 Copyright© 2009 Polskie Towarzystwo Parazytologiczne

# Doktoraty

# Zwierzęce rezerwuary inwazyjnych dla człowieka gatunków mikrosporydiów[1]

# Animal reservoirs of human virulent microsporidian species

**Anna Słodkowicz-Kowalska**

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i obroniona 3.06.2008 r.

Promotor: Prof. dr hab. Anna C. Majewska
Recenzenci: Prof. dr hab. Wanda Kocięcka
Prof. dr hab. Edward Siński

**ABSTRACT.** The main objective of the present study was to determined the occurrence of *Encephalitozoon intestinalis*, *E. hellem*, *E. cuniculi*, and *Enterocytozoon bieneusi* in Poland in animal faecal using the FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) and multiplex FISH techniques. Additional objectives included: (1) identification of animal hosts of microsporidia that are infectious to humans amongst free-ranging, captive, livestock and domestic animals; (2) a molecular analysis of randomly selected parasite isolates and determination of their zoonotic potential; (3) evaluation of the role of animals in the dissemination of microsporidia spores in the environment, and an estimation of the potential risk of infection for other animals and humans. A total of 1340 faecal samples collected from 178 species of animals were examined using conventional staining (chromotrope-2R and calcofluor white M2R staining) and molecular techniques (FISH and multiplex FISH techniques). Microsporidian spores were detected in 33 faecal samples (2.5%) obtained from 17 animal species. Microsporidia were demonstrated more often in birds (6.1%) than in mammals (0.7%); the difference was statistically significant ($p<0.00001$). In addition, the prevalence of microsporidian infections in waterfowl was significantly higher than the prevalence of microsporidian infections in other animals ($p<0.03$). Animal reservoirs of human infectious microsporidia were disclosed in six of 38 sites where faecal samples were taken from animals. Three species of human virulent microsporidia were identified in animals. Spores of *E. hellem* were found in 25 faecal samples (1.9%) taken from 12 bird species (6 zoo bird species, 4 free-ranging bird species, 2 livestock bird species). Spores of *E. intestinalis* were identified in five faecal samples (0.4%) taken from two livestock bird species and two zoo mammal species. In turn, *E. bieneusi* spores were detected only in three faecal samples (0.2%) taken from three zoo mammal species. It was demonstrated that the new hosts of *E. hellem* are the following bird species: mallard duck (*Anas platyrhynchos*), greyleg goose (*Anser anser*), mute swan (*Cygnus olor*), black-necked swan (*Cygnus melancoryphus*), black swan (*Cygnus atratus*), coscoroba swan (*Coscoroba coscoroba*), black-crowned crane (*Balearica pavonina*), nicobar pigeon (*Caloenas nicobarica*) and carrion crow (*Corvus cornix*). In addition, *E. hellem* was found for the first time in birds from the Anseriformes and Gruiformes orders. Whereas *E. intestinalis* was disclosed for the first time in the domestic goose (*Anser anser* f. *domestica*), red ruffed lemur (*Varecia variegata rubra*) and the ring-tailed lemur (*Lemur catta*), while the black lemur (*Eulemur macaco flavifrons*), mongoose lemur (*Eulemur mongoz*) and the Visayan warty pig (*Sus cebifrons negrinus*) were first found to carry *E. bieneusi*. The mammal species that were found to carry *E. bieneusi* and *E. intestinalis* are included in The IUCN Red List of Threatened Species. The results of the present study are significant from an epidemiological point of view. The wild, livestock and zoo animals that were found to carry microsporidia live in different conditions, and thus their role as animal reservoirs for these dangerous pathogens varies. Waterfowl birds may be the main source of contamination of surface waters with *E. hellem* spores and the protection of surface waters is virtually impossible. Moreover, isolates of *E. hellem* from mute swans have SSU rRNA sequences identical to *E. hellem* genotype reported 10 years ago in HIV-positive patient in USA (GenBank Accession no. L19070). This result indicate that *E. hellem* from mute swans can be a potential source of

[1] Badania wykonano w ramach międzynarodowego projektu badawczego finansowanego przez NATO Collaborative Linkage Grant nr 979765; badań własnych nr 501-01-1123180-03496 oraz badań statutowych nr 502-01-01123180-0349

infection for humans. The contamination of the human environment with microsporidian spores infectious to humans is also facilitated by farm and synanthropic birds, because *E. hellem* and *E. intestinalis* were found in farms pigeons, domestic goose and the carrion crow. These birds can also be the source of infectious for breeders and ornithologists. The occurrence of microsporidiosis in animals kept in zoological gardens may constitute a deadly hazard not only for the animals themselves, but also for zoo personnel and visitors. The identification of animal reservoirs of *E. hellem*, *E. intestinalis* and *E. bieneusi* in Poland points to the possibility of infection of humans. The results of the present study have shown that the FISH technique, although time-consuming, is very sensitive, not overly costly and – what is of prime importance – it enables identification of microsporidian species, and therefore should be used for diagnosing microsporidiosis in humans and animals.

**Key words:** microsporidia, zoonoses, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Enterocytozoon bieneusi*, FISH technique

## Streszczenie

Mikrosporydia stanowią wysoce zróżnicowaną i wyspecjalizowaną grupę jednokomórkowych pasożytów wewnątrzkomórkowych wielu gatunków zwierząt bezkręgowych i kręgowych. Stosunkowo niedawno stwierdzono, że mikrosporydioza u ludzi stanowi zarówno poważne zagrożenie życia dla osób z obniżoną odpornością, jak i zdrowia dla osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym. Jednak źródła zarażenia ludzi i drogi transmisji mikrosporydiów nie są jeszcze w pełni poznane, chociaż coraz częściej uważa się, że mikrosporydioza u ludzi może mieć charakter zoonotyczny.

Jak dotychczas, w Polsce nie prowadzono badań dotyczących występowania inwazyjnych dla człowieka gatunków mikrosporydiów. Głównym celem tej pracy było wykrycie na terenie Polski występowania *Encephalitozoon intestinalis*, *E. hellem*, *E. cuniculi* oraz *Enterocytozoon bieneusi* w kale zwierząt przy wykorzystaniu techniki FISH i multiplex FISH. Ponadto, dodatkowymi celami było zidentyfikowanie zwierzęcych żywicieli mikrosporydiów inwazyjnych dla człowieka wśród dziko żyjących, hodowlanych oraz domowych ptaków i ssaków; określenie potencjału inwazyjności dla człowieka wybranych izolatów mikrosporydiów na podstawie molekularnej analizy SSU-rRNA pasożytów oraz określenie roli zwierząt w rozprzestrzenianiu spor mikrosporydiów w środowisku i oszacowanie potencjalnego ryzyka zarażenia innych zwierząt i ludzi.

Wykorzystując konwencjonalne metody barwienia rozmazu kału (barwienie chromotropem i barwienie Calcofluorem) oraz techniki FISH zbadano 1340 prób kału, uzyskanych od 178 gatunków zwierząt dziko żyjących i hodowlanych, hodowanych w ogrodzie zoologicznym lub w sklepach zoologicznych oraz znajdujących się w schronisku dla bezdomnych zwierząt. Spory mikrosporydiów wykryto w 33 próbach kału (2,5%) pochodzących od 17 gatunków zwierząt. Mikrosporydia wykrywano częściej w kale ptaków (6,1%), niż w kale ssaków (0,7%); różnica była statystycznie istotna ($p<0,00001$). Ponadto, mikrosporydia najczęściej wykrywano w kale dziko żyjących ptaków wodnych; różnica była statystycznie istotna ($p<0,03$). Zwierzęce rezerwuary inwazyjnych dla człowieka mikrosporydiów wykryto w sześciu z 38 miejscowości na terenie których pobierano próby kału od zwierząt.

W kale zwierząt zidentyfikowano trzy gatunki mikrosporydiów inwazyjnych dla człowieka. Spory *E. hellem* wykryto w 25 próbach kału (1,9%) pobranych od 12 gatunków ptaków (6 gatunków ptaków z ZOO, 4 gatunki ptaków dziko żyjących, 2 gatunki ptaków hodowlanych). Spory *E. intestinalis* zidentyfikowano w pięciu próbach kału (0,4%) uzyskanych od dwóch gatunków ptaków hodowlanych i dwóch gatunków ssaków z ZOO. Natomiast spory *E. bieneusi* stwierdzono jedynie w trzech próbach kału (0,2%) pobranych od trzech gatunków ssaków z ogrodu zoologicznego. Stwierdzono, że nowymi żywicielami *E. hellem* są następujące gatunki ptaków: kaczka krzyżówka (*Anas platyrhynchos*), gęś gęgawa (*Anser anser)*, łabędź niemy (*Cygnus olor*), łabędź czarnoszyi (*Cygnus melancoryphus*), łabędź czarny (*Cygnus atratus*), łabędź koskoroba (*Coscoroba coscoroba*), żuraw koroniasty (*Balearica pavonina*), gołąb nikobarczyk (*Caloenas nicobarica*) i wrona siwa (*Corvus cornix*). Ponadto, po raz pierwszy stwierdzono *E. hellem* u ptaków należących do rzędu blaszkodziobe i żurawiowe. Natomiast *E. intestinalis* po raz pierwszy wykryto u gęsi domowej (*Anser anser* f. *domestica*), lemura wari czerwonego (*Varecia variegata rubra*) i lemura katta (*Lemur catta*), podczas gdy u lemura mokoka (*Eulemur macaco flavifrons*), lemura mongoza (*Eu-*

*lemur mongoz*) i świni wisajskiej (*Sus cebifrons negrinus*) po raz pierwszy stwierdzono *E. bieneusi*. Gatunki ssaków, u których wykryto *E. bieneusi* i *E. intestinalis* znajdują się w Czerwonej Księdze Gatunków Zagrożonych.

Wyniki niniejszych badań są istotne z epidemiologicznego punktu widzenia. Zwierzęta dzikie, hodowlane oraz znajdujące się w ZOO, u których wykryto mikrosporydia żyją w różnych warunkach, zatem ich rola jako zwierzęcych rezerwuarów tych groźnych patogenów jest także odmienna. Ptaki wodne mogą być głównym źródłem zanieczyszczenia zbiorników wód powierzchniowych sporami *E. hellem* i ochrona wód powierzchniowych przed zanieczyszczeniem stadiami dyspersyjnymi mikrosporydiów przez ptaki jest praktycznie niemożliwa. Ponadto, izolaty *E. hellem* od łabędzi niemych mają wysoki potencjał inwazyjności dla człowieka, o czym świadczą wyniki genotypowania tych izolatów. Zatem pływanie w zbiornikach wód powierzchniowych może wiązać się z ryzykiem zarażenia.

Do zanieczyszczenia środowiska człowieka sporami mikrosporydiów inwazyjnych dla człowieka przyczyniają się także ptaki hodowlane i synantropijne, ponieważ u gołębi hodowlanych, gęsi domowych oraz u wrony siwej wykryto obecności *E. hellem* i *E. intestinalis*. Ptaki te mogą być także źródłem inwazji dla osób mających z nimi bezpośredni kontakt, np. dla hodowców i ornitologów. Występowanie mikrosporydiozy u zwierząt hodowanych w ogrodach zoologicznych może stanowić nie tylko śmiertelne zagrożenie dla zwierząt, ale także może się wiązać z ryzykiem zarażenia opiekunów zwierząt i osób zwiedzających ZOO.

Wykrycie zwierzęcych rezerwuarów *E. hellem, E. intestinalis* i *E. bieneusi* na terenie Polski wskazuje na możliwość ryzyka zarażenia ludzi. W badaniach wykazano, że technika FISH, mimo swojej czasochłonności jest wysoce czuła, niezbyt kosztowna, a co najważniejsze umożliwia identyfikację gatunku mikrosporydium, a zatem powinna być wykorzystywana w diagnostyce mikrosporydiozy ludzi i zwierząt.

*Wpłynęło 21 października 2008*
*Zaakceptowano 10 listopada 2008*