. 9. Transmission routes and genetic diversity. 10. Diagnostic methods. 11. Treatment. 12. Summary

Słowa kluczowe: choroby oportunistyczne, diagnostyka, epidemiologia, leczenie mikrosporydia

Key words: diagnostics, epidemiology, microsporidia, opportunistic diseases, treatment

1. Wstęp

Mikrosporydia są grupą pasożytów, które od ponad 100 lat znajdują się w kręgu zainteresowań parazytologów. Pierwszy odkryty gatunek *Nosema bombycis* opisano w połowie XIX wieku jako przyczynę „choroby pieprzowej”, która zdziesiątkowała larwy jedwabników w południowej Europie. Mikrosporydia wywołują wiele chorób o znaczeniu gospodarczym, głównie u ryb i owadów [24, 34]. W chwili obecnej opisano ponad 1200 gatunków występujących u bezkręgowców i kręgowców, a coraz częściej pasożyty te są wykrywane jako patogeny ssaków, w tym ludzi [23, 32, 65, 94].

Pierwsze doniesienie o mikrosporydiach jako przyczynie infekcji u człowieka odnotowano w 1959 roku [55], ale przez następne kilkadziesiąt lat rzadko były one kojarzone z chorobami ludzi [92]. Wzrost zainteresowania tą grupą pasożytów nastąpił wraz z wystąpieniem pandemii AIDS na świecie. W chwili obecnej mikrosporydia są rozpoznawane na całym świecie jako czynnik

etiologiczny infekcji oportunistycznych u osób o różnym statusie immunologicznym. Wywołują chroniczne biegunki, oraz rozsiane, wieloukładowe zarażenia nie tylko u chorych z AIDS, ale także u ludzi przyjmujących leki immunosupresyjne, biorców przeszczepów, użytkowników soczewek kontaktowych, podróżnych, dzieci i osób w podeszłym wieku [22, 24, 28, 35, 36, 64, 68, 94].

2. Pozycja systematyczna mikrosporydiów

Mikrosporydia są eukariotycznymi, żyjącymi wewnątrzkomórkowo organizmami należącymi do typu *Microsporidia*, wykazującymi silne pokrewieństwo filogenetyczne z grzybami (*Fungi*) [47, 51, 82, 89, 93]. Ich pozycja systematyczna zmieniała się wraz z rozwojem nauki. W chwili opisanego gatunku *Nosema bombycis* przez Balbianiego w 1857 roku uznano go za organizm grzybopodobny i zaklasyfikowano do *Schizomycetes*. W następnych latach mikrosporydia uznano

* Autor korespondencyjny: Zakład Parazytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 55 41 141; e-mail: mabed@biol.uw.edu.pl

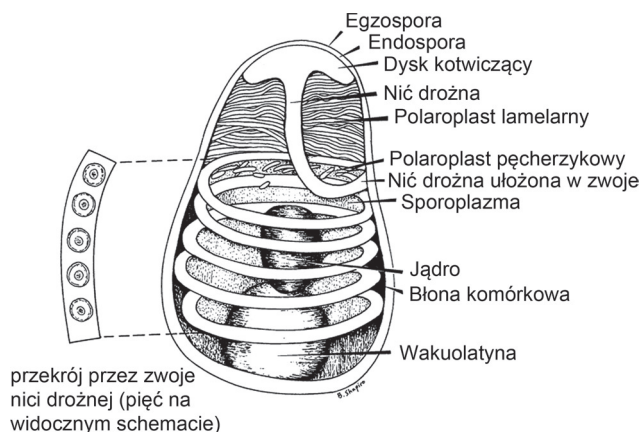
kolejno za pierwotniaki formujące spory – *Sporozoa* (1882), a następnie w obrębie tego taksonu zaliczono do *Cnidosporidia* (1901), podgrupy skupiającej cztery luźno powiązane grupy pasożytów, które charakteryzował wewnątrzkomórkowy tryb życia (*Microsporidia*, *Myxosporidia*, *Actinosporidia* i *Helicosporidia*) [48, 75]. Obecnie są klasyfikowane kolejno jako grzyby, zwierzęta i zielenice. W roku 1982 według nowej hipotezy przyjęto, że mikrosporydia należą do *Archeozoa* – prymitywnych *Eukariota* pozbawionych mitochondriów podobnie jak *Archamoebae* (*Entamoeba*), *Metamonada* (*Giardia*) i *Parabasalia* (*Trichomonas*) [12, 48].

W świetle obecnych badań molekularnych i filogenetycznych uważa się, że mikrosporydia są blisko spokrewnione z grzybami, a o czym świadczą filogenetyczne analizy genów kodujących β -tubulinę, podjednostkę polimerazy RNA II, białko wiążące TATA, oraz czynniki translacyjne EF-1 i EF-2 [46, 47, 51]. Obecność chityny w wewnętrznej otoczce spory także potwierdza przynależność do tej grupy organizmów. W trakcie adaptacji do pasożytniczego trybu życia mikrosporydia rozwinęły wysoce wyspecjalizowany system infekowania komórek żywiciela, ale z drugiej strony utraciły pewne typowe cechy *Eukaryota*: rybosom 80S, mitochondria, peroksosomy i klasyczny aparat Golgiego. Mikrosporydia posiadają rybosom 70S o prokariotycznej budowie z rybosomalnymi podjednostkami (30S i 50S) i cząsteczkami 16S rRNA, 23S rRNA i 5S rRNA, mitosomy oraz atypowy aparat Golgiego [26, 89, 90]. O przynależności mikrosporydiów do *Eukariota* świadczą jednak takie cechy jak obecność białek homologicznych z mitochondrialnymi białkami szoku cieplnego (HSP70) oraz powinowactwo błon polaroplastu do błon aparatu Golgiego. Istnieje również hipoteza zakładająca, że tylna wakuola pełni funkcję peroksosomów [49, 88, 91].

3. Charakterystyka spory

Spora ma unikalną budowę wewnętrzną i jest najbardziej charakterystyczną postacią mikrosporydiów. Jako jedyne stadium rozwojowe ma zdolność do przebywania poza komórką żywiciela, jest postacią dyspersyjną, inwazyjną i diagnostyczną. Jej rozmiary w zależności od gatunku wahają się od jednego do kilkudziesięciu mikrometrów. Błona komórkowa spory otoczona jest przez dwie ściany: zewnętrzną glikoproteinową i wewnętrzną chitynowo-białkową bardzo odporną na działanie czynników środowiska. Struktury wewnętrzne znajdujące się w sporoplazmie są specyficzne i charakterystyczne jedynie dla tego taksonu. Schemat budowy spory przedstawiono na rys. 1 [94].

Drożna nić spełniająca funkcję „strzykawki” przyczepiona jest do szczytu spory swoją rozszerzoną częścią, tzw. dyskiem kotwiczącym, a polaroplast – błona



Rys. 1. Budowa spory mikrosporydium

Rysunek zamieszczony za zgodą Profesora Louisa Weissa z Albert Einstein College of Medicine, USA. Oryginał pochodzi z Wittner M., Weiss L.M. (eds.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*, ASM Press, 1999 (Wittner and Weiss, 1999) ze zmianami.

niasta struktura homologiczna z aparatem Golgiego – otacza początkowy, prosty jej fragment. Nić może być nawet 100 razy dłuższa od spory (50–100 μm) i jest charakterystycznie ułożona w zwoje, których liczba (od kilku do ponad 30) i kąt zagięcia stanowią cechę diagnostyczną [96, 98]. W sporoplazmie znajdują się także jedno lub dwa jądra, rybosomy i tylna wakuola prawdopodobnie biorąca udział w gwałtownym wyrzuceniu nici w trakcie inwazji. Gatunki patogene dla ludzi posiadają spory o niewielkich rozmiarach (1,0–3,0 $\mu\text{m} \times 1,5$ –4,0 μm), co znacznie utrudnia ich wykrywanie i rozpoznanie [24, 34, 99].

4. Cykl rozwojowy mikrosporydiów

Do zarażenia dochodzi drogą pokarmową poprzez połknięcie spory, drogą oddechową przez inhalację, drogą płciową (głównie u osób homoseksualnych), poprzez kontakt bezpośredni (śluzówka oka), a także na skutek urazów poprzez otwarte rany. Czynniki pobudzające sporę do dalszego rozwoju są słabo poznane, zależą od środowiskowych warunków fizycznych i chemicznych, takich jak zmiany pH, zmiany wilgotności, obecność specyficznych anionów (bromkowy, chlorkowy, jodkowy, fluorkowy) i kationów (potasowy, sodowy, litu, cezu) oraz niskie dawki promieniowania UV. Czynniki hamujące aktywację spor są m.in.: chlorki magnezu i amonu, fluorek sodu, jony srebra, niskie stężenie soli, promieniowanie gamma, wysokie dawki promieniowania UV, temperatura powyżej 40°C, inhibitory kalmoduliny i cytochalazyna D zapobiegająca polimeryzacji aktyny. Gatunek pasożyta odgrywa istotną rolę w dalszym przebiegu inwazji [93].

Gdy aktywacja spory zostanie zaindukowana, pierwszym sygnałem jest wzrost ciśnienia osmotycznego, pęcznienie spory i specyficzne wybrzuszenie polaro-

plastu. Pod wpływem wysokiego ciśnienia spora pęka w najcieńszym miejscu i nić zostaje wystrzelona z prędkością do 100 $\mu\text{m/s}$, dziurawiąc błonę komórki żywiciela poprzez jej przebicie lub w procesie fagocytozy [33]. Gdy nić jest całkowicie rozwinięta, cytoplazma z zawartością zostaje przepchnięta (wstrzyknięta) do wnętrza komórki w czasie 15–500 ms i dalszy rozwój przebiega odmiennie w zależności od gatunku. Inny mechanizm inwazji oparty jest na fagocytozie spory, która dopiero po dostaniu się do komórki żywicielskiej poprzez rozwiniętą nić infekuje cytoplazmę [33].

W zarażonej komórce tworzą się meronty, które lokalizują się bądź bezpośrednio w cytoplazmie (*Enterocytozoon*, *Nosema*, *Brachiola*), albo otaczają się błoną, która może być pochodzenia pasożytniczego (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma*) tworząc tzw. wakuolę parazytoforusa lub pochodzenia żywicielskiego (*Encephalitozoon*) lokalizując się w tzw. sporoforusie [32]. W niektórych przypadkach dochodzi do reorganizacji wnętrza zarażonych komórek i pasożyty mogą zostać otoczone przez różne organelle, np. retikulum endoplazmatyczne, jądro komórkowe bądź mitochondria, lub rozwijać się w ich wnętrzu. Komórki żywiciela pod wpływem pasożyta mogą zostać zdeformowane, zmienić kształt i wielkość. W kolejnym etapie rozwojowym, procesie merogonii, dochodzi do namnażania pasożyta, a następnie w fazie sporogonii formowane są spory, u niektórych gatunków otoczone sporoforusem, które infekują kolejne komórki żywiciela lub rozpoczynają fazę pozakomórkową.

5. Charakterystyka gatunków wykrywanych u ludzi

Większość doniesień o mikrosporydiozie jest związana z osobami zarażonymi wirusem HIV, ale mikrosporydia coraz częściej są wykrywane jako objawowe lub bezobjawowe zarażenia u osób o różnym statusie immunologicznym [6, 7, 24, 64, 65]. Gatunki najczęściej wykrywane u człowieka należą do dwóch rodzajów: *Enterocytozoon* z jedynym jak dotąd opisanym przedstawicielem *E. bienewsi* oraz *Encephalitozoon*. W obecnej chwili zagrożenie dla zdrowia człowieka stanowi 15 gatunków należących do 7 rodzajów: *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon* (*Septata*), *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Brachiola*, *Vittaforma*, *Anncaliia* (*Brachiola*) i *Nosema* oraz kilka niesklasyfikowanych tzw. *Microsporidium* [24, 32, 44, 75]. Opisy poszczególnych gatunków zamieszczono w tabeli I.

5.1. *Enterocytozoon bienewsi*

Gatunek *Enterocytozoon bienewsi* po raz pierwszy wykryto w 1985 roku we Francji w enterocytach haitańskiego pacjenta chorego na AIDS [20]. Jest to

patogen zazwyczaj wykrywany w przypadkach jelitowej mikrosporydiozy, rzadziej jako przyczyna stanów zapalnych wątroby i woreczka żółciowego [13, 60, 70, 76]. Najczęściej występuje u osób immunologicznie kompetentnych [1, 59, 65]. W przeciwieństwie do innych gatunków mikrosporydiów bardzo rzadko wywołuje zarażenia rozsiane, ograniczając swoją ekspansję do układu oddechowego. *E. bienewsi* jest najmniejszym gatunkiem występującym u ludzi. Owalne spory mają rozmiary 1,1–1,6 $\mu\text{m} \times 0,7$ –1,0 μm , a charakterystyczne zwoje nici (5–7) ułożone są dwurzędowo (dwuwarstwowo). W zainfekowanych komórkach, głównie enterocytach, pasożyty rozwijają się w bezpośrednim kontakcie z cytoplazmą [31]. Początkowo był uznawany za gatunek izolowany głównie od ludzi, ale w ciągu następnego lat *E. bienewsi* zaczęto wykrywać także u zwierząt domowych (np. psów i kotów), gospodarskich (np. świń, bydła i drobiu) oraz dziko żyjących (np. bobry, wydry, lisy, króliki) [63, 66, 68, 78, 80].

5.2. *Encephalitozoon* spp.

Wszystkie gatunki należące do tego rodzaju rozwijają się w charakterystycznej wakuoli parazytoforusa. Meronty dzielą się przez podział podłużny i zazwyczaj pozostają w wakuoli. Spory o rozmiarach 2,0–2,5 \times 1,0–1,5 μm mają nić polarną ułożoną w 5–7 zwojów, uporządkowanych w jednym rzędzie. Pasożyty, oprócz enterocytów jelita cienkiego i innych komórek nabłonkowych, zasiedlają także fibroblasty, makrofagi oraz komórki śród błonka [31, 32].

Encephalitozoon intestinalis po raz pierwszy wykryto w 1992 roku u pacjentów zarażonych wirusem HIV [9]. Na podstawie różnic w budowie ultrastruktury został opisany jako *Septata intestinalis*. Dopiero późniejsze badania oparte na analizie sekwencji rDNA potwierdziły przynależność tego gatunku do rodzaju *Encephalitozoon* [40]. Ta reklasyfikacja jest wciąż dyskutowana, gdyż *E. intestinalis* w trakcie swojego rozwoju tworzy unikalną otoczkę (fibrillar network) separującą pasożyta od wakuoli parazytoforusa. Jest to drugi po *E. bienewsi* najczęściej wykrywany gatunek mikrosporydiów u ludzi. Podobnie może być przyczyną biegunki, ale w trakcie rozwijającej się inwazji dosyć często powoduje zapalenie pęcherza moczowego oraz inwazje rozsiane na nerki, płuca, śluzówkę nosa, zatoki oraz oczy i mózg.

Dwa pozostałe gatunki patogenne dla człowieka są morfologicznie nierozróżnialne w mikroskopie świetlnym i elektronowym. Rozróżnić je można jedynie metodami immunologicznymi, biochemicznymi lub molekularnymi. *Encephalitozoon cuniculi* był pierwszym gatunkiem odkrytym u ssaków. Został wyizolowany od królika w 1922 roku [52] i jest najlepiej poznanym i opisanym gatunkiem spośród wszystkich mikrosporydiów.

Tabela I

Charakterystyka gatunków mikrosporydriów izolowanych od ludzi [10, 24, 25, 32, 43, 54, 79]

Nazwa gatunkowa	Rok wykrycia u człowieka	Lokalizacja	Chorobotwórczość		Żywności
			Osoby immuno-kompetentne	Osoby z niedoborem immunologicznym	
<i>Enterocytozoon bienersi</i>	1985	układ pokarmowy: jelito cienkie, przewody żółciowe, wątroba, układ oddechowy: śluzówka oskrzeli, tchawicy, nosa	biegunka, zarażenia bezobjawowe	biegunka, stan zapalny jelita, zapalenie dróg żółciowych, pęcherzyka żółciowego, płuc, oskrzeli, zatok, zapalenie błony śluzowej nosa	kręgowce
<i>Encephalitozoon intestinalis</i> (syn. <i>Septata intestinalis</i>)	1993	układ pokarmowy: jelito cienkie, przewody żółciowe, układ oddechowy, kości, skóra, zarażenia wieloukładowe	biegunka, zarażenia bezobjawowe	biegunka, owrzodzenie jelita cienkiego, zapalenie dróg żółciowych, pęcherzyka żółciowego, nerek, zakażenie dróg moczowych, zapalenie oskrzeli, zatok, błony śluzowej nosa, zapalenie rogówki	ssaki
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	1923	zarażenia wieloukładowe, układ moczowy, nerki, układ oddechowy, ośrodkowy układ nerwowy, układ pokarmowy, wątroba, śledziona, otrzewna, dwunastnica, oczy, jajnik, serce	ropień mózgu, zapalenie rogówki	zapalenie mózgu, zakażenie pęcherza moczowego, nerek, zapalenie wątroby, otrzewnej, infekcje rozsiane, niewydolność oddechowa, ogólne osłabienie	ssaki
<i>Encephalitozoon hellem</i>	1991	zarażenia wieloukładowe, oczy, układ oddechowy, układ moczowy	zapalenie rogówki	zakażenie dróg moczowych, ropień gruczołu krokowego, zapalenie zatok, błony śluzowej nosa, zapalenie płuc, oskrzeli, nerek, infekcje rozsiane	ptaki
<i>Anncaliia algerae</i> (syn. <i>Brachiola algerae</i> syn. <i>Nosema algerae</i>)	1999	oczy, mięśnie, struny głosowe	zapalenie rogówki	zapalenie spojówki, rogówki, zapalenie mięśni, zapalenie strun głosowych	owady
<i>Brachiola connori</i> * (syn. <i>Nosema connori</i>)	1959	zarażenia wieloukładowe	bd	infekcje rozsiane, zapalenie mięśni (miositis)	nieznany
<i>Brachiola vesicularum</i> (syn. <i>Nosema-like</i> sp.)	1998	mięśnie	bd	zapalenie mięśni	nieznany
<i>Microsporidium ceylonensis</i>	1973	oczy	bd	wrzód rogówki	nieznany
<i>Microsporidium africanum</i>	1981	oczy	bd	wrzód rogówki	nieznany
<i>Nosema ocularum</i>	1991	oczy	bd	zapalenie spojówki i rogówki	nieznany
<i>Pleistophora ronnecki</i>	1985	mięśnie	bd	zapalenie mięśni	nieznany
<i>Trachipleistophora hominis</i>	1996	mięśnie, oczy, zatoki nosowe	bd	zapalenie mięśni, zapalenie spojówki i rogówki, zapalenie zatok	nieznany
<i>Trachipleistophora anthropophthera</i>	1996	zarażenia wieloukładowe, OUN, oczy	bd	zapalenie mózgu, zapalenie mięśni, infekcje rozsiane	nieznany
<i>Vittiforma corneae</i> (syn. <i>Nosema corneum</i>)	1990	oczy, układ moczowy	zapalenie rogówki	zapalenie rogówki	nieznany
<i>Vittiforma-like</i> (96% hom. <i>V. corneae</i>)	2003	jelito cienkie, płuca	biegunka	biegunka	nieznany

* Gatunek początkowo opisany jako *Encephalitozoon cuniculi* przez Matsubayashi et al. (1959) później sklasyfikowany jako *Nosema connori* przez Weisera (1993).
bd – brak danych

Pokrewny gatunek *E. hellem* po raz pierwszy wykryto w 1991 roku jako przyczynę rozsianej mikrosporydiozy u trzech pacjentów z AIDS [21]. Do tego momentu wszystkie przypadki zachorowań były diagnozowane mikroskopowo jako inwazje *E. cuniculi*, ale należy przypuszczać, że przypadki encephalitozoonozy u ludzi odnotowane przed 1991 rokiem wywołane były zarówno przez *E. cuniculi*, jak i przez *E. hellem*. Zarażenia tymi dwoma gatunkami rzadko są opisywane jako przyczyna dolegliwości jelitowych, natomiast często wywołują rozsiane infekcje wątroby, nerek, pęcherza moczowego, otrzewnej, tchawicy, oskrzeli, płuc, rogówki i spojówki oraz ośrodkowego układu nerwowego [31].

5.3. Inne gatunki mikrosporydiów

Inne gatunki mikrosporydiów patogenne dla ludzi najczęściej występują u osób z ciężkimi niedoborami odporności. U immunokompetentnych pacjentów związane są zazwyczaj z infekcjami oczu. Mikrosporydia z rodzaju *Nosema* spp. to szeroko rozpowszechnione na całym świecie pasożyty owadów i innych bezkręgowców [86]. W komórkach rozwijają się w bezpośrednim kontakcie z cytoplazmą żywiciela. Stadia wewnątrzkomórkowe są dwujądrowe i tworzą charakterystyczne dla grzybów stadium jąder sprzężonych – dikarion. Spory izolowane od zarażonych ludzi są także niewielkich rozmiarów 4,0–4,5 × 2,0–2,5, a nić biegunowa układa się w 10–12 zwojów [31]. *Nosema ocularum* wywołuje zakażenia rogówki u ludzi, a pozostałe gatunki mogące być przyczyną infekcji oczu to *Vittaforma corneae*, *Trachipleistophora* sp., *Anncalia algerae*, *Microsporidium ceylonensis* oraz *M. africanum* [62, 69, 87]. Gatunek *V. corneae* posiadający podłużne spory o wymiarach 3,7 μm × 1,0 μm i dikariotyczne jądro, był także przyczyną zapalenia dróg moczowych u pacjenta z AIDS, a mikrosporydia sklasyfikowane jako *Vittaforma* – like izolowano od pacjentów z biegunką o różnym statusie immunologicznym [31, 79].

Inwazje wywołane przez mikrosporydia z rodzaju *Pleistophora* i *Trachipleistophora* powodują zapalenie mięśni objawiające się gorączką, mięśniobólami, nadwrażliwością mięśni i ogólnym osłabieniem organizmu. Gatunek *T. hominis* opisano jako przyczynę zapalenia mięśni u 4 chorych na AIDS [30]. Pokrewny gatunek *T. anthropophthera* był izolowany od pacjentów z zaburzeniami nerwowymi i z objawami podobnymi do neurotoksoplazmozy. W trakcie autopsji spory *Trachipleistophora* izolowano także z serca, tarczycy, trzustki, wątroby, śledziony, szpiku kostnego i węzłów limfatycznych [99]. Zarażenie *Anncalia algerae*, oprócz zapalenia rogówki i zapalenia mięśni, może być przyczyną zapalenia tkanki łącznej lub strun głosowych (Tab. I) [10].

6. Chorobotwórczość mikrosporydiów

Kliniczne objawy mikrosporydiozy zależą od statusu immunologicznego zarażonej osoby, a także od miejsca inwazji oraz od gatunku pasożyta. U osób immunologicznie kompetentnych dochodzi do zarażenia dwoma najczęściej spotykanymi gatunkami *E. bienewsi* i *E. intestinalis*. Rozwija się zazwyczaj postać jelitowa z biegunką lub innymi dolegliwościami ustępującymi po ok. 2 tygodniach lub inwazja może przejść w fazę chroniczną albo pozostać bezobjawowa. U osób immunokompetentnych także rogówka oka jest miejscem uprzywilejowanym do powstawania infekcji ocznych wywołanych przez mikrosporydia, które powodują nieostrość widzenia oraz stany zapalne i owrzodzenia rogówki. Zarażeniom oczu sprzyja używanie soczewek kontaktowych oraz stosowanie terapii sterydowej [69].

U osób z niedoborami odporności przebieg mikrosporydiozy jest dużo cięższy. Pacjenci z zespołem AIDS lub z innymi niedoborami odporności, o liczbie limfocytów CD4+ poniżej 100/μl, zarażeni *E. bienewsi* lub *E. intestinalis*, często zapadają na wodnistą biegunkę połączoną z gorączką, utratą wagi i wyniszczeniem organizmu. Także pacjenci z ciężkimi chorobami (reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca, białaczka) są narażeni na wielonarządowe infekcje wywołane przez gatunki z rodzaju *Encephalitozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma*, *Anncalia* (*Brachiola*) i *Nosema*. W przypadku osób z grup ryzyka infekcje częściej mają ostry przebieg i mogą być przyczyną śmierci [11, 54, 83].

7. Epidemiologia

Mikrosporydioza występuje u ludzi na całym świecie, lecz częstości wykrywanych zarażeń różni się w zależności od regionu geograficznego i od stosowanych metod diagnostycznych. Przed falą zachorowań na AIDS rzadko była identyfikowana jako choroba człowieka, a po 1985 roku badania dotyczyły głównie osób zarażonych wirusem HIV, u których ekstensywność występowania mikrosporydiów waha się od 5 do 50% w zależności od położenia geograficznego i stosowanych metod badawczych. Najczęściej mikrosporydioza u chorych na AIDS występuje w południowej Azji (Indie, Tajlandia), Afryce (Tunezja, Mali, Uganda, Senegal, Zimbabwe) i Południowej Ameryce (Brazylia, Peru). U tej grupy pacjentów zarażenia są często wykrywane w koinwazji z *Cryptosporidium* [8, 28, 29, 67, 74, 76]. Serologiczne badania epidemiologiczne z ostatniej dekady wykazały obecność przeciwciał u osób immunokompetentnych, m.in. dawców krwi, pracowników leśnych, właścicieli zwierząt i ciężarnych kobiet (1,3–22%) [64]. U podróżnych (3,3–10%) oraz dzieci i osób starszych

mikrosporydia wykrywane są jako czynnik etiologiczny biegunek (6–17%) [53, 59, 84, 85, 95], a pozostałe grupy ryzyka stanowią osoby noszące soczewki kontaktowe oraz pacjenci po przeszczepach stosujący leki supresyjne (kilkadziesiąt udokumentowanych przypadków) [16, 23, 36, 50, 69, 81]. Coraz częściej bezobjawowe zarażenia mikrosporydiami stwierdzone są u osób immunokompetentnych (42%–67%) [64, 65, 77].

8. Mikrosporydioza w Polsce

W Polsce brak jest informacji o występowaniu mikrosporydiozy u ludzi i zwierząt w przeciwieństwie do innych wywołujących biegunki pasożytów jelitowych z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* [4, 97]. W czasie badań prowadzonych w naszym zakładzie wśród pacjentów z grup ryzyka (osoby przed/po przeszczepach przyjmujący leki immunosupresyjne, osoby z wrodzonymi niedoborami odporności, chorzy na inne choroby) wykazano 10 przypadków zarażenia mikrosporydiami w rozmazach kałowych barwionych trichromem i/lub techniką PCR [5, 6]. Analiza molekularna badanych izolatów pozwoliła potwierdzić u jednej z pacjentek zarażenie *E. bienewsi* (sekwencja zdeponowana w GenBank, nr akcesyjny JN107808) [6].

W innych badaniach przeprowadzonych przez Słodkowi i wsp. [73] stwierdzono trzy przypadki zarażeń mikrosporydiami u hemodializowanych pacjentów (10%). Wykorzystując technikę FISH w dwóch przypadkach potwierdzono inwazję *E. cuniculi*, natomiast u trzeciego pacjenta jednoczesne zarażenie *E. cuniculi* i *E. intestinalis*. Ponadto spory *E. bienewsi* wykryto w próbach kałowych ssaków żyjących w poznańskim ogrodzie zoologicznym, a spory *E. hellem* u kilku gatunków dziko żyjących ptaków wodnych i ptaków znajdujących się w poznańskim ZOO. U gęsi domowej (*Anser anser domestica*) stwierdzono obecność spor *E. intestinalis* [71, 72]. Świeże produkty spożywcze także mogą być źródłem patogennych mikrosporydii w naszym kraju. Spory *Enterocytozoon* i *Encephalitozoon* wykryto na świeżych owocach, kielkach i zielonych liściach warzyw [43].

9. Drogi zarażenia i różnorodność genetyczna mikrosporydii

Drogi transmisji mikrosporydii nie są dokładnie poznane, ale udowodniono że źródłami zakażeń mogą być woda i żywność. Spory są obecne w wodzie, są także odporne na szeroki zakres temperatur, co sprzyja ich przeżywaniu w środowisku zewnętrznym. Małe rozmiary oraz nieduża dawka potrzebna do zarażenia także mają wpływ na rozwój inwazji. Kilka gatunków mikrosporydii niebezpiecznych dla ludzi (*E. bienewsi*,

E. intestinalis, *V. corneae*) izolowano z wodociągów komunalnych, rowów melioracyjnych, ścieków, wód powierzchniowych i podziemnych [27, 42]. Wykazano także, iż mikrosporydia były jednym z czynników etiologicznych epidemii wodno-pochodnej we Francji [15]. Agencja Ochrony Środowiska USA (US Environmental Protection Agency) dwukrotnie umieszczała gatunki najczęściej zarażające ludzi (*E. bienewsi* i *E. intestinalis*) na liście niebezpiecznych czynników (listy CCL-1 i CCL-2), mogących skażić wodę, jako patogeny wymagające monitorowania (Drinking Water Contaminant Candidate List) (<http://www.epa.gov/safewater/ccl/cclfs.html>). Podobnie National Institutes of Health i Center for Disease Control and Prevention (CDC) zakwalifikowały mikrosporydia do kategorii B, jako czynniki mogące wywołać epidemie wodnopochoodne.

Do zarażenia dochodzi najczęściej drogą pokarmową i inhalacyjną, a obecność spor w kale i moczu może wskazywać, że transmisja horyzontalna może przebiegać na drodze fekalno-oralnej lub oralno-oralnej poprzez spożycie zanieczyszczonego pokarmu lub wody, bądź też przez wdychanie skażonego powietrza lub poprzez śluzówkę oka [69, 92]. Także u osób homoseksualnych wrasta ryzyko zarażeń mikrosporydiami [7]. Pierwszą związaną z żywnością (foodborne) epidemię mikrosporydiozy odnotowano w 2009 roku, w której źródłem zarażenia były sałata i ogórki [18]. Kąpiel w basenach i gorących źródłach może być także źródłem mikrosporydiozy [41].

W ciągu ostatnich kilku lat rozwój technik biologii molekularnej pozwolił wykazać, że mikrosporydioza u ludzi może mieć podłoże zoonotyczne. Największy rezerwuuar zoonotyczny posiada gatunek *E. bienewsi*, którego spory wykrywano m.in. u makaków, małp wąskonosych marmozetów, świń, bydła, koni, lam, antylop kudusów, psów, kotów, lisów, szopów, wydr, świnek morskich, bobrów, królików, piżmaków, sokołów i innych ptaków [45, 63, 66, 68, 78, 80]. Badania oparte na różnicach w obrębie regionu ITS wykazały dużą różnorodność genetyczną. Dotychczas opisano 94 genotypy występujące tylko u ludzi, 11 wspólnych dla ludzi i kilku gatunków zwierząt oraz pozostałe kilkadziesiąt, charakterystyczne wyłącznie dla zwierząt [19, 78].

Także w obrębie gatunku *E. cuniculi*, opisanego pierwotnie jako gatunek zoonotyczny, wyróżnia się obecnie trzy szczepy o różnicach fenotypowych i genotypowych opartych na różnej liczbie powtórek fragmentu złożonego z 4 nukleotydów (5'-GTTT-3') w obrębie regionu ITS. Szczep I (rabbit strain) *E. cuniculi* był izolowany od królików i od ludzi, szczep II (mouse strain) występuje u myszy i lisów błękitnych, a szczep III (dog strain) był izolowany od psów i ludzi [58]. Wszystkie trzy szczepy były izolowane od ptaków [45].

Różnice genetyczne w obrębie gatunku *E. hellem* wynikają z polimorfizmu regionu ITS i genów kodu-

jących białka nici polarnej (polar tube protein PTP). W chwili obecnej opisanych jest 5 różnych genotypów (1A, 1C, 1D, 2B, 2C) izolowanych od ptaków i ludzi.

Potwierdzono także możliwość bezpośredniej, zoonotycznej transmisji mikrosporydiów. Opisano dwa takie przypadki zarażenia wywołane gatunkiem *E. cuniculi*. U dziesięcioletniej dziewczynki stwierdzono serokonwersję po kontakcie z zainfekowanymi psami [56] oraz infekcję i stan zapalny rogówki u chłopca, który doznał urazu oka po ubodzeniu przez skórę [3]. W przypadku gatunku *Anncaliia algerae*, mikrosporydiów naturalnie pasożytujących w komarach i innych owadach, istnieje ryzyko transmisji poprzez wektor. U pacjentów zakażonych wirusem HIV ukąszenia przez pszczoły, osy czy szerszenie uznaje się za czynnik ryzyka wystąpienia mikrosporydiozy. Także szczególnie osobom z obniżoną odpornością zaleca się picie przegotowanej lub butelkowanej wody i podawanie obróbce termicznej spożywanych mięs, ryb i owoców morza [23].

10. Diagnostyka mikrosporydiozy

Ze względu na niewielkie rozmiary mikrosporydia są trudne do wykrycia w próbach medycznych czy środowiskowych. Początkowo identyfikacja pasożytów opierała się na badaniu ich ultrastruktury przy użyciu mikroskopu elektronowego. Dzięki tej technice dokładnie poznano stadia rozwojowe mikrosporydiów oraz znaczące różnice w budowie poszczególnych gatunków. Do badań na szeroką skalę mikroskop elektronowy nie jest przydatny ze względu na wysokie koszty, czasochłonność i potrzebę posiadania wyspecjalizowanego personelu.

Rutynowo do wykrywania mikrosporydiów wykorzystywany jest mikroskop świetlny. W ostatniej dekadzie nastąpił rozwój różnych technik barwienia, a jedną z bardziej specyficznych jest zmodyfikowana metoda barwienia chromotropem 2R według metody Webera [92]. Spory barwią się na opalizujący, różowy kolor. Często także stosowane jest barwienie fluorescencyjne przy użyciu takich barwników jak calcofluor, fungifluor czy Uvitex B. Optyczne barwniki wiążą się z chityną w ścianie spory i świecą w mikroskopie fluorescencyjnym na kolor biały lub turkusowy. Niestety, barwniki te mają także powinowactwo do innych grzybów, co może utrudniać diagnostykę różnicową mikrosporydiów. Wymienione techniki najczęściej stosuje się do barwienia rozmazów kałowych i płynów ustrojowych, ale użyteczne są też, obok hematoksyliny i eozyiny, w barwieniu skrawków parafinowych [31, 37].

Do identyfikacji gatunków i genotypów mikrosporydiów stosowane są wysoko specyficzne i czułe metody molekularne: PCR, nested-PCR, real time PCR [27, 57, 61]. Kwas nukleinowy DNA pasożytów może być izolowany z różnorodnego materiału: kału, moczu, treści

dwunastniczej, żółci, wydzieliny płuc, biopłatów tkanek czy zeszkrobiny rogówki. Techniki molekularne są także przydatne do identyfikacji nowych gatunków i genotypów izolowanych od ludzi i zwierząt [31, 38]. Izolacja DNA mikrosporydiów wymaga wstępnego etapu zniszczenia ściany spory. Stosuje się wysokie temperatury (gotowanie), trawienie proteinazą K lub enzymami rozpuszczającymi chitynę (chitynaza, litykaza), mechanicznie przez rozbijanie szklanymi kulkami lub wykorzystuje się zestawy komercyjne. W przypadku badania prób kałowych zalecane jest stosowanie 0,5 % podchlorynu sodu, 10% formaliny lub 1 M KOH w celu usunięcia inhibitorów PCR [31, 32, 59].

Markerami genetycznymi najczęściej stosowanymi w badaniach mikrosporydiów są geny rRNA: gen małej podjednostki rybosomu (SSU rRNA), gen dużej podjednostki rybosomu (LSU rRNA) oraz region ITS, który charakteryzuje się dużą zmiennością genotypową w obrębie gatunków, co pozwala na różnicowanie szczepów/ gęgatunków. Inną grupą markerów stosowanych w diagnostyce mikrosporydiów jest rodzina silnie konserwowanych genów α -, β - i γ -tubuliny, które z powodzeniem mogą być stosowane w badaniach ewolucyjnych [31, 38].

Metody immunologiczne takie jak immunofluorescencja (IFA), ELISA, western blot, są również stosowane w diagnostyce mikrosporydiów [27]. Wykorzystuje się szereg monoklonalnych i poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko białkom ściany spory lub białkom nici polarnej gatunków najczęściej zarażających ludzi. Testy IFA są mniej czułe niż PCR, a ich specyficzność i wrażliwość zależą w dużym stopniu od stosowanych przeciwciał. Do wykrywania i identyfikacji mikrosporydiów stosuje się także metodę FISH (fluorescent *in situ* hybridization), opartą na wykorzystaniu sond wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi, które wiążą się z kwasami nukleinowymi (DNA lub RNA) mikrosporydiów. Metoda ta może być z powodzeniem stosowana w badaniu świeżego materiału, przechowywanego w formalinie lub w formie skrawków parafinowych, lecz jest bardzo pracochłonna i mniej czuła niż PCR. Jest jednak szczególnie przydatna w badaniach środowiskowych do różnicowania „żywych” spor (inwazyjnych) i oceny stopnia zagrożenia epidemiologicznego. Rutynowa diagnostyka mikrosporydiów powinna być oparta na zastosowaniu dwóch różnych metod: histologicznej i molekularnej, bądź immunologicznej ze względu na brak jednej referencyjnej techniki.

11. Leczenie

W leczeniu mikrosporydiozy stosuje się szereg leków, których wybór jest uzależniony od gatunku pasożyta, zainfekowanych narządów oraz przebiegu choroby. Do

terapii najczęściej występujących zarażeń jelitowych stosowane są leki zawierające albendazol i fumagilin [17, 39].

Albendazol jest pochodną benzimidazolu, która hamuje polimeryzację β -tubuliny. Ma szerokie spektrum działania przeciwko pasożytniczym helmintom i grzybom. Albendazol najskuteczniej działa na zarażenia wywołane przez *Encephalitozoon* spp. W przypadku inwazji *E. bieneusi*, w mniejszym stopniu powoduje zahamowanie rozmnażania i spadek liczby pasożytów [2, 17, 39].

Fumagilin, antybiotyk wyodrębniony z grzyba *Aspergillus fumigatus*, działa na enzym niezbędny w metabolizmie komórkowym mikrosporydiów – metioninę aminopeptydazy typu II [3, 14, 23, 24]. Lek jest wysoce skuteczny w leczeniu zarażeń *E. bieneusi*, lecz u niektórych pacjentów może wywoływać neutropenię i trombocytopenię [2, 17]. Półsyntetyczna pochodna fumagilinu TNP-470 (AGM-1470) jest także skuteczna w leczeniu, ale ma mniej działań niepożądanych dla pacjenta. Fumagilin jest również stosowany miejscowo do leczenia zarażeń rogówki wywołanych przez *Encephalitozoon* spp. i *V. cornea* [68].

Oprócz wyżej wymienionych leków w leczeniu rozsia-nej mikrosporydiozy, w zależności od przebiegu choroby, stosuje się także: metronidazol, atowakwon, nifedipin, azytromycynę, furazolidon, itrakonazol, nitazoxanide, ocreotide, sinefungin i leki sulfonamidowe [2, 24, 17, 39].

U osób zarażonych wirusem HIV pomocne jest stosowanie wysoko skutecznej terapii antyretrowirusowej HAART (highly active antiretroviral therapy). Obniża ona wirulencję wirusa, jednocześnie powodując wzrost liczby limfocytów T CD4+. W konsekwencji dochodzi do zmniejszenia częstości występowania wielu zakażeń oportunistycznych, w tym mikrosporydiozy [11, 17, 38].

12. Podsumowanie

Na świecie wzrasta liczba zachorowań na mikrosporydiozę u osób o różnym statusie immunologicznym, zwiększa się także liczba gatunków zdolnych do wywołania inwazji u człowieka. Jak dotąd słabo są poznane drogi zarażenia tą grupą patogenów, choć przyjmuje się, że woda stanowi najczęstsze źródło pasożytów. Dodatkowo diagnostyka mikrosporydiów i leczenie zarażeń, szczególnie wieloukładowych, może stwarzać duże problemy nawet dla specjalistów. Przyczyniają się do tego niewielkie rozmiary mikrosporydiów, niespecyficzne objawy chorobowe oraz brak szeroko dostępnych testów diagnostycznych. Zdobywanie nowej wiedzy o mikrosporydiach, szczególnie w zakresie danych epidemiologicznych i środowiskowych, pozwoli lepiej kontrolować skażenie środowiska sporami i wpłynie na poszerzenie wiedzy o tych mikroorganizmach.

Piśmiennictwo

1. 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.: *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**, 848–855 (2005)
2. Anane S., Attouchi H.: Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **34**, 450–464 (2010)
3. Ashton N., Wirasinha P.A.: Encephalitozoonosis (nosematosis) of the cornea. *Br. J. Ophthalmol.* **57**, 669–674 (1973)
4. Bajer A., Bednarska M., Siński E.: *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. - environmental studies in Poland. *Wiad. Parazytol.* **55**, 301–304 (2009) [Article in Polish]
5. Bednarska M., Bajer A., Graczyk T.K., Siński E.: Opportunistic parasites in immunocompetent and immunodeficient patients with diarrhea. Pro. 3rd Int. Giardia and Cryptosporidium Conf. 2009 Oct 11–15, Orvieto, Italy. Local Organising Committee, Istituto Superiore di Sanita, Rome; Abstract P109 (2009)
6. Bednarska M., Bajer A., Welc-Fałęciak R., Samoliński B., Wolska-Kuśnierz B., Jankowska I., Graczyk T., Siński E.: Występowanie mikrosporydiów jelitowych u pacjentów z obniżoną odpornością. 50 Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej, Łódź, 2011.
7. Bergquist R., Morfeldt-Mansson L., Pehrson P.O., Petrini B., Wasserman J.: Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. *Scand. J. Infect. Dis.* **16**, 389–391 (1984)
8. Brasil P., de Lima D.B., de Paiva D.D., Lobo M.S., Sodrę F.C., Silva S.P., Villela E.V., Silva E.J., Peralta J.M., Morgado M., Moura H.: Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **42**, 299–304 (2000)
9. Cali A., Kotler D.P., Orenstein J.M.: *Septata intestinalis* n.g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 101–112 (1993)
10. Cali A., Neafie R., Weiss L.M., Ghosh K., Vergara R.B., Gupta R., Takvorian P.M.: Human vocal cord infection with the Microsporidium *Anncaliia algerae*. *Eukaryot. Microbiol.* **57**, 562–567 (2010)
11. Carr A., Marriott D., Field A., Vasak E., Cooper D.A.: Treatment of HIV-1-associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet*, **351**, 256–261 (1998)
12. Cavalier-Smith T.: A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* **73**, 203–266 (1998)
13. Chabchoub N., Abdelmalek R., Mellouli F., Kanoun F., Thellier M., Bouratbine A., Aoun K.: Genetic identification of intestinal microsporidia species in immunocompromised patients in Tunisia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 24–27 (2009)
14. Champion L., Durrbach A., Lang P., Delahousse M., Chauvet C., Sarfati C., Glotz D., Molina J.M.: Fumagillin for treatment of intestinal microsporidiosis in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **10**, 1925–1930 (2010)
15. Cotte L., Rabodonirina M., Chapuis F., Bailly F., Bissuel F., Raynal C., Gelas P., Persat F., Piens M.A., Trepo C.: Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **180**, 2003–2008 (1999)
16. Cotte L., Rabodonirina M.L., Radenne S., Besada E., Trepo C.: Microsporidiosis and Transplantation: a retrospective study of 23 cases. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50** (Suppl), 583 (2003)

17. Contreas C.N., Berlin O.G., Ash L.R., Pruthi J.S.: Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**, 121–127 (2000)
18. Decraene V., Lebbad M., Botero-Kleiven S., Gustavsson A.M., Löfdahl M.: First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiol. Infect.* **140**, 519–527 (2012)
19. Dengiel B., Zahler M., Hermanns W., Heinritzi K., Spillmann T., Thomschke A., Löscher T., Gothe R., Rinder H.: Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4495–4499 (2001)
20. Desportes I., le Charpentier Y., Galian, A., Bernard F., Cochand-Priollet B., Lavergne A., Ravisse P., Modigliani R.: Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g.,n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.* **32**, 250–254 (1985)
21. Didier E.S., J.A., Shadduck i wsp.: Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n.sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.* **163**, 617–621 (1991)
22. Didier E.: Microsporidiosis and HIV. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **24**, 290–292 (2000)
23. Didier E.S., Stovall M.E., Green L.C., Brindley P.J., Sestak K., Didier P.J.: Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.* **126**, 145–166 (2004)
24. Didier E.S.: Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals *Acta Tropica*, **94**, 61–76 (2005)
25. Ditrich O., Chrđle A., Sak B., Chmelík V., Kubále J., Dyková I., Kvác M.: *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2769–2771 (2011)
26. Dong S., Shen Z., Xu L., Zhu F.: Sequence and phylogenetic analysis of SSU rRNA gene of five microsporidia. *Curr. Microbiol.* **60**, 30–37 (2010)
27. Dowd S.E., Gerba C.P., Kamper M., Pepper I.L.: Evaluation of methodologies including immunofluorescent assay (IFA) and the polymerase chain reaction (PCR) for detection of human pathogenic microsporidia in water. *J. Microbiol. Methods*, **35**, 43–52 (1999)
28. Dworkin M.S., T.R. Navin i wsp.: Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus infected patients with diarrhea in major united states cities. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **49**, 339–342 (2007)
29. Espern A., F. Gay-Andrieu i wsp.: Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2999–3002 (2007)
30. Field A.S., Marriott D.J., Milliken S.T., Brew B.J., Canning E.U., Kench J.G., Darveniza P., Harkness J.L.: Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2803–2811 (1996)
31. Franzen C., Müller A.: Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* **12**, 243–285 (1999)
32. Franzen C., Müller A.: Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect.* **3**, 389–400 (2001)
33. Franzen C.: Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends Parasitol.* **20**, 275–279 (2004)
34. Franzen C.: Microsporidia: a review of 150 years of research. *Open Parasitol. J.* **2**, 1–34 (2008)
35. Galvan A.L., Martín Sanchez A.M., Perez Valentín M.A., Henriques-Gil N., Izquierdo F., Fenoy S., del Aguila C.: First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1301–1306 (2011)
36. Garcia LS.: Laboratory identification of the microsporidia. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1892–1901 (2002)
37. Ghosh K., Weiss L.M.: Molecular diagnostic tests for microsporidia *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009: Doi:10.1155/2009/926521.
38. Goguel J., Katlama C., Sarfati C., Maslo C., Lepout C., Molina J.M.: Remission of AIDS-associated intestinal microsporidiosis with highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, **11**, 1658–1659 (1997)
39. Gross U.: Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitol. Res.* **90** (Suppl. 1), S14–S18 (2003)
40. Hartskeerl R.A., Van Gool T., Schuitema A.R., Didier E.S., Terpstra W.J.: Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology*, **110**, 277–285 (1995)
41. Hutin Y.J., Sombardier M.N., Liguory O., Sarfati C., Derouin F., Modai J., Molina J.M.: Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J. Infect. Dis.* **178**, 904–907 (1998)
42. Hoffman R.M., Wolk D.M., Spencer S.K., Borchardt M.A.: Development of a method for the detection of waterborne microsporidia. *J. Microbiol. Methods*, **70**, 312–318 (2007)
43. Jędrzejewski S., Graczyk T.K., Słodkiewicz-Kowalska A., Tamang L., Majewska A.C.: Quantitative Assessment of Contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4071–4073 (2007)
44. Kaneshiro E.S., Cushion M.T., Marciano-Cabral F., Weiss L.M., Xiao L.: Highlights and summaries of the 11th International Workshops on Opportunistic Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **58**, 1–6 (2011)
45. Kasicková D., Sak B., Kvác M., Ditrich O.: Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet. Parasitol.* **165**, 125–130 (2009)
46. Keeling, P.J., Luker, M.A., Palmer, J.D.: Evidence from beta tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 23–31 (2000)
47. Keeling P.J., Fast N.M.: Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 93–116 (2002)
48. Keeling P.: Five Questions about Microsporidia. *PLoS Pathog.* **5**(9): e1000489. doi:10.1371/journal.ppat.1000489 (2009)
49. Keeling P.J., Corradi N.: Shrink it or lose it: balancing loss of function with shrinking genomes in the microsporidia. *Virulence*, **2**, 67–70 (2011)
50. Lanternier F., Lortholary O. i wsp.: Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two *Enterocytozoon bieneusi* cases and review. *Transpl. Infect. Dis.* **11**, 83–88 (2009)
51. Lee S.C., Corradi N., Byrnes E.J. 3rd, Torres-Martinez S., Dietrich F.S., Keeling P.J., Heitman J.: Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr. Biol.* **18**, 1675–1679 (2008)
52. Levaditi C., Nicolau S., Schoen R.: L'agent 'étiologique de l'encéphalite' épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *C.R. Acad. Sci. Biol.* **89**, 984–986. (1923)
53. Lores B., Lopez-Miragaya I., Arias, C., Fenoy S., Torres, J., del Aguila C.: Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 918–921 (2002)
54. Mathis A., Weber R., Deplazes P.: Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 423–45 (2005)

55. Matsubayashi H., Koike T., Mikata I., Takei H., Hagiwara S.: A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *A.M.A. Arch. Pathol.* **67**, 181–187 (1959)
56. McInnes E.F., Stewart C.G.: The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **62**, 51–54 (1991)
57. Menotti J., Cassinat B., Porcher R., Sarfati C., Derouin F., Molina J.M.: Development of a real-time polymerase-chain-reaction assay for quantitative detection of *Enterocytozoon bieneusi* DNA in stool specimens from immunocompromised patients with intestinal microsporidiosis. *J. Infect. Dis.* **187**, 1469–1474 (2003)
58. Metenier G., Vivares Ch.P.: Molecular characteristics and physiology of microsporidia *Microbes Infect.* **3**, 407–441 (2001)
59. Müller A., Bialek R., Kämper A., Fätkenheuer G., Salzberger B., Franzen C.: Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1630–1632 (2001)
60. Nkinin S.W., Asonganyi T., Didier E.S., Kaneshiro E.S.: Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2841–2846 (2007)
61. Notermans D.W., Peek R., de Jong M.D., Wentink-Bonnema E.M., Boom R., van Gool T.: Detection and identification of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* species in stool and urine specimens by PCR and differential hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 610–614 (2005)
62. Pinnolis M., Egbert P.R., Font R.L., Winter F.C.: Nosesmatosis of the cornea. Case report, including electron microscopic studies. *Arch. Ophthalmol.* **99**, 1044–1047 (1981)
63. Sak B., Kváč M., Hanzlíková D., Cama V.: First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* **153**, 220–224 (2008)
64. Sak B., Kucerova Z., Kvac M., Kvetonova D., Rost M., Secor E.W.: Seropositivity for *Enterocytozoon bieneusi*, Czech Republic. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 335–337 (2010)
65. Sak B., Brady D., Pelikánová M., Květoňová D., Rost M., Kostka M., Tolarová V., Hůzová Z., Kváč M.: Unapparent microsporidian infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1064–1070 (2011)
66. Sak B., Kváč M., Květoňová D., Albrecht T., Piálek J.: The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European House Mice (*Mus musculus musculus*) and West-European House Mice (*M.m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic–Germany border. *Vet. Parasitol.* **178**, 246–250 (2011)
67. Samie A., Obi C.L., Tzipori S., Weiss L.M., Guerrant R.L.: Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **101**, 547–554 (2007)
68. Santín M., Fayer R.: Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res. Vet. Sci.* **90**, 363–371 (2011)
69. Sharma S., Das S., Joseph J., Vemuganti G.K., Murthy S.: Microsporidian keratitis: need for increased awareness. *Surv. Ophthalmol.* **56**, 1–22 (2011)
70. Sheikh R.A., Prindiville T.P., Yenamandra S., Munn R.J., Ruebner B.H.: Microsporidian AIDS cholangiopathy due to *Encephalitozoon intestinalis*: case report and review. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 2364–2371 (2000)
71. Ślodka-wicz-Kowalska A., Graczyk T.K., Tamang L., Jędrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A.S., Majewska A.C.: Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4540–4544 (2006)
72. Ślodka-wicz-Kowalska A., Graczyk T.K., Tamang L., Girouard A.S.: Asymptomatic *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in captive mammals. *Parasitol Res.* **100**, 505–509 (2007)
73. Ślodka-wicz-Kowalska A., Zaremba-Drobnik D., Czekalski S., Majewska A.C.: Occurrence of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. cuniculi* of haemodialysis patients [in Polish]. Proceedings of the 22nd Polish Parasitological Society; 2010 Sep 1–3; Puławy, Poland. National Veterinary Research Institute; PIWet-PIB; Abstract U4–3; (2010)
74. Sokolova O.I., Demyanov A.V., Bowers L.C., Didier E.S., Yakovlev A.V., Skarlato S.O., Sokolova Y.Y.: Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* **49**; 2102–2108 (2011)
75. Sprague V., Becnel J.J., Hazard E.L.: Taxonomy of phylum microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 285–395 (1992)
76. Stark D., van Hal S., Barratt J., Ellis J., Marriott D., Harkness J.: Limited genetic diversity among genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from HIV-infected patients from Sydney, Australia. *J. Med. Microbiol.* **58**, 355–357 (2009)
77. Nkinin S.W., Asonganyi T., Didier E.S., Kaneshiro E.S.: Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2841–2846 (2007)
78. Sulaiman I.M., Fayer R., Yang C., Santin M., Matos O., Xiao L.: Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitol Res.* **92**, 328–334 (2004)
79. Sulaiman I.M., Matos O., Lobo M.L., Xiao L.: Identification of a new microsporidian parasite related to *Vittaforma corneae* in HIV-positive and HIV-negative patients from Portugal. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50** (Suppl) 586–590 (2003)
80. Sulaiman I.M., Fayer R., Lal A.A., Trout J.M., Schaefer F.W. 3rd, Xiao L.: 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 (2003)
81. Teachey D.T., Russo P., Orenstein J.M., Didier E.S., Bowers C., Bunin N.: Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation *Bone Marrow Transplant.* **33**, 299–302 (2004)
82. Thomarat F., Vivares C.P., Gouy M.: Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J. Mol. Evol.* **59**, 780–791 (2004)
83. Tuli L., Gulati A.K., Sundar S., Mohapatra T.M.: Correlation between CD4 counts of HIV patients and enteric protozoan in different seasons – an experience of a tertiary care hospital in Varanasi (India). *BMC Gastroenterol.* **20**, 8:36 (2008)
84. Tumwine J.K., Kekitiinwa A., Nabukeera N., Akiyoshi D.E., Buckholt M.A., Tzipori S.: *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**, 299–303 (2002)
85. Valperga S.M., de Jogna Prat S.A., de Valperga G.J., Lazarte S.G., de Trejo A.V., Diaz N., Huttman H.M.: Microsporidian spores in the stool specimens of toddlers, with or without diarrhea, from Tucuman, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **31**, 157–164 (1999)
86. Vavra J., Undeen A.H.: *Nosema algerae* n. sp. (Cnidospora, Microsporida) a pathogen in a laboratory colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). *J. Protozool.* **17**, 240–249 (1970)
87. Vavra J., Yachnis A.T., Shadduck J.A., Orenstein J.M.: Microsporidia of the genus *Trachipleistophora*—causative agents of human microsporidiosis: description of *Trachipleistophora anthropophthera* n. sp. (Protozoa: Microsporida). *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 273–283 (1998)

88. Vivares C.P., Gouy M., Thoarat F., Metenier G.: Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 499–505 (2002)
89. Vossbrinck C.R., Woese C.R.: Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature*, **320**, 287–288 (1986)
90. Vossbrinck C.R., Maddox J.V., Friedman S., Debrunner-Vossbrinck B.A., Woese C.R.: Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, **326**, 411–414 (1987)
91. Vossbrinck C.R., Debrunner-Vossbrinck B.A.: Molecular phylogeny of the microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol. (Praha)*, **52**, 131–142 (2005)
92. Weber R., Bryan, R.T., Schwartz D.A., Owen R.L.: Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 426–461 (1994)
93. Weiss L.M., Edlind T.D., Vossbrinck C.R., Hashimoto T.: Microsporidian molecular phylogeny: the fungal connection. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**, 17S–18S (1999)
94. Weiss L.M.: Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop.* **78**, 89–102 (2001)
95. Wichro E., Hoelzl D., Krause R., Bertha G., Reinthaler F., Wenisch C.: Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**, 285–287 (2005)
96. Wittner M.: Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. (w) Wittner M., Weiss L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, 1999, str. 1–6.
97. Wolska-Kuśnierz B., Bajer A., Caccio S., Heropolitańska-Pliszka E., Bernatowska E., van Dongen J., Bednarska M., Paziewska A., Siński E.: Particular susceptibility to *Cryptosporidium* infection in patients with primary immunodeficiency syndromes. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **45**, 458–164 (2007)
98. Xu Y., Weiss L.M.: The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *Int J. Parasitol.* **35**, 941–953 (2005)
99. Yachnis A.T., Berg J., Martinez-Salazar A., Bender B.S., Diaz L., Rojiani A.M., Eskin T.A., Orenstein J.M.: 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 (1996)

Badania częściowo finansowane przez MNiSW grant nr 404 101036