

## LABORATORYJNA DIAGNOSTYKA MIKROSPORYDIOZY U LUDZI

ANNA SŁODKOWICZ-KOWALSKA

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań; E-mail: aslodk@amp.edu.pl

**ABSTRACT. Laboratory diagnostics of human microsporidiosis.** There are many techniques available for the identification of microsporidia in clinical specimens. Chromotrope 2R, calcofluor white M2R and FISH technique have all been reported to be useful as selective methods for microsporidia in stool specimens and in body fluids. Microsporidia in histologic tissue preparations have also been visualized with Giemsa, hematoxylin and eosin stain, Brown-Hopps stain or Warthin-Starry staining. Microsporidia can also be identified by using tests for detecting IgG and IgM antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* such as the indirect fluorescent antibody (IFA) method and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Transmission electron microscopy (EM) is not readily available. PCR testing of clinical specimens may be helpful in diagnosing the infection. The development of molecular techniques carries the promise of greatly increased diagnostic sensitivity and specificity, as well as provide a tool for use in epidemiological studies.

**Key words:** diagnostics, human microsporidiosis.

Mikrosporydia są wewnątrzkomórkowymi obligatoryjnymi pasożytniczymi pierwotniakami. Są bardzo ciekawą grupą organizmów, należą do Eukariota, ale jednocześnie posiadają wiele cytologicznych i molekularnych cech przypominających Prokariota. Mikrosporydia pasożytują u wielu gatunków bezkręgowców i kręgowców, włączając człowieka (Weber i wsp. 1994, Didier i wsp. 1998, Alfa-Cisse i wsp. 2002). Dotychczas opisano 143 rodzaje i ponad 1200 gatunków i stale dokonywane są rewizje taksonomiczne.

Mikrosporydia są ważnymi oportunistycznymi patogenami, wykrywanymi głównie u osób zakażonych HIV, jak i u osób z nieprawidłowo działającym układem immunologicznym (Shadduck i Greeley 1989, Rabodonirina i wsp. 1996, Cislakova i Halanova 2003). W ostatnim czasie odnotowuje się również przypadki mikrosporydiozy u osób po transplantacji, u osób powracających z tropiku, a także u osób immunokompetentnych (Franzen i wsp. 1996, Liguory i wsp. 2001, Svethem i wsp. 2002, Gamboa-Dominiguez i wsp. 2003). Prawdopodobnie mikrosporydia stanowią naturalną parazytofaunę człowieka, a obniżenie odporności sprzyja ujawnieniu się objawów klinicznych (Canning i Hollister 1992). U człowieka stwierdzono występowanie kilkunastu gatunków mikrosporydiów z rodzaju *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Nosema*, *Brachiola*

i *Vittaforma*. Ponadto, opisano mikrosporydia o nieustalonej jeszcze przynależności taksonomicznej, określane ogólnie jako *Microsporidium*.

Postacią inwazyjną mikrosporydiów jest spora, posiadająca chitynową otoczkę wewnętrzną zapewniającą jej dużą oporność na działanie czynników środowiska zewnętrznego. Mikrosporydia charakteryzują się bardzo ciekawym mechanizmem wnikania do komórki żywiciela. Sporoplazma dostaje się do wnętrza komórki żywiciela poprzez nić biegunową, która jest gwałtownie wypychana ze spory. Zараżenie nowej komórki trwa niecałe dwie sekundy. Wewnątrz komórki żywiciela pasożyt rozmnaża się przez podział komórki (*Encephalitozoon*, *Nosema*, *Vittaforma*) lub wielokrotną kariokinezę bez cytokinezy, co prowadzi do powstania wielojądrowych komórek (*Enterocytozoon*, *Brachiola*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*). Następnie mikrosporydia ulegają sporogonii, której ostatecznym etapem jest wytworzenie spor. Uwolnienie spor następuje po rozerwaniu błony komórkowej, poprzez całkowite wypełnienie komórki żywiciela licznymi sporami. Spory mogą więc zarażać nowe komórki żywiciela lub wydostawać się do środowiska zewnętrznego wraz z wydalinami bądź wydzielinami żywiciela, lub też wskutek rozpadu po śmierci żywiciela.

Spory mikrosporydiów w wilgotnym środowisku pozostają inwazyjne nawet przez 10 lat, co sprawia, że narażenie człowieka na kontakt z nimi jest nieuniknione (Svedhem i wsp. 2002). Najczęściej do zarażenia dochodzi na drodze fekalno-oralnej, moczowo-oralnej lub inhalacyjnej. Spożywanie suszy i półsurowych ryb może być również przyczyną zarażenia. Ponadto, mikrosporydia mogą dostawać się do organizmu żywiciela poprzez uszkodzoną skórę, naskórek lub ukłucia komarów. Sądzi się, że występowanie jelitowej mikrosporydiozy u ludzi ma związek z piciem niefiltrowanej wody wodociągowej i studziennej oraz kąpielą w różnego typu zbiornikach rekreacyjnych. Znana jest także wodnopoходna epidemia mikrosporydiozy, która miała miejsce kilka lat temu we Francji i objęła około 200 osób, pijących wodę wodociągową zasilaną z tego samego systemu dystrybucji (Cotte i wsp. 1999).

Mikrosporydiozę u człowieka opisano po raz pierwszy ponad 40 lat temu (Mat-subayashi i wsp. 1959) i jak dotąd znanych jest około dwóch tysięcy przypadków stwierdzonych głównie u osób HIV pozytywnych. Rzadkie wykrywanie mikrosporydiów u ludzi wynika przede wszystkim z niedoskonałych metod diagnostycznych, jak również z braku wiedzy lekarzy o istnieniu tych groźnych patogenów (Weber i wsp. 1994). Wiele gatunków mikrosporydiów charakteryzuje się szeroką specyficnością tkankową, zatem materiał wykorzystywany do diagnostyki jest zróżnicowany. U człowieka stwierdza się je niemal we wszystkich tkankach, a objawy kliniczne są bardzo różne i zależą od gatunku mikrosporydium, miejsca występowania, intensywności zarażenia i od stanu immunologicznego żywiciela (Orenstein 2003). Do najczęściej rozpoznawanych postaci klinicznych należy mikrosporydioza jelitowa, oczna i rozsiana. Również zapalenie zatok jest częstym objawem mi-

krosporydiozy u ludzi (Orenstein 1991, Wasson i Peper 2000). Mimo, iż znane są skuteczne leki (albendazol czy fumagilin) stosowane w leczeniu mikrosporydiozy wywołanej przez pierwotniaki z rodzaju *Encephalitozoon*, *Vittaforma*, *Brachiola*, to jednak w wielu przypadkach inwazja kończy się zgonem. Ponadto, najczęściej stwierdzany u ludzi gatunek – *E. bieneusi* – jest niewrażliwy na leki stosowane w terapii mikrosporydiozy (Molina i wsp. 2002, Gross 2003).

Rozpoznawanie mikrosporydiozy u ludzi polega na wykrywaniu spor w wydalinach, wydzielinach, płynach ustrojowych, jak również w materiale biopsyjnym.

Znanych jest wiele metod służących do wykrywania mikrosporydiów. W diagnostyce mikrosporydiozy u ludzi stosuje się metody mikroskopowe (mikroskopia świetlna i elektronowa), immunologiczne, molekularne oraz hodowle *in vitro*. Każda z tych metod ma swoje zalety, jak i wady (Garcia 2002).

### Mikroskopia świetlna

Podstawową metodą służącą do wykrywania mikrosporydiów jest badanie mikroskopowe. Rutynowe metody barwienia są jednak nieprzydatne w diagnostyce mikrosporydiozy, dlatego stosuje się specyficzne metody barwienia. Do mikroskopii świetlnej wykorzystuje się świeże próby kału i moczu lub utrwalone w 5% albo 10% formalinie, 2,5% roztworze dwuchromianu potasu, MIF, SAF, PVA. Powinno się wykonywać cienkie rozmazy, a w przypadku, gdy materiałem jest kał, należy przed wykonaniem rozmazu wymieszać go z 10% roztworem KOH (1:1), co zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia spor mikrosporydiów (Carter i wsp. 1996). Ponadto zaleca się, aby obecność mikrosporydiów w badanej próbce, głównie gdy materiałem badawczym jest kał, była potwierdzona przez co najmniej dwie metody diagnostyczne. Ze względu na małe rozmiary spor preparaty należy przeglądać w mikroskopie świetlnym stosując tysiąckrotne powiększenie. Jeżeli materiałem diagnostycznym jest kał, mocz lub płwocina najczęściej wykorzystuje się barwienie chromotropem, metodą Giemsy czy chemofluorescencją. Gdy próbą badaną jest materiał cytologiczny dodatkowo stosuje się barwienie metodą Grama. Natomiast do wykrywania mikrosporydiów w materiałach biopsyjnych stosuje się oprócz barwienia chromotropem, Giemszą, także barwienie hematoksyliną i eozyną, barwienie PAS (Periodic-Acid-Schiff), barwienie zmodyfikowaną metodą Grama (Brown-Brenn, Brown-Hopps) oraz barwienie Warthin-Starry. W przypadku preparatów histologicznych nie zaleca się stosowania barwników fluorescencyjnych (Schwartz i wsp. 1996).

Najczęściej stosowaną w laboratoriach metodą jest barwienie chromotropem, opracowane przez Webera i współpracowników (1994). Barwienie to przeprowadza się w temperaturze pokojowej i trwa ono ponad 90 minut. Z piśmiennictwa wynika, iż wielu autorów wprowadziło szereg modyfikacji do tej metody. Zmiany te polegają przede wszystkim na skracaniu czasu barwienia. Barwienie w 50°C przez 10

minut (Kokoskin i wsp. 1994), w 37°C przez 30 minut (Didier i wsp. 1995) lub w 55°C przez 1 minutę (Moura i wsp. 1997) poprawia efektywność wykrywania spor mikrosporydiów, ponieważ mniej artefaktów, jak i innych organizmów obecnych w badanej próbce ulegnie wybarwieniu (Ryan i wsp. 1993).

Tabela 1. Wielkość spor mikrosporydiów występujących u ludzi

Gatunek	Wielkość spor ( $\mu\text{m}$ )
<i>Enterocytozoon bienewsi</i>	1,1-1,6 $\times$ 0,7-1,0
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	2,0-2,5 $\times$ 1,0-1,5
<i>Encephalitozoon hellem</i>	2,0-2,5 $\times$ 1,0-1,5
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	2,0-2,5 $\times$ 1,0-1,5
<i>Pleistophora</i> sp.	3,0-4,0 $\times$ 2,0-2,8
<i>Trachipleistophora hominis</i>	3,0-4,0 $\times$ 2,0-2,8
<i>Trachipleistophora anthropophora</i>	3,0-4,0 $\times$ 2,0-2,8
<i>Brachiola vesicularum</i>	2,9 $\times$ 2,0
<i>Brachiola connori</i>	4,0-4,5 $\times$ 2,0-2,5
<i>Brachiola algerae</i>	2,0-2,5 $\times$ 4,0-4,5
<i>Nosema ocularum</i>	5,0 $\times$ 3,0
<i>Vittaforma corneae</i>	3,7 $\times$ 1,0
<i>Microsporidium ceylonensis</i> *	3,5 $\times$ 1,5
<i>Microsporidium africanum</i> *	3,5 $\times$ 1,5
<i>Microsporidium africanum</i> *	4,5 $\times$ 1,5

Objaśnienia: \* – mikrosporydia o nieustalonej randze taksonomicznej

Spory mikrosporydiów rozpoznaje się na podstawie wielkości, zabarwienia i obecności charakterystycznych wewnętrznych struktur. Jednak mikrosporydia występujące u ludzi są trudne w identyfikacji, ponieważ spory charakteryzują się małą wielkością (Tabela 1) i zmiennością wybarwienia. Spory przybierają zabarwienie od jasnoróżowego koloru po czerwony. W zależności od typu barwienia, tło wybarwia się na kolor jasnoszary, zielony lub niebieski. Należy jednak pamiętać, że oprócz mikrosporydiów, w preparatach mogą również wybarwiać się bakterie, jak i większość grzybów. Rozróżnienie spor mikrosporydiów od tych organizmów i od artefaktów opiera się na charakterystycznych horyzontalnych lub diagonalnych przejaśnieniach widocznych wewnątrz spor. Niestety, metody mikroskopowe mają niewielką czułość, rozpoznawanie jest możliwe jeśli liczba spor jest bardzo duża ( $10^4$ - $10^6$  spor/g). Kolejną wadą tych metod są trudności w rozróżnieniu spor mikrosporydiów od bakterii i grzybów, toteż osoba diagnozująca te pasożyty powinna posiadać duże doświadczenie. Ponadto, metody mikroskopowe nie pozwalają na identyfikację gatunku mikrosporydium.

## Barwniki fluorescencyjne

Oprócz najczęściej stosowanej metody wykrywania mikrosporydiów opartej na bazie chromotropu, bardzo często w laboratoriach wykorzystuje się barwniki fluorescencyjne tj. Calcofluor M2R (Vavra i Chalupsky 1982, Vavra i wsp. 1993), Sytox-Green, Fungi-Fluor, Cellufluor (Luna i wsp. 1995), Fungiquol A (De Girolami i wsp. 1995) lub Uvitex 2B (van Gool i wsp. 1993). W diagnostyce mikrosporydiozy najczęściej wykorzystywany jest Calcofluor M2R; przy zastosowaniu filtra o długości fali 395-415 nm spory fluoryzują na kolor niebieskobiały, a ich chitynowe otoczki świecą na kolor turkusowy. Mimo dużej czułości, barwienie to jest jednak mało specyficzne, ponieważ większość małych grzybów, bakterii i artefaktów zawartych w badanej próbce może również fluoryzować (Ryan i wsp. 1993, Kokoskin i wsp. 1994, Didier i wsp. 1995, Moura i wsp. 1997). Spory mikrosporydiów różni się od tych elementów na podstawie kształtu i budowy. Specyficzność tej metody rośnie w przypadku badania płynów ustrojowych (Luna i wsp. 1995). Zastosowanie barwników fluorescencyjnych, wykorzystywanych w diagnostyce mikrosporydiozy, jest metodą szybką i mało pracochłonną. Jednak laboratorium musi być wyposażone w mikroskop immunofluorescencyjny z odpowiednim filtrem. Ponadto, dodatni wynik uzyskany na podstawie chemofluorescencji powinien być zawsze potwierdzony barwieniem chromotropem, co zwiększa koszty badania i czasochłonność (Didier i wsp. 1995). Ignatius ze współpracownikami (1997) porównywali pod względem czułości i specyficzności obie metody wykorzystywane w diagnostyce mikrosporydiozy: barwienie chromotropem i barwienie fluorescencyjne z wykorzystaniem Uvitex 2B. Stwierdzili oni, że równoczesne zastosowanie obu metod zwiększa szanse wykrycia mikrosporydiów w badanym materiale, szczególnie wtedy, kiedy liczba spor w badanej próbce jest niewielka. Wykazali oni również, że czułość i specyficzność obu metod znacznie wzrasta w przypadku, gdy zarażenie jest intensywne. Niestety dużą wadą stosowania barwników fluorescencyjnych jest niemożność zidentyfikowania gatunku mikrosporydium.

## Mikroskopia elektronowa

Mikroskopia elektronowa umożliwia ultrastrukturalne badanie mikrosporydiów obecnych w płynach ustrojowych, kale, jak również w preparatach histologicznych. Metoda ta wykazuje zmienną czułość w zależności od materiału badawczego. W kale i w płynach ustrojowych umożliwia jedynie wykrywanie spor mikrosporydiów, natomiast w preparatach histologicznych pozwala stwierdzić wszystkie stadia cyklu rozwojowego tych pasożytów. Mimo dużej czasochłonności, wysokich kosztów badań i niskiej czułości, mikroskopia elektronowa jest metodą wysoce zalecaną, ponieważ umożliwia identyfikację gatunku mikrosporidium (Connolly i wsp. 1991). Niestety wykorzystanie tych badań ograniczone jest wyłącznie do laboratoriów naukowych.

## Metody immunologiczne

Coraz częściej w diagnostyce mikrosporydiozy u ludzi stosuje się różne metody immunologiczne, umożliwiające wykrywanie antygenów lub przeciwciał. Dostępne testy immunofluorescencyjne z wykorzystaniem surowic zawierających przeciwciała poliklonalne i monoklonalne stosuje się głównie do wykrywania antygenów mikrosporydiów z rodzaju *Encephalitozoon* (Aldras i wsp. 1994, Croppo i wsp. 1998, Moura i wsp. 1999). W porównaniu do barwienia chromotropem i barwnikami fluorescencyjnymi, metody te charakteryzują się niską swoistością, ponieważ stwierdzono występowanie reakcji krzyżowych z grzybami, bakteriami oraz z innymi gatunkami mikrosporydiów (Hollister i Canning 1987, Langley i wsp. 1987, Weiss i wsp. 1992, Garcia i wsp. 1994, Didier i wsp. 1995). Jak dotąd testy immunologiczne, służące do wykrywania antygenów spor, stosuje się głównie w przypadku mikrosporydiów lokalizujących się w gałce ocznej, zatokach i w układzie moczowym. Ze względu na brak komercyjnych zestawów do wykrywania mikrosporydiozy u ludzi, metody te wykorzystywane są jedynie w laboratoriach badawczych.

W diagnostyce mikrosporydiozy stosowane są również testy serologiczne umożliwiające wykrywanie przeciwciał przeciw gatunkom z rodzaju *Encephalitozoon*. Jednak czułość i swoistość tych testów nie jest do końca wyjaśniona (Enriquez i wsp. 1998, Kucerova-Pospisilova i Ditrach 1998). Istotną wadą jest również fakt, że stwierdzenie miana przeciwciał nie zawsze świadczy o aktualnej infekcji. Ponadto, wykrycie specyficznych przeciwciał w surowicy krwi jest mało przydatne w diagnostyce mikrosporydiozy u osób z obniżoną odpornością, które stanowią grupę wysokiego ryzyka.

## Metody hodowli *in vitro*

Obecnie istnieje możliwość prowadzenia hodowli *in vitro* większości patogenicznych dla człowieka gatunków mikrosporydiów tj. *V. corneae*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* i *Trachipleistophora hominis* (Shadduck 1969, Shadduck i wsp. 1990, van Gool i wsp. 1994, Visvesvara i wsp. 1994, Visvesvara i wsp. 1995, Field i wsp. 1996). Utrzymanie tych patogenów w odpowiednio dobranych hodowlach tkankowych, pochodzących z linii komórkowych np. nerek małp i królików (Vero i RK-13) lub fibroblastów płuc ludzkich (MRC-5), trwa od trzech do sześciu tygodni. Visvesvara ze współpracownikami (1995) opisali również krótkoterminową hodowlę *E. bieneusi*, prowadzoną na linii komórkowej nerek małp i fibroblastów płuc ludzkich. Jednak ze względu na skomplikowaną procedurę, hodowle *in vitro* stosowane są wyłącznie w laboratoriach naukowych. Ponadto, dużą wadą metod hodowlanych jest długi czas oczekiwania na wynik. Z drugiej strony jednak, istotną zaletą metod hodowlanych jest możliwość namnożenia mikrosporydiów, co

umożliwia poznanie wielu nowych aspektów biologii tych pierwotniaków, zbadanie relacji pomiędzy mikrosporydiami, a komórkami żywiciela. Hodowle *in vitro* mogą być także przydatne w produkcji antygenów, które mogą służyć do wykrywania przeciwciał w surowicy pacjentów.

### Modele zwierzęce

W diagnostyce mikrosporydiozy wykorzystuje się również różne modele zwierzęce tj. króliki, bezgrasicze myszy BALB/c i C57B1/6, świnię i makaki zakażone wirusem SIV. Stanowią one podstawę do badań nad odpowiedzią immunologiczną zarażonego żywiciela, a także do oceny metod diagnostycznych, skuteczności zastosowanego leczenia oraz dróg transmisji pasożyta. Jednak wykorzystanie zwierząt doświadczalnych w diagnostyce mikrosporydiozy jest mało przydatne i praktyczne, głównie ze względu na długi okres oczekiwania na wynik i na wzrost kosztów badań (Snowden i wsp. 1998).

### Metody molekularne

W ostatnich latach obserwuje się coraz powszechniejsze wykorzystanie technik biologii molekularnej w parazytologii. Opisano wiele gatunkowo swoistych starterów, metod ekstrakcji DNA, protokołów PCR i wewnętrznego PCR, oraz innych technik biologii molekularnej, umożliwiających identyfikację gatunku lub genotypu mikrosporydiów, zarówno w próbach klinicznych, jak i środowiskowych (Casper i Müller 1999). PCR jest metodą szybką, czułą i wysoce swoistą, umożliwiającą wykrycie patogenu w badanej próbce. Metody molekularne stosowane są przy niskiej intensywności zarażenia, ponieważ pozwalają wykryć DNA określonego gatunku mikrosporydium nawet wtedy, kiedy w próbce badanej znajduje się mała liczba spor ( $10^2$  spor/g). Oprócz wysokich kosztów, wadą tej metody jest niemożność rozróżnienia w badanej próbce patogenu żywego od martwego. Niestety, techniki molekularne stosowane są jedynie w laboratoriach naukowych (Visvesvara i wsp. 1994, Federko i wsp. 1995).

W ostatnim czasie w diagnostyce *E. intestinalis*, *E. cuniculi* i *E. hellem* coraz częściej stosuje się technikę FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization). Technika ta polega na wykorzystaniu fluorescencyjnie znakowanych oligonukleotydów hybridyzujących z gatunkowo specyficznymi fragmentami 16S rRNA pasożyta. Laboratorium powinno być jednak wyposażone w mikroskop immunofluorescencyjny z odpowiednim filtrem. Ze względu na stosowanie unikalnych fluorochromów do znakowania sond, rozróżnienie gatunków opiera się na podstawie charakterystycznej barwy spor mikrosporydiów. Przy zastosowaniu filtra emitującego falę o długości 450-490 nm spory *E. intestinalis*, *E. cuniculi* i *E. hellem* fluoryzują odpowiednio

na kolor czerwony, niebieski i zielony (Hester i wsp. 2000, Graczyk i wsp. 2002). FISH umożliwia określenie nie tylko gatunku mikrosporydium, ale również pozwala odróżnić spory żywe od martwych, co jest przydatne do określenia inwazyjności pasożyta. Metoda ta, mimo swojej czasochłonności, jest wysoce czuła i specyficzna, a zatem może być wykorzystywana w laboratoriach diagnostycznych, tym bardziej, że nie jest to metoda zbyt skomplikowana.

Należy sądzić, że bardziej powszechne wykorzystanie technik biologii molekularnej (FISH, PCR) zwiększy w najbliższym czasie liczbę wykrytych przypadków mikrosporydiozy, zarówno u osób z obniżoną odpornością, jak i u osób immunokompetentnych. Co więcej metody te umożliwiają określenie gatunku mikrosporydium, co jest istotne, ponieważ pozwala na lepsze prowadzenie pacjenta. Gatunki mikrosporydiów różnią się bowiem wrażliwością na działanie leków oraz zdolnością wywoływania rozsianej inwazji.

Ze względu na coraz częstsze wykrywanie mikrosporydiów u różnych gatunków zwierząt, w tym u zwierząt hodowlanych i domowych, które mogą być źródłem inwazji dla ludzi, metody biologii molekularnej stają się coraz bardziej przydatne również w dochodzeniach epidemiologicznych.

#### LITERATURA

- Aldras A.M., Orenstein J.M., Kotler D.P., Shaddock J.A., Didier E.S. 1994. Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 608-612.
- Alfa-Cisse O., Ouattara A., Thellier M., Accoceberry I., Biligui S., Minta D., Doumbo O., Desportes-Livage I., Thera M.A., Danis M., Datry A. 2002. Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali). *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1715-1718.
- Canning E.U., Hollister W.S. 1992. The importance of microsporidia as opportunistic infections in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Eukaryotic Journal of Gastroenterology and Hepatology* 4:422-427.
- Carter P.L., MacPherson D.W., McKenzie R.A., 1996. Modified technique to recover microsporidian spores in sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed fecal samples by light microscopy and correlation with transmission electron microscopy. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2670-2673.
- Caspar F., Müller A. 1999. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* 12:243-285.
- Cislakova L., Halanova M. 2003. Microsporidial infection in immunologically compromised hospitalized patients. *Epidemiologie, Microbiologie, Immunologie* 52: 81-83.
- Connolly G.M., Ellis D.S., Williams J.E., Tovey G., Gazzard B.G. 1991. Use of electron microscopy in examination of faeces and rectal and jejunal biopsy specimens. *Journal of Clinical Pathology* 44: 313-316.
- 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 person with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infectious Diseases* 180: 2003-2008.
- Croppo G.P., Visvesvara G.S., Leitch G.J., Wallace S., Schwartz D.A. 1998. Identification of the microsporidian *Encephalitozoon hellem* using immunoglobulin G monoclonal antibodies.



- Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 122: 182-186.
- De Girolami P.C., Ezratty C.R., Desai G., McCullough A., Asmuth D., Wanke C., Federman M. 1995. Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B stains. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 805-810.
- Didier E.S., Orenstein J.M., Aldras A., Bertucci D., Rogers L.B., Janney F.A. 1995. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 3138-3145.
- Didier E.S., Snowden K.F., Shadduck J.A. 1998. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Advances in Parasitology* 40: 283-320.
- Enriquez F.J., Taren D., Cruz-Lopez A., Muramoto M., Palting J.D., Cruz P. 1998. Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. *Clinical Infectious Diseases* 26: 1227-1229.
- Federko D.P., Nelson N.A., Cartwright C.P. 1995. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 1739-1741.
- Field A.D., Marriott D.J., Milliken S.T., Brew B.J., Canning E.U., Kench J.G., Darveniza P., Harkness J.L. 1996. Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2803-2811.
- Franzen C., Küppers R., Müller A., Salzberger B., Fätkenheuer G., Vetten B., Diehl V., Schrappe M. 1996. Genetic evidence for latent *Septata intestinalis* infection in human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. *Journal of Infectious Diseases* 173: 1038-1040.
- Gamboa-Dominguez A., De Anda J., Donis J., Ruiz-Maza F., Visvesvara G.S., Diliz H. 2003. Disseminated *Encephalitozoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation* 75: 1898-1900.
- Garcia L.S. 2002. Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1892-1901.
- Garcia L.S., Shimizu R.Y., Bruckner D.A. 1994. Detection of microsporidial spores in fecal specimens from patients diagnosed with cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1739-1741.
- 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 sparing their habitats in Uganda. *Parasitology Research* 88: 926-931.
- Gross U. 2003. Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitology Research* 90:14-18.
- Hester J.D., Lindquist H.D.A., Bobst A.M., Schaefer F.W. 2000. Fluorescent in situ detection of *Encephalitozoon hellem* spores with a 6-carboxyfluorescein-labeled ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probe. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47: 299-308.
- Hollister W.S., Canning E.U. 1987. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. *Parasitology* 94: 209-219.
- Ignatius R., Henschel S., Liesenfeld O., Mansmann U., Schmidt W., Koppe S., Schneider T., Heise W., Futh U., Riecken E.O., Hahn H., Ullrich R. 1997. Comparative evaluation of modified trichrome and Uvitex 2B stains for detection of low numbers of microsporidial spores in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2266-2269.
- Kokoskin E., Gyorkos T.W., Camus A., Cedilotte L., Purtill T., Ward B. 1994. Modified technique for efficient detection of microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1074-1075.
- Kucerova-Pospisilova Z., Ditrich O. 1998. The serological surveillance of several groups of patients using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E. cuniculi* antibodies to microsporidia in patients. *Folia Parasitologica* 45: 108-112.
- Langley R.C., Cali A., Somberg E.W. 1987. Two dimensional electrophoretic analysis of spore proteins of the microsporidia. *Journal of Parasitology* 73: 910-918.
- Liguory O., Sarfati C., Derouin F., Molina J.M. 2001. Evidence of different *Enterocytozoon bienewsi* genotypes in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of*

- Clinical Microbiology* 39: 2672-2674.
- Luna V.A., Stewart B.K., Bergeron D.L., Clausen C.R., Plorde J.J., Fritsche T.R. 1995. Use of the fluorochrome calcofluor white in the screening of stool specimens for spores of microsporidia. *American Journal of Clinical Pathology* 103: 656-659.
- Matsubayashi H., Koike T., Mikata T., Takei H., Hagiwaras S. 1959. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Archives of Pathology* 67: 181-187.
- Molina J.M., Tourneur M., Sarfati C., Chevret S., de Gouvello A., Gobert J., Balkan S., Derouin F. 2002. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *New England Journal of Medicine* 346: 1963-1969.
- Moura H., Schwartz D.A., Bornay-Llinares F., Sodr  F.C., Wallace S., Visvesvara G.S. 1997. A new and improved "quick-hot gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 121: 888-893.
- Moura H., Sodr  F.C., Bornay-Llinares F., Leitch G.J., Navin T., Wahlquist S., Bryan R., Meseguer I., Visvesvara G.S. 1999. Detection by an immunofluorescence test of *Encephalitozoon intestinalis* spores in routinely formalin-fixed stool samples stored at room temperature. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2317-2322.
- Orenstein J.M. 1991. Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Parasitology* 77: 843-864.
- Orenstein J.M. 2003. Diagnostic pathology of microsporidiosis. *Ultrastructural Pathology* 27:141-149.
- Rabodonirina M., Bertocchi M., Desportes-Livage I., Cotte L., Levrey H., Piens M.A., Monneret M., Celard G., Mornex J.F., Majon M. 1996. *Enterocytozoon bieneusi* as a cause of chronic diarrhea in a heart-lung transplant recipient, who was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases* 23: 114-117.
- Ryan N.J., Sutherland G., Coughlan K., Globan M., Doultree J., Marshall J., Baird R.W., Pedersen J., Dwyer B. 1993. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 3264-3269.
- Schwartz D.A., Sobottka I., Leitch G.J., Cali A., Visvesvara G.S. 1996. Pathology of microsporidiosis. Emerging parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 120: 173-188.
- Shadduck J.A. 1969. *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. *Science* 166: 516-517.
- Shadduck J.A., Greeley E. 1989. Microsporidia and human infections. *Clinical Microbiology Reviews* 2: 158-165.
- Shadduck J.A., Meccoli R.A., Davis R., Font R.L. 1990. Isolation of a microsporidian from a human patient. *Journal of Infectious Diseases* 162: 773-776.
- Snowden K.F., Didier E.S., Orenstein J.M., Shadduck J.A. 1998. Animal models of human microsporidial infections. *Laboratory Animal Science* 48: 589-592.
- Svedhem V., Lebbad M., Hedkvist B., del Aguila C., Hedman P., Larsson R., Navajas R., Aust-Kettis A. 2002. Disseminated infection with *Encephalitozoon intestinalis* in AIDS patients: report of 2 cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 34: 703-705.
- van Gool T., Canning E.U., Gilis H., van den Bergh Weerman M.A., Eeftinck Schattenkerk J.K.M., Dankert J. 1994. *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology* 109: 281-289.
- van Gool T., Snijders F., Reiss P., Eeftinck Schattenkerk J.K., van den Bergh Weerman M.A., Bartelsman J.F., Bruins J.J., Canning E.U., Dankert J. 1993. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *Journal of Clinical Pathology* 46: 694-699.
- Vavra J., Chalupsky J. 1982. Fluorescence staining of microsporidian spores with the brightener Calcofluor White M2R. *Journal of Protozoology* 29 (Suppl.): 503.

- Vavra J., Nohynkova E., Machala L., Spala J. 1993. An extremely rapid method for detection of microsporidia in biopsy materials from AIDS patients. *Folia Parasitologica* 40: 273-274.
- Visvesvara G.S., Da Silva A.J., Croppo G.P., Pieniazek N.J., Leitch G.J., Ferguson D., de Moura H., Wallace S., Slemenda S.B., Tyrrell I., Moore D.F., Meador J. 1995. In vitro culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from urine of a patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 930-936.
- Visvesvara G.S., Leitch G.J., Da Silva A.J., Croppo G.P., Moura H., Wallace S., Slemenda S.B., Schwartz D.A., Moss D., Bryan R.T., Pieniazek N.J. 1994. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 2760-2768.
- Wasson K., Peper R.L. 2000. Mammalian microsporidiosis. *Veterinary Pathology* 37: 113-128.
- Weber R., Bryan R.T., Schwartz D.A., Owen R.L. 1994. Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 426-461.
- Weiss L.M., Cali A., Levee E., LaPlace D., Tanowitz H., Simon D., Wittner M. 1992. Diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection by western blot and the use of cross-reactive antigens for the possible detection of microsporidiosis in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47: 456-462.

Zaakceptowano do druku 10 czerwca 2004