

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4103 Zootechnika
Studijní obor: Zootechnika
Katedra: Zootechnických věd
Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Fermentované masné výrobky jako potenciální zdroj
Encephalitozoon cuniculi

Autor bakalářské práce: Tereza Vecková
Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
Konzultanti bakalářské práce: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

České Budějovice, 2018

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 13. dubna 2018

.....
Tereza Vecková

Zde bych ráda poděkovala mým školitelům prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. a RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D., za cenné rady a odborné vedení. Dále pak všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za pomoc při práci v laboratoři.

Tato práce byla finančně podpořena z projektu Grantové agentury České republiky GAČR 17-12871S (řešitel RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.).

Abstrakt

Cílem této práce bylo zjistit výskyt a prevalenci *Encephalitozoon cuniculi* ve vepřovém mase a vyhodnotit účinek fermentace při výrobě salámů na infekčnost *E. cuniculi* pro imunodeficitní (SCID) a imunokompetentní (BALB/c a C57BL/6) myši. Pomocí nested PCR byla detekovaná DNA *E. cuniculi* genotyp II ve vzorcích masa dvou poražených prasat z 50 testovaných jatečných těl v množství od 60 do 250 spór na 1 g masa. Za experimentálních podmínek, spóry *E. cuniculi* genotyp II (3000 spór v 1 g) zůstávají životaschopné v salámech ošetřených fermentací při teplotě 24 °C po dobu 48 hodin a jsou schopné vyvolat infekci u laboratorních zvířat minimálně dva týdny po fermentaci. Na základě zjištěných výsledků, by měly být fermentované masné výrobky považovány za potenciální zdroj infekce *E. cuniculi* u lidí.

Klíčová slova: Microsporidie; *Encephalitozoon cuniculi*; infekce; prevalence; vepřové; masné výrobky; fermentace

Summary

This study describes the prevalence and burden of *Encephalitozoon cuniculi* in pork meat and evaluates the effect of fermentation in the production of sausages on *E. cuniculi* infectivity for immunodeficient (SCID) and immunocompetent (BALB/c and C57BL/6) mice. Using a nested polymerase chain reaction approach, 2 of 50 slaughter pigs was found to have *E. cuniculi* genotype II in meat in an amount 60–250 spores per 1 g. Under experimental conditions, *E. cuniculi* genotype II spores (3000 spores per 1 g) in meat remained infective for mice following fermentation treatments at 24 °C for 48 hrs and consumed within two weeks after production. Based on these findings, fermented meat products should be considered as a potential source of *E. cuniculi* infection in humans.

Key words: Microsporidia; *Encephalitozoon cuniculi*; infection; prevalence; pork; meat products, fermentation

Obsah

Cíl práce.....	7
1. Úvod	8
2. Literární přehled.....	9
2.1 Taxonomie mikrosporidií	9
2.2 Mikrosporidie savců	9
2.3 Zdroj infekce	9
2.4 Průběh infekce.....	9
2.5 Terapie a prevence	10
2.6 Faktory ovlivňující životaschopnost a infektivitu spór mikrosporidií	11
2.7 Zpracování fermentovaných masných výrobků.....	11
3. Materiál a metodika.....	13
3.1 Materiál.....	13
3.1.1 Vzorky masa	13
3.1.2 Spóry mikrosporidií pro experiment.....	13
3.1.3 Experimentální zvířata	13
3.1.4 Příprava salámu	13
3.1.5 Design experimentu.....	14
3.2 Metody	14
3.2.1 Izolace DNA z tkáně.....	14
3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	15
3.2.3 Gelová elektroforéza	16
3.2.4 Sekvenování a genotypizace	17
3.2.5 Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)	17
4. Výsledky.....	19
5. Diskuse	21
6. Závěr	24
7. Přehled použité literatury a zdrojů	25

Cíl práce

- Nashromáždít vzorky masa z různých částí jatečných těl prasat z různých chovů na jatkách v České republice a pomocí molekulárních analýz vyhodnotit prevalenci mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* a určit jejich druh a genotyp.
- Experimentálně ověřit, zda jsou spóry *E. cuniculi* genotyp II infekce schopné po vystavení fermentačním procesům.
- Vyhodnotit získaná data a posoudit potenciální rizika infekcí pro spotřebitele při konzumaci fermentovaných masných výrobků.

1. Úvod

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární sporulující paraziti, jejichž hostitelé zahrnují různorodá zvířata a jednu skupinu protistů (Ardila-Garcia et Fast 2012). Způsobují oportunní infekce, které vedou k závažným chorobám. U osob s poruchou imunitního systému mohou zapříčinit i smrt. Tyto patogeny jsou častěji hlášeny jako původci latentní infekce u imunokompetentních jedinců (Kotková et al. 2013).

Životní cyklus se značně liší u různých druhů, ale pro všechny druhy je společná extracelulární a intracelulární fáze. Infekčním stádiem je spóra vyznačující se přítomností injekční struktury známé jako polární trubice (Ardila-Garcia et Fast 2012). Sporoplasma je v podobě miniaturní buňky injikována přímo do cytoplasmy buňky hostitele. Následně mikrosporidie prochází dvěma vývojovými fázemi, merogonií a sporogonií. Merogoniální buňky nemají klasické mitochondrie, ale mají mitosomy, drobné, dvěma membránami obalené váčky, které jsou pozůstatky mitochondrií. Ribosomy připomínají velikostí podjednotek prokaryotické ribosomy. Golgiho aparát je velmi primitivního typu (Volf et Horák 2007). Vzniklé spóry se uvolňují do prostředí z infikovaného hostitele, jsou všudypřítomné (Kotler et Orenstein 1998) a vysoce odolné díky proteinové a chitinové vrstvě v buněčné stěně (Mo et Drancourt 2004).

Mikrosporidie zahrnují druhy s ekonomickým a klinickým významem. Infekce způsobené těmito parazity způsobují značné ekonomické ztráty v rybářství, včelařství a hedvábnickém průmyslu (Didier et al. 1998).

Pro mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* je typické množení v parazitoformní vakuole (Franzen et Müller 2001). Nejrozšířenějším druhem tohoto rodu je *Encephalitozoon cuniculi*, který má nízkou hostitelskou specifitu a infikuje celou řadu obratlovců, včetně člověka (Didier et al. 1995).

Vzhledem k šíření *E. cuniculi* do celého hostitele (Kotková et al. 2013), může syrové nebo nedostatečně tepelně upravené maso představovat zdroj infekce pro konzumenta, a to jak pro člověka, tak predátora. Tato práce by měla odpovědět na základní otázky, zda je *E. cuniculi* přítomna v mase jatečně opracovaných těl prasat a jestli maso, respektive fermentované výrobky z něj vyrobené mohou být zdrojem infekce pro člověka.

2. Literární přehled

2.1 Taxonomie mikrosporidií

Mikrosporidie patří do kmene Microsporidia, třídy Microsporea a řádu Microsporida (Vivarés et al. 2002). Původně byly řazeny mezi prvoky (Protozoa) a dokonce byly po určitý čas považovány za jedny z nejstarších organismů. Molekulárně-fylogenetické studie však ukázaly, že mikrosporidie náležejí do říše hub (Fungi), nebo jsou s nimi v úzkém příbuzenském vztahu (Volf et Horák 2007). Dnes známe kolem 2 000 druhů mikrosporidií, řazených asi do 200 rodů (Vávra 2017).

2.2 Mikrosporidie savců

Druhy infikující savce jsou relativně malé a oválného tvaru. V průměru měří 2-7 $\mu\text{m} \times 1,5\text{-}5 \mu\text{m}$. Infekce se přenáší zejména fekálně-orální nebo urino-orální cestou, ačkoliv vertikální přenos u savců je možný. Hostitelské buňky jsou infikovány procesem klíčivosti, v němž spóry protlačují svůj obsah skrze naruby obracející se a odvíjející se polární trubici do hostitelské buňky. Polární trubice je jedinečná pro mikrosporidie. S několika výjimkami je mikrosporidíóza u imunokompetentních jedinců chronická a subklinická. U mladých savců infikovaných mikrosporidii se však vyvíjejí závažná a někdy smrtelná onemocnění ledvin. U imunodeficitních jedinců (například laboratorní SCID myši) se rozvíjí ascites a následně umírají na mikrosporidíózu (Didier et al. 1998).

2.3 Zdroj infekce

Mikrosporidiové spóry mohou být do prostředí uvolněny močí, stolicí nebo dýchacími sekrety. Zdrojem infekce jsou osoby nebo zvířata nakažená mikrosporidii, která vylučují spóry. Spóry mikrosporidií byly zjištěny i v povrchových vodách, půdě a potravinách, kde zůstávají po dlouhou dobu infekční (Kotková et al. 2013). Potenciálním zdrojem mikrosporidií pro člověka může být také pasterované mléko (Kváč et al. 2016, Tomanová 2015).

2.4 Průběh infekce

Mikrosporidíóza má velmi variabilní průběh a projevuje se širokou škálou příznaků v závislosti na hostiteli, druhu a genotypu mikrosporidie. Infekce začíná proniknutím spóry do organismu. Nejčastější způsob je požití a vdechnutí infekční

spóry, méně častá je infekce přes porušenou kůži nebo přes oko. Tento způsob přenosu infekce označujeme jako horizontální. Vertikální přenos byl zaznamenán hlavně u hmyzu, ale i hlodavců, králíků, masožravců, koní a primátů vyjma lidí (Baneux et Pognam 2003, Didier et al. 1998, Snowden et al. 1998, Snowden et Shadduck 1999, van Rensburg et al. 1991). Mikrosporidíóza může být akutní nebo chronická, postihující jeden či více typů tkání. Vyvolává mírné až smrtelné příznaky, dokonce i změnu pohlaví hostitele (Ardila-Garcia et Fast 2012).

Primárními místy infekce jsou nejčastěji epitelové buňky gastrointestinálního a respiračního traktu. Například *Enterocytozoon bieneusi* setrvává především v tenkém střevě a jeho spóry jsou vylučovány stolicí. Může ale také zapříčinit infekci žlučových cest. Mimo enterocyty tenkého střeva mohou migrovat druhy rodu *Encephalitozoon*, které se pomocí infikovaných makrofágů šíří do celého organismu hostitele, kde způsobují diseminovanou infekci. Sekundárně mikrosporidie způsobují jaterní, ledvinovou a respirační infekci, také mohou infikovat mozek či nosní dutiny (Didier et al. 1998).

Klinické příznaky mikrosporidíózy se objevují především u imunodeficitních jedinců, například u pacientů s AIDS, kteří mají hladinu CD4 + T-lymfocytů pod 100 buněk v μl krve (Sak et al. 2011). Nejčastějším klinickým projevem je chronický průjem vedoucí k malabsorbci živin, který může být spojený s horečkou, úbytkem hmotnosti, chřadnutím a často může končit smrtí jedince (Kotler et Orenstein 1998).

2.5 Terapie a prevence

Mikrosporidíózu lze léčit perorálním podáním albendazolu nebo jiných benzimidazolových preparátů. Albendazol, podávaný 2–3 krát denně po dobu jednoho měsíce by měl zaručit léčbu střevní a diseminované infekce způsobené *E. intestinalis* a *E. cuniculi*. Stejně dávkování snižuje klinické příznaky střevní infekce *E. bieneusi*, ale infekci zcela neeliminuje (Markell et al. 1999). Kotková et al. (2013), prokázali, že při léčbě albendazolem k úplnému vymizení *E. cuniculi* z organismu SCID a BALB/c myších nedochází. U imunodeficitních SCID myších došlo pouze k dočasnému snížení počtu zasažených orgánů. Ačkoliv u imunokompetentních BALB/c myší po léčbě nebyl *E. cuniculi* v orgánech nalezen, při následném podání imunosupresiv byla infekce znovu aktivována. Tato studie tedy ukazuje, že mikrosporidie mohou přežít v orgánech imunokompetentních jedinců a vyčkávat, zda jedinec nebude postižen narušenou imunitou (Tomanová 2015).

2.6 Faktory ovlivňující životaschopnost a infektivitu spór mikrosporidií

Spóra mikrosporidie je velmi odolná a při vhodných podmínkách snadno přežívá ve vnějším prostředí. Stěnu spóry tvoří chitin, který poskytuje ochranu před vlivy vnějšího prostředí. Životaschopnost spór ovlivňují tři hlavní faktory: čas, pH a teplota.

Mikrosporidie se vyznačují širokým hostitelským spektrem (suzozemské i vodní) vyžadující odlišné podmínky pro aktivaci a vypouštění spór. Podmínky zahrnují inkubaci v alkalickém nebo kyselém prostředí, posun z kyselého do alkalického pH nebo z alkalického do neutrálního pH (Undeen et Avery 1984; Undeen et Epsky 1990). Spóry *E. cuniculi* přežívají 24 hodinovou inkubaci při pH 4 a pH 9 (Shadduck et Polley 1978).

Za experimentálních podmínek spóry *E. cuniculi* zůstaly infekční po inkubaci po dobu 16 dní při 22 °C a po 98 dnech při 4 °C. Infekčnost neztratily ani spóry, které byly vysušeny a následně uchovávány při teplotě 22 °C a relativní vlhkosti 0 – 2 % po dobu 28 dní (Waller 1979). Uskladnění v destilované vodě nebo zmrazení nezpůsobuje 100 % devitalizaci spory *E. cuniculi* (Shadduck et Polley 1978).

2.7 Zpracování fermentovaných masných výrobků

Fermentované masné výrobky nejsou na rozdíl od ostatních masných výrobků podrobeny tepelnému zákroku, a proto si uchovávají typickou chuť (Pipek 1994). Do fermentovaných masných výrobků řadíme syrové šunky (např. parmská šunka), trvanlivé fermentované salámy (např. Poličan, Paprikáš), krájitelné fermentované salámy (např. Herkules, Lovecký salám) a roztíratelné fermentované salámy (např. čajový salám).

Zpracování fermentovaných masných výrobků začíná mělněním suroviny. Surovina je těsně před mělněním zmrazena, aby se dosáhlo hladkých a ostrých řezů. Mělnění je prováděno pomocí kutru a postupně se přidává dusitanová solící směs, sacharidy, koření a startovací kultura. Při teplotě -1 °C se dílo naráží do přírodních nebo do umělých (klihokových) střev. Obaly musí být propustné pro vodní páru (vysušování) a plyny (kouř). Při sušení obal dokonale obepíná salám. Naražené salámy se zavěšují na udírenské vozíky do klimatizovaných prostor, kde za regulovaných podmínek probíhá jejich zrání. Proces fermentace ovlivňují podmínky v komorách, tj. teplota vzduchu, relativní vlhkost vzduchu a rychlost proudění vzduchu. Fermentace nastupuje po zvýšení teploty a relativní vlhkosti. První fází je

vyrovnávací fáze, kdy se vyrovnává teplota produktu s teplotou v komoře. Tato fáze trvá 1–6 hodin dle množství a průměru fermentovaných výrobků. Po vyrovnání teploty výrobků s okolní teplotou komory je teplota nastavena na 22–24 °C při relativní vlhkosti 92–93 %. Nastavená teplota a vlhkost zajišťuje rozvoj bakterií mléčného kvašení, které vyvolávají proces fermentace (Kameník 2012).

V České republice se udí pomocí studeného kouře o teplotě do 25 °C, tím se výrobky aromatizují a vybarvují. Kouř zpevňuje obal výrobků, zabraňuje růstu plísní a mikroorganismů na povrchu a také má antioxidační účinky. Do komor je kouř přiváděn v pravidelných intervalech po dobu až 8 dnů (Ingr 2003).

Před vlastním zpracováním masa se někdy provádí tzv. odlákování. Maso se zbaví přebytečné vody tím, že se zavěsí do sítě a poté se lisuje nebo se předsuší. K úpravám masa by mělo patřit i odstranění šlach včetně pojivové tkáně. K tomu lze využít bubnový separátor (Pipek 1994).

3. Materiál a metodika

3.1 Materiál

3.1.1 Vzorky masa

Padesát směsných vzorků masa jatečných prasat zahrnujících tři vzorky z každého zvířete (plec, kýta a pupek) bylo umístěno do sterilních 50 ml zkumavek a skladováno při 4 °C až do molekulární detekce mikrosporidií.

3.1.2 Spóry mikrosporidií pro experiment

Pro experimentální účely byly použity spóry mikrosporidie druhu *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II, které byly získány z přirozeně infikované odchycené myši domácí (*Mus musculus*) (Koudela et al. 1994) a následně kultivovány v buněčné kultuře VERO E6 v RPMI – 1640 médiu (Biotech, Česká republika) obohaceném 2,5 % bovinním fetálním sérem (Biotech), antibiotiky a antimykotiky (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Spóry byly izolovány a vyčištěny z buněk centrifugací při 1100 g po dobu 30 minut. Následně byly třikrát promyty ve sterilizované destilované vodě a použity.

3.1.3 Experimentální zvířata

Dvacet imunokompetentních BALB/c myší bylo použito k výrobě fermentovaného salámu. K infekčnímu pokusu byly použity skupiny 8 – týdenních myší s vážnou kombinovanou deficiencí (SCID) a imunokompetentních BALB/c a C57Bl/6 myší (vždy 3 zvířata ve skupině). Všechny myši byly chovány v plastických chovných nádobách v IVC jednotce Touch SlimPlus – Blue Line (Tecniplast, Itálie) s podestýlku Lignocel select Fine (JRS GmbH & Co. KG, Německo). Myši byly napájeny sterilizovanou vodou a peletovaným krmivem (Altromin 1314 IRR, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Německo) *ad libitum*.

3.1.4 Příprava salámu

Dvacet imunokompetentních BALB/c myší bylo infikováno jícni sondou dávkou 10^7 spór *E. cuniculi* genotyp II ve 200 µl destilované vody. V akutní fázi infekce (35 dní po infekci; Kotková et al. 2013) byly myši usmrceny zlomením vazy, vykřevy, dekapitovány, staženy a vyvrženy. Vzorky jater z jednotlivých zvířat byly použity k průkazu probíhající infekce pomocí PCR (viz 4.2.2). Těla byla vyvěšena při 4 °C po dobu 24 hodin, následně rozmělněna sekáčkem a do směsi byly přidány

fermentační bakterie (Pro Starters 21; Progest, Czech Republic) v množství 0,2 g/1000 g směsi, koření, sůl (1,5 %) a směs byla naplněna do umělých střívek. Salámy byly inkubovány 48 hodin při teplotě 24 °C a poté uchovávány v chladničce při 4 °C.

3.1.5 Design experimentu

Tři myši každého kmene byly jednotlivě nakrmeny přes noc 1 g salámu za současného odejmutí granulovaného krmiva, a to ihned po fermentaci, jeden nebo dva týdny po fermentaci. Skupiny zvířat inokulovaných perorálně destilovanou vodou nebo 10^7 spor *E. cuniculi* genotyp II v destilované vodě byly použity jako negativní a pozitivní kontroly.

Z důvodu maximalizace úspěšnosti záchytu případné probíhající infekce byly myši utraceny v akutní fázi infekce podle výsledků Kotkové et al. (2013) a Saka et al. (2017a); SCID myši 21 dní po infekci (DPI), C57BL/6 myši 28 DPI a BALB/c myši 35 DPI. Sterilní vzorky sleziny, jater a ledviny byly získány během pitvy a použity pro molekulární detekci přítomnosti mikrosporidiové DNA v tkáni.

3.2 Metody

3.2.1 Izolace DNA z tkáně

S pomocí komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo) byla provedena izolace DNA z tkáně.

Postup izolování:

- Do označené mikrozkuhavky nastříhat přibližně 10 mg tkáně a přidat skleněné kuličky (0,2 a 0,5 mm).
- Připipetovat 200 µl ATL Buffer a vortexovat.
- Rozbít vzorek v beadbeateru (FastPrep-24 Instrument; MP Biomedicals, Santa Ana, CA) při rychlosti 5 m/s po dobu 1 minuty.
- Centrifugovat 10 sekund při 12 000 g.
- Přidat 20 µl proteinasy K.
- Inkubovat 1 hodinu při 56 °C. Během inkubace vzorek pravidelně homogenizovat.
- Centrifugovat 10 sekund při 12 000 g.
- Přidat 200 µl AL Buffer.
- Vortexovat.

- Přidat 200 µl 96 % EtOH.
- Vortexovat.
- Centrifugovat 45 sekund při 12 000 g.
- Veškerý supernatant přepipetovat na Mini spin column a centrifugovat 3 minuty při 12 000 g.
- Odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
- Připipetovat 500 µl AW1 Buffer na Mini spin column a centrifugovat 3 minuty při 12 000 g.
- Odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
- Přidat 500 µl AW2 Buffer na Mini spin column a centrifugovat 1 minutu při 12 000 g.
- Odstranit odpad ze sběrné zkumavky a znovu se centrifugovat 1 minutu při 12 000 g.
- Nahradit sběrnou zkumavku za novou označenou mikrozkušnicí (1,5 ml microcentrifuge tube). Přímo na membránu kolony napipetovat 200 µl AE Buffer.
- Inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 10 000 g.
- Vyizolovanou DNA skladovat při -20 °C.

3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Specifická DNA *Encephalitozoon* spp. byla v testovaných vzorcích detekována pomocí nested PCR amplifikující ITS ribosomální podjednotky rRNA dle dříve popsáných metodik (De Bosscuere et al. 2007, Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996). Celkový objem reakčních směsí byl pro primární i sekundární PCR reakci 20 µl. Primární PCR obsahovala 2 µl templátové DNA, 10 µl 2× AmpONETM HS-Tag premix (GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea), 200 nM každého primeru a molekulární vodu do celkového objemu 20 µl. Sekundární reakce byla shodná s primární, kromě použití 2 µl primární PCR jako templátové DNA. Reakční podmínky v termocycleru byly nastaveny následovně: počáteční denaturace 95 °C / 3 minuty, 35 cyklů zahrnující denaturaci 95 °C / 45 sekund; hybridizaci 55 °C / 45 sekund a syntézu 72 °C / 60 sekund. Závěrečná syntéza 72 °C / 10 minut. Každá

PCR obsahovala pozitivní (DNA *E. cuniculi* genotyp III) a negativní (molekulární voda) kontrolu.

Sekvence použitých primerů:

Primární PCR

- INT580F: 5' - TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT - 3'
- INT580R: 5' - TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG - 3'

Sekundární PCR

- MSP3: 5'- GGA ATT CAC ACC GCC CGT C (A,G) (C,T)TAT - 3'
- MSP4A: 5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT - 3'

3.2.3 Gelová elektroforéza

Sekundární PCR produkty by vizualizovány na 1 % agarózovém gelu s přídatkem ethidium-bromidu pomocí UV záření (vlnová délka 302 nm) transiluminátorem a zdokumentovány.

Chemikálie

- Agaróza (Serva Electrophoresis, Německo)
- TAE pufr: 50× TAE pufr (242 g tris báze; 457,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,00).
- Ethidium bromid 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA)
- Velikostní marker - 100 bp DNA Ladder (Sigma-Aldrich, USA)

Postup:

- Smíchat odpovídající množství agarózy s 1× TAE pufrem (např. 0,8 g agarózy a 80 ml TAE pufru)
- Směs rozpustit v mikrovlnné troubě a následně zchladit pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 60 °C.
- Do zchlazené směsi přidat 1 µl ethidium-bromidu a jemně zhomogenizovat.
- Gel vlít do formy s vloženým hřebenem a nechat tuhnout zhruba 30 minut.
- Po ztuhnutí gelu vyjmout hřeben a gel vložit do elektroforetické vany.

- Zalít gel TAE pufrem tak, aby byl celý gel ponořený.
- Do první jamky v gelu nanést 10 µl velikostního markeru a do dalších jamek napipetovat sekundární PCR produkty.
- Vyvíjet gel při napětí 80-120 V po dobu cca 30 minut (až do rozseparování produktů).
- K vizualizaci DNA fragmentů použít UV transiluminátor.

3.2.4 Sekvenování a genotypizace

Sekvenování PCR produktů bylo prováděno pomocí sekundárních primerů v komerčních laboratořích za použití sekvenačního kitu BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Získané nukleotidové sekvence byly analyzovány v Chromas Pro 1.7.5. a porovnány s referenčními sekvencemi uloženými v GenBank.

3.2.5 Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)

Množství spór *Encephalitozoon cuniculi* v jednotlivých orgánech myši bylo kvantifikováno pomocí kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) za použití specifických primerů amplifikujících část genu kódujícího malou ribozomální podjednotku *Encephalitozoon* spp. a specifické TaqMan próby (268 bp; Wolk et al. 2002). K sestrojení kalibrační křivky byla použita vyzolovaná DNA ze vzorků, které obsahovaly známý počet spór (10^3 až 10^8). Jednotlivé složky v reakční směsi jsou uvedeny v tabulce 1. Reakce probíhala na přístroji Light cycler 480 (Roche). Monitorována a vyhodnocena byla pomocí programu Light cycler 480 Software Release 1.5.0 SP4. Jako gen s konstantní expresí (housekeeping gene, HKG) byl použit gen pro β -aktin myši (137 bp; Dai et al. 2009).

Amplifikační program v termocycleru byl nastaven následovně: počáteční denaturace 95 °C/3 minuty, 45 cyklů zahrnující denaturaci 95 °C/45 sekund; hybridizaci 60 °C/10 sekund a syntézu 72 °C/16 sekund. Závěrečná extenze probíhala při 55–85 °C/16 sekund rychlostí 0,2 °C/1 sekundu. Chlazení trvalo 30 sekund při 40 °C (Wolk et al. 2002).

Součástí každé qRT PCR reakce byla negativní kontrola a vzorky o známých koncentracích β -aktinu ($2,57 \cdot 10^5$) a *Encephalitozoon* spp. (10^6) použité jako standardy. Všechny vzorky byly testovány v duplikátech. Pro další výpočty byla použita CT hodnota (threshold cycle), která byla automaticky odečítána výše

uvedeným programem. Ze získaných CT hodnot byl vypočítán počet spór v analyzovaném vzorku. Počet spór byl poté přepočítán na 1 g daného orgánu na základě známého počtu kopií genu pro β -aktin v 1 g orgánu (Sak et al. 2017b).

Tabulka 1. Reakční směs pro qRT PCR

Reagencie	Objem
FastStart Universal Probe Master (Roche)	12,5 μ l
deionizovaná H ₂ O	5,0 μ l
forward primer (10 μ M)	1,0 μ l
reverse primer (10 μ M)	1,0 μ l
proba (10 μ M)	0,5 μ l
DNA	5,0 μ l
Celkem	25,0 μl

Nukleotidové sekvence primerů a prób:

Encephalitozoon spp. (Wolk et al. 2002)

- forward primer: 5' - GTC CGT TAT GCC CTG AGA - 3'
- reverse primer: 5' - ACA GCA GCC ATG TTA CGA CT - 3'
- próba: 5'- red 640 - TGG ACG AAG ATT GGA AGG TCT GAG TC-phosphate-3'

β -aktin (Dai et al. 2009)

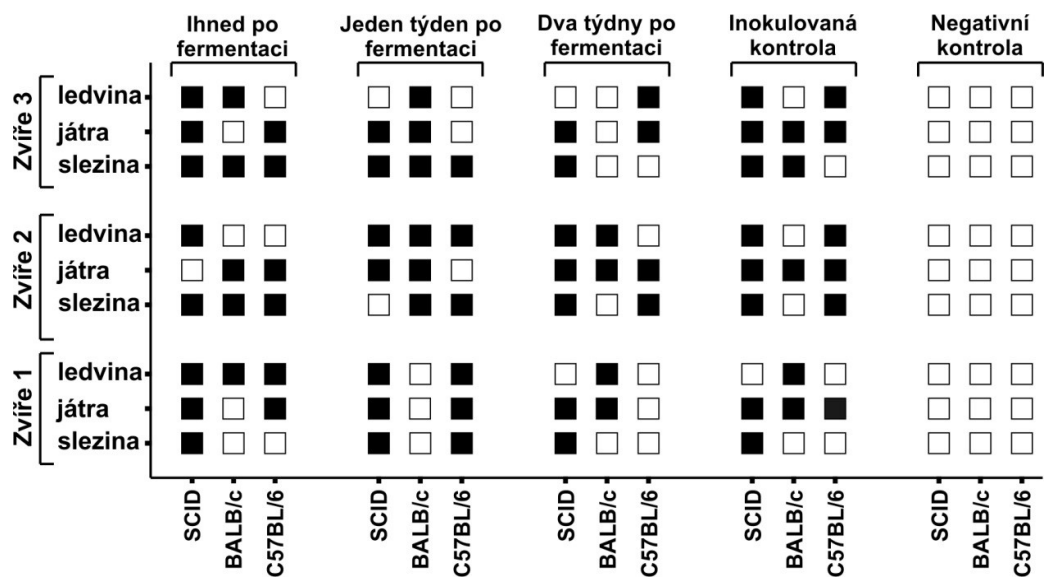
- forward primer: 5'- AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC - 3'
- reverse primer: 5'- CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT - 3'
- próba: 5'- FAM - CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC BHQ1-3'

4. Výsledky

DNA *Encephalitozoon* spp. byla detekovaná ve vzorcích masa dvou poražených prasat z 50 testovaných jatečných těl. Všechny získané sekvence vykazovaly 100 % shodu mezi sebou i s referenčními sekvencemi *E. cuniculi* genotyp II (GQ422153) uloženými v GenBank. Množství spór *E. cuniculi* genotypu II ve vepřovém masa se pohybovalo od 60 do 250 spór na 1 g masa.

Na základě testovaných vzorků jater imunokompetentních BALB/c myši používaných pro přípravu salámu byla pomocí PCR prokázána přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* genotyp II ve všech myších. Pomocí qRT-PCR bylo prokázáno, že salám vyrobený z infikovaných myši obsahoval 3000 spór *E. cuniculi* genotyp II na 1 g salámu. Kontrola pH v produktu po 48 hodinách fermentace prokázala u všech salámů správný průběh fermentace, všechny salámy měly pH nižší než 5,0.

Experimentální infekce prováděné v této práci ukázaly, že spóry *E. cuniculi* genotyp II zůstaly infekční až dva týdny po fermentaci salámu. Všechny kmeny myši krmené salámy obsahující spóry *E. cuniculi* vykazovaly v průběhu předpokládané akutní fáze infekce přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* genotyp II v tkáních (obrázek 1). Pouze u jedné BALB/c a po jedné BALB/c a C57BL/6 myši krmené salámem jeden, respektive dva týdny po fermentaci nebyla detekována přítomnost specifické DNA *E. cuniculi* v žádné z testovaných tkání (obrázek 1). U všech kontrolních zvířat per orálně inokulovaných stejnou dávkou *E. cuniculi* jako BALB/c myši použité výrobu salámů byla prokázána infekce. Nebyl zjištěn rozdíl mezi infekcí vyvolanou per orální inokulací čistými spórami *E. cuniculi* a infekcí způsobenou pozřením fermentovaných výrobků vyrobených z masa přirozeně obsahujícího *E. cuniculi*. Sekvence *E. cuniculi* získané z myši krmených salámem se 100 % shodovaly s infekční dávkou.



Obrázek 1. Přítomnost specifické DNA *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II v orgánech imunodeficitních (SCID, 21 dní po infekci) a imunokompetentních (BALB/c a C57BL/6, 35 dní po infekci) laboratorních myší nakrmených fermentovaným salámem obsahujícím *E. cuniculi* genotyp II v množství 3000 spór/ 1 g masa. Inokulovaná kontrola - myši infikované perorálně dávkou 10^7 spór v dH₂O; negativní kontrola - myši inokulované perorálně sterilní dH₂O; černý čtverec označuje PCR pozitivní vzorek; prázdný čtverec označuje PCR negativní vzorek.

5. Diskuse

Některé infekce u zvířat, tzv. zoonózy, jako je kampylobakterióza, salmonelóza a listerióza, mohou být přenášeny na člověka, zejména kontaminovaným jídlem a v některých případech kontaktem se živým nebo poraženým zvířetem (Bell et al. 1988).

Přestože jsou mikrosporidie jako infekční agens zařazeny podle National Institutes of Health (NIH, USA) do kategorie B a jejich spóry jsou na seznamu potenciálních kontaminantů Agentury pro ochranu životního prostředí (EPA), jejich přenos potravinami je dosud velmi špatně prostudován a je velmi málo známo o jejich epidemiologii a přirozených cestách přenosu.

Mikrosporidie jsou oportunní paraziti způsobující celou řadu klinických příznaků, které mohou být zaměněny s jinými infekcemi (Moretto et al. 2004). První případ mikrosporidiové infekce způsobené *E. bienersi* u člověka byl popsán až v roce 1959 (Franzen et Müller 2011) a do většího povědomí se mikrosporidie, včetně druhů rodu *Encephalitozoon*, dostaly až s nástupem pandemie AIDS. Rozšíření používání molekulárních metod v běžné diagnostické praxi a ve vědeckých studiích vedlo k realističtějšímu hodnocení prevalence mikrosporidiových infekcí, do té doby výrazně podceněných, u člověka u různých populací zvířat.

V souladu s v nedávné době publikovanými pracemi jsme v této práci prokázali, že mikrosporidie *E. cuniculi* se v průběhu patentní periody šíří do celého těla hostitele (Kotková et al. 2013, Wagnerová et al. 2013). Navíc jsme prokázali, že *E. cuniculi* může být běžně přítomen i ve svalech infikovaných jedinců. Vzhledem k tomu, že maso a výrobky z něj patří mezi oblíbené potraviny po celém světě, vyvstává otázka, zda mohou potravinová zvířata, respektive jejich maso představovat potenciální zdroj infekce pro konzumenta. Pomocí serologických metod bylo prokázáno, že specifické protilátky proti *E. cuniculi* se vyskytují až u 52 % prasat, 36 % skotu (Halánová et al. 1999), 14 % koní (Goodwin et al. 2006) a 13 % koz (Cisláková et al. 1992). Pouze 4 % testovaných prasat v této práci bylo PCR pozitivních na přítomnost specifické DNA *E. cuniculi*, což odpovídá nálezům *E. cuniculi* ve trusu 9 % prasat (Reetz et al. 2009) a 6 % skotu v moči (Abu-Akkada et al. 2015). Rozdíl mezi nízkou prevalencí detekovanou pomocí molekulárních technik a vysokou zjištěnou na základě přítomnosti specifických protilátek je dána přetrváváním protilátek v krvi jedince po jeho vyléčení nebo v průběhu chronické

fáze, kdy je detekce specifické DNA v trusu a moči s ohledem na intermitentní vylučování spór problematická (Malčková et al. 2010, Shaddock et Geroulo 1979).

V souladu s předešlými studiemi, žádné z *E. cuniculi* pozitivních prasat v této práci netrpělo klinickými příznaky mikrosporidie (Cisláková et al. 1992, Halánová et al. 1999, Goodwin et al. 2006, Reetz et al. 2009), jatečné tělo bylo bez makroskopických změn a bylo uvolněno pro lidskou konzumaci.

Fermentace masa je nejstarší metodou prodloužení skladovatelnosti (Gioia 2016). Trvanlivé fermentované masné výrobky jsou tepelně neopracované výrobky určené k přímé spotřebě, u kterých v průběhu fermentace došlo k biochemickým reakcím, které ovlivňují proces postupné přeměny díla ve finální produkt (Kameník 2012, Vyhláška ministerstva zemědělství č. 69/2016 Sb. ve znění pozdějších předpisů). Bakterie mléčného kvašení se uplatňují jako významná překážka proti růstu nežádoucích mikroorganismů zejména v prvních dnech procesu výroby (Kameník 2012). Vyjma omezení růstu mikroorganismů má proces fermentace a zvýšená slanost dostatečný účinek k devitalizaci infekčních vývojových stádií tasemnic rodu *Taenia* a protist rodu *Sarcocystis* (Ballarini et Martelli 2000). Naopak výsledky této práce prokázaly, že fermentace neovlivňuje životaschopnost a infekčnost spór *E. cuniculi* po dobu minimálně dvou týdnů. K podobným výsledkům došel i Guo et al. (2015), kteří prokázali, že zpracování masa jako je solení, zmrazení, komerční sušení teplým vzduchem, dlouhá doba fermentace, horké kouření a vaření, pouze snižuje množství tkáňových cyst *T. gondii* v masných výrobcích. Současně prokázali, že dusitany nebo dusičnany, koření, nízké pH a skladování za studena nemají žádný vliv na životaschopnost tkáňových cyst *T. gondii*. Nicméně van Sprang (1984) považuje fermentační proces dostatečný k deaktivaci *T. gondii*. Rozdíly mohly být způsobeny technologií výroby fermentovaných salámů. Některé postupy jsou založeny na rychlé produkci kyselin (snížení pH) při rychlé fermentaci, aby se stabilizovaly výrobky proti patogenům. Rychle působící startovací kultury, jako jsou *Lactobacillus* a *Pediococcus*, se používají při vysokých teplotách až do 40 °C (van Sprang 1984). V důsledku toho klesá pH na 4,6 a salám je stabilní. V této práci jsme použili postup běžně používaný v evropských zemích; teplota 22–26 °C a sušení namísto kyselosti (pH) (Ingr 2003). V této práci byly spóry *E. cuniculi* schopné přežít a udržet si infekčnost ve fermentovaných masných výrobcích s pH nižším než 5,0 po dobu alespoň 14 dnů. Na základě výsledků lze odhadnout, že pozřením 100 g fermentovaného salámu

vyrobeného z masa pozitivního zvířete může být člověk inokulován až 25000 spórami *E. cuniculi*, což je v porovnání s množstvím, které přijmuly laboratorní zvířata v 1 g salámu (3000 spór) dostačující k vyvolání infekce.

Tato práce je vůbec první, která se touto problematikou zabývá jak v teoretické, tak experimentální úrovni. Na základě získaných výsledků lze říci, že fermentované masné výrobky mohou představovat potenciální zdroj mikrosporidií pro člověka.

6. Závěr

- Byla prokázána přítomnost *Encephalitozoon cuniculi* v mase jatečných těl prasat.
- Fermentace salámu při teplotě 24 °C po dobu 48 hodin nedeaktivizuje spóry *Encephalitozoon cuniculi*.
- Pozřením fermentovaného salámu vyrobeného z masa zvířete infikovaného *E. cuniculi* byla navozena experimentální infekce u laboratorních zvířat.
- Masné fermentované výrobky představují potenciální zdroj *Encephalitozoon cuniculi* pro člověka.

7. Přehled použité literatury a zdrojů

- Abu-Akkada S. S., Ashmawy K. I., Dweir A. W. 2015:** First detection of an ignored parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in different animal hosts in Egypt. Parasitology Research. 114: 843 – 850.
- Ardila-Garcia A. M., Fast N. M. 2012:** Microsporidian infection in a free-living marine Nematode. American Society for Mikrobiology. 11: 1544 – 1551.
- Ballarini G., Martelli P. 2000:** The false myth of toxoplasmosis in salami. Acta Biomed Ateneo Parmense. 71: 529 – 535.
- Baneux P. J., Pognan F. 2003:** In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. Laboratory Animals 37: 132 – 138.
- Bell J. C., Palmer S. R., Payne J. M. 1988:** The zoonoses. Infections transmitted from animals to man. London: Edward Arnold. pp. 256. ISBN – 13: 978-0713145618.
- Cisláková L., Literák I., Bálent P., Hipíková V., Levkutová M., Trávníček M., Novotná A. 2001:** Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia) in angora goats--a potential risk of infection for breeders. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 8: 289 – 291.
- Dai J., Wang P., Adusumilli S., Booth C. J., Narasimhan S., Anguita J., Fikrig E. 2009:** Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. Cell host & Microbe. 6: 482 – 492.
- De Bosscuere H., Wang Z., Orlandi P. A. 2007:** First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. hellem* in a European brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. Zoonoses Public Health. 54: 131 – 134.
- Didier E. S., Snowden K. F., Shaddock J. A. 1998:** Biology of microsporidian species infecting mammals. Advance Parasitology. 40: 283 – 320.
- Didier E. S., Vossbrinck C. R., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., Shaddock J. A. 1995:** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology. 111: 411 – 421.
- Franzen C., Müller A. 2001:** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. Microbes and Infection. 3: 389 – 400.

- Gioia D., Mazzola G., Nikodinoska I., Aloisio I., Langerholc T., Rossi M., et al. 2016:** Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. growth. *International Journal of Food Microbiology* 235: 53 – 59.
- Goodwin D., Gennari S. M., Howe D. K., Dubey J. P., Zajac A. M., Lindsay D. S. 2006:** Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in horses from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 142: 380 – 382.
- Guo M., Buchanan R. L., Dubey J. P., Hill D. E., Lambertini E., Ying Y., Gamble H. R., Jones J. L., Pradhan A. K. 2015:** Qualitative Assessment for *Toxoplasma gondii* Exposure Risk Associated with Meat Products in the United States. *Journal of Food Protection*. 78: 2207 – 2219.
- Halánová M., Letková V., Macák V., Štefkovič M., Halán M. 1999:** The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Veterinary Parasitology*. 82: 167 – 171.
- Ingr I. 2003:** *Produkce a zpracování masa*. Brno: MZLU. ISBN 80-7157-719-7.
- Kameník J. 2012:** *Hygiena a technologie masa Trvanlivé masné výrobky*, Vyd.1. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ISBN 978-80-7305-608-7
- Katzwinkel-Wladarsch S., Lieb M., Heise W., Löscher T., Rinder H. 1996:** Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health*. 1: 373 – 378.
- Kotková M., Sak B., Květoňová D., Kváč M. 2013:** Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS ONE*. 8: e60941.
- Kotler D. P., Orenstein J. M. 1998:** Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Advence Parasitology*. 40: 321 – 49.
- Koudela B., Lom J., Vítovec J., Kučerová Z., Ditrich O., Trávníček J. 1994:** *In vivo* efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 41: 49 – 50.

- Kváč M., Tomanová V., Samková E., Koubová J., Kotková M., Hlásková L., McEvoy J., Sak B. 2016:** *Encephalitozoon cuniculi* in raw cow's milk remains infectious after pasteurization. *Foodborne Pathogens and Disease*. 13: 77 – 79.
- Malčecová B., Halánová M., Sulínová Z., Molnár L., Ravaszová P., Adam J., Halán M., Valocký I., Baranovič M. 2010:** Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis* in humans and animals. *Research in Veterinary Science*. 89: 358 – 361.
- Markell E. K., John D. T., Krotoski W. A. 1999:** Markell and Voge's Medical Parasitology. United States of America: W.B. Saunders Company. 84 – 88. ISBN 0-7216-7634-0.
- Mo L., Drancourt M. 2004:** Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 11: 1060 – 1063.
- Moretto M., Weiss L. M., Khan I. A. 2004:** Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. *The Journal of Immunology*. 172: 4402 – 4409.
- Pipek P. 1994:** Technologie masa II. Praha: Editační středisko ČVUT, 2. přepracované vydání: 303 s.
- Reetz J., Nöckler K., Reckinger S., Vargas M. M., Weiske W., Broglia A. 2009:** Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitology International*. 58: 285 – 292.
- Sak B., Jandová A., Doležal K., Kváč M., Květoňová D., Hlásková L., Rost M., Olišanský M., Nurcahyo W., Foitová I. 2017b:** Effects of selected Indonesian plant extracts on *E. cuniculi* infection in vivo. *Experimental Parasitology*. 181: 94 – 101.
- Sak B., Kotková M., Hlásková L., Kváč M. 2017a:** Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis. *Parasite Immunology*. 39(12): e12496
- Sak B., Kváč M., Kučerová Z., Květoňová D., Saková K. 2011:** Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals – A longitudinal study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5: e1162.

- Shadduck J. A., Geroulo M. J. 1979:** A simple method for the detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animal Science*. 29: 330 – 334.
- Shadduck J. A., Polley M. B. 1978:** Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Protozoology*. 25: 491 – 496.
- Snowden K. F., Didier E. S., Oresteijn J. M. Shadduck J. A. 1998:** Animal models of human microsporidial infections. *Laboratory Animal Science*. 48: 589 – 592.
- Snowden K. F., Shadduck J. 1999:** Microsporidia in higher vertebrates. *In: Wittner M., Weiss L. (Eds), The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC. pp. 393 – 417.
- Tomanová V. 2015:** Mléko jako potenciální zdroj *Encephalitozoon cuniculi*. *České Budějovice*. 34 s.
- Undeen A. H., Avery S. E. 1984:** Germination of experimentally nontransmissible microsporidia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 43: 299 – 301.
- Undeen A. H., Epsky N. D. 1990:** *In vitro* and *vivo* germination of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) spores. *Journal of Invertebrate Pathology*. 56: 371 – 379.
- van Rensburg I. B., Volkmann D. H., Soley J. T., Stewart C. G. 1991:** *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. *Journal of the South African Veterinary Association*. 62: 130 – 132.
- van Sprang A. P. 1984:** Possibilities of survival of various parasites in meat and meat products. *Tijdschr Diergeneeskd*. 109: 344 – 348.
- Vávra J. 2017:** Mikrosporidie: houby, co nevypadají jako houby, aneb Sestry říše Fungi? *Živa*. 257 – 261.
- Vivarés C. P., Gouy M., Thomarat F. 2002:** Functional and evolutionary analysis of eukaryotic genome. *Current Opinion Microbiology*. 5: 499 – 505.
- Volf P., Horák P. 2007:** *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton. 132–135. ISBN 978-80-7387-008-9.

Vyhláška č. 69/2016 Sb., ze dne 17. 2. 2016 o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich.

Wagnerová P., Sak B., Květoňová D., Maršálek M., Langrová I., Kváč M. 2013: Humoral immune response and spreading of *Encephalitozoon cuniculi* infection in experimentally infected ponies. *Veterinary Parasitology*. 197: 1 – 6.

Waller T. 1979: *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Laboratory Animal Science*. 13: 227 – 230.

Wolk D. M., Schneider S. K., Wengenack N. L., Sloan L. M., Rosenblatt J. E. 2002: Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3922 – 3928.