

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH**

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

**Mikrosporidiové infekce vyvolané *Encephalitozoon cuniculi*
genotypem II a III u imunokompetentních a
imunodeficientních hostitelů**

Microsporidial infections caused by *Encephalitozoon cuniculi*
genotype II and III in immunocompetent and immunodeficient
hosts

Disertační práce

RNDr. Michaela Kotková, DiS.

školitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

školitel specialista: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

České Budějovice

2019

Kotková, M. 2019: Mikrosporidiové infekce vyvolané *Encephalitozoon cuniculi* genotypem II a III u imunokompetentních a imunodeficientních hostitelů [Microsporidial infections caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III in immunocompetent and immunodeficient hosts].

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 105 s.

PROHLÁŠENÍ

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě disertační práci zpracovanou na závěr doktorského studia na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Prohlašuji tímto, že jsem práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a dostupných zdrojů uvedených v seznamu, jenž je součástí této práce.

Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své disertační práce a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné sekci databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

PROHLÁŠENÍ O VĚDECKÉM PŘÍSPĚVKU VÝSLEDKŮ PRÁCE

Tato disertační práce je založena na výsledcích řady vědeckých publikací, které vznikly za účasti dalších spoluautorů.

Na tomto místě prohlašuji, že jsem v rámci studia průběhu infekce způsobené mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi* provedla většinu původního výzkumu a tato práce je založena na vědeckých výsledcích, jimiž jsem hlavní autorkou.

V Českých Budějovicích dne 1. 8. 2019

.....

RNDr. Michaela Kotková, DiS.

SEZNAM IMPAKTOVANÝCH PUBLIKACÍ

Disertační práce vychází z těchto publikací:

Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Květoňová, D., Kváč, M., 2018. Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model. *Exp Parasitol* 193: 51–57.

Kotková, M., Sak, B., Kváč, M., 2018. Differences in the intensity of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III - Comparison using quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol* 192: 93–97.

Sak, B., **Kotková, M.**, Hlásková, L., Kváč, M., 2018. Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis. *Parasite Immunol* 39: e12496.

Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Kváč, M., 2017. The course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice. *Exp Parasitol* 182: 16–21.

PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

Všichni níže uvedení spoluautoři prohlašují, že se RNDr. Michaela Kotková podstatným způsobem podílela na publikacích přiložených k této disertační práci.

Ing. Lenka Hlásková

prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

RNDr. Dana Květoňová

RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

**DALŠÍ IMPAKTOVANÉ PUBLIKACE, NA KTERÝCH JSEM
SPOLUPRACOVALA, A KTERÉ SE PŘÍMO NETÝKAJÍ
TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE:**

Kotková, M., Němejc, K., Sak, B., Hanzal, V., Květoňová, D., Hlásková, L., Čondlová, S., McEvoy, J., Kváč, M., 2016. *Cryptosporidium ubiquitum*, *C. muris* and *Cryptosporidium* deer genotype in wild cervids and caprines in the Czech Republic. *Folia Parasitol* 63: 003.

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 Pathog Dis* 13: 77–79.

Kváč, M., Němejc, K., Kestřánová, M., Květoňová, D., Wagnerová, P., **Kotková, M.**, Rost, M., Samková, E., McEvoy, J., Sak, B., 2014. Age related susceptibility of pigs to *Cryptosporidium scrofarum* infection. *Vet Parasitol* 202: 330–334.

Němejc, K., Sak, B., Květoňová, D., Hanzal, V., Janiszewski, P., Forejtek, P., Rajský, D., **Kotková, M.**, Ravaszová, P., McEvoy, J., Kváč, M., 2014. Prevalence and diversity of *Encephalitozoon* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in wild boars (*Sus scrofa*) in Central Europe. *Parasitol Res* 113: 761–767.

PRÁCE VZNIKLA ZA PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH GRANTŮ

GAČR 14-20684S - Latent microsporidiosis of immunocompetent individuals: ticking time-bomb threatening human health (2014–2016; řešitel RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.)

GAČR 17-12871S - Elucidation of different virulence and drug resistance of genotypes of *Encephalitozoon cuniculi* using murine model (2017–2019; řešitel RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.)

GAJU 002/2016/Z - Genetic, animals health and product quality as basis of competitiveness (2016–2018; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.)

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěla poděkovat mému školiteli prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracovávání této disertační práce. Nemalý dík také patří mému školiteli specialistovi RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při plánování experimentů. Dále bych pak ráda poděkovala svým kolegům a kamarádům z Laboratoře veterinární a medicínské protistologie za morální podporu, odbornou pomoc a za vytvoření příjemné a přátelské pracovní atmosféry.

Největší dík patří mé rodině za podporu a trpělivost, když se mnou museli prožívat všechny útrapy doprovázející vznik této disertační práce.

ROZVRŽENÍ, FORMÁTOVÁNÍ A STYL PRÁCE.

V souladu s bodem 9.2 Opatření děkana Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích k zajištění studia v doktorském studijním program č. 17 z 8. listopadu 2017 je tato disertační práce zpracována formou souboru publikací studenta již uveřejněných a opatřených komentářem.

Předložená disertační práce zahrnuje výsledky popisující průběh mikrosporidiodózy způsobené různými genotypy *Encephalitozoon cuniculi*, účinnost léčby albendazolem a transplacentální přenos tohoto parazita. Tyto výsledky byly získané především pomocí experimentálních infekcí různých kmenů myší, molekulární biologií, mikroskopií a histologií, a byly publikovány ve vědeckých impaktovaných časopisech.

ANOTACE

Mikrosporidie jsou obligátní jednobuněční intracelulární paraziti, jež mají unikátní způsob vstupu do hostitelských buněk. První mikrosporidií, která byla nalezena u savců, byl *Encephalitozoon cuniculi*, který má široké hostitelské spektrum, infikuje celou řadu hostitelských buněk a je tak nalézán ve většině tkání. Pomocí experimentální infekce různých kmenů imunokompetentních a imunodeficitních myší byl sledován průběh akutní a chronické infekce způsobené různými genotypy mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* s cílem osvětlit vznik dosud opomíjené latentní mikrosporidiózy u imunokompetentních hostitelů a její rozsah. Dále byla pomocí experimentů s CD4 a CD8 knockout myšmi přezkoumána role jednotlivých subpopulací lymfocytů (CD4+ a CD8+) v protektivní imunitě proti *E. cuniculi* a zároveň u nich byla zjištěna účinnost léčby albendazolem. Získaná data přispěla k objasnění potenciálního nebezpečí latentních mikrosporidióz vyvolaných *E. cuniculi*, která může představovat riziko pro příjemce orgánů pocházejících od infikovaných dárců.

Nedílnou součástí práce bylo studium transplacentárního přenosu mikrosporidií z matky na plod, které přineslo odpovědi na otázku rizik spojených s prenatálními infekcemi plodů u chronicky infikovaných matek.

ANNOTATION

Microsporidia are obligate, unicellular intracellular parasites that have a unique way of entering the host cells. *Encephalitozoon cuniculi* was the first microsporidia found in mammals. This parasite has a broad host spectrum, infects a variety of host's cells and is found in most tissues of an infected individual. The course of acute and chronic infections caused by various genotypes of *Encephalitozoon cuniculi* was investigated by using different strains of mice. The aim of this study was to clarify the origin and extent of neglected latent microsporidiosis in immunocompetent hosts. Furthermore, the role of individual lymphocyte subpopulations (CD4+ and CD8+) in protective immunity against microsporidia was examined using CD4 and CD8 knockout mice experiments, and also the efficacy of treatment with albendazole was studied. The obtained data help to elucidate the potential danger of latent microsporidiosis, which may pose a risk to recipients of organs from infected donors in human medicine.

A considerable part of this thesis was the study of transplacental transmission of microsporidia from mother to a fetus, which answered the question about the risks associated with prenatal infections of fetuses in chronically infected mothers.

OBSAH

I. ÚVODNÍ LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
1.1. Úvod	14
1.2. Charakteristika mikrosporidií	15
1.2.1. Taxonomie	15
1.2.2. Morfologie	16
1.2.3. Životní cyklus	18
1.3. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	19
1.3.1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i> III	21
1.4. Diagnostika mikrosporidií	22
1.4.1. Transmisní elektronová mikroskopie	22
1.4.2. Barvicí metody	22
1.4.3. Stanovení antigenu	23
1.4.4. Molekulární metody	24
1.4.5. Stanovení protilátek	25
1.5. Přenos mikrosporidií.....	25
1.5.1. Transplacentální přenos.....	26
1.6. Mikrosporidiové infekce vs. imunita.....	31
1.6.1. Vrozená imunitní odpověď.....	32
1.6.1.1. Makrofágy	32
1.6.1.2. IFN- γ	33
1.6.2. Adaptivní imunitní odpověď	33
1.6.2.1. Buněčná imunita	34
1.6.2.2. Humorální imunita.....	35
1.7. Modelové organizmy pro studium imunitní odpovědi <i>in vivo</i>	36
1.7.1. Imunokompetentní myši BALB/c a C57BL/6.....	37
1.7.2. Myši s defektním genem pro tvorbu CD4+ T lymfocytů	38
1.7.3. Myši s defektním genem pro tvorbu CD8+ T lymfocytů	38
1.7.4. Myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID)	39
II. CÍLE PRÁCE.....	40
III. SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE	41
3.1. Průběh infekce způsobené mikrosporidií <i>Encephalitozoon cuniculi</i> genotyp III u imunokompetentních BALB/c a imunodeficitních SCID myši.....	42

3.2. Porovnání parazitární zátěže organismu použitím metody qRT-PCR	43
3.3. Průběh infekce způsobené <i>Encephalitozoon cuniculi</i> genotyp II u imunokompetentních C57Bl/6 myši a z nich odvozených CD4 a CD8 knockout myši.....	44
3.4. Transplacentální přenos	46
IV. ZÁVĚRY	48
V. PUBLIKACE, Z NICHŽ VYCHÁZÍ TATO PRÁCE.....	49
5.1. Evidence of transplacental transmission of <i>Encephalitozoon cuniculi</i> genotype II in murine model.	49
5.2. Differences in the intensity of infection caused by <i>Encephalitozoon cuniculi</i> genotype II and III - Comparison using quantitative real-time PCR.....	57
5.3. Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis.....	63
5.4. The course of infection caused by <i>Encephalitozoon cuniculi</i> genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice.	70
5.5. Dodatek: Latent microsporidiosis caused by <i>Encephalitozoon cuniculi</i> in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole.	77
VI. CITOVANÁ LITERATURA.....	85

I. ÚVODNÍ LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1. Úvod

Mikrosporidie jsou obligátní vnitrobuněční paraziti schopni infikovat různé skupiny živočichů. Jsou charakterizovány vytvářením malých a ve vnějším prostředí odolných spor, které obsahují pólovou trubici pomocí níž je infekční sporoplazma spory injikována do hostitelské buňky, čímž začíná životní cyklus těchto organismů

Mikrosporidie to eukaryota mající jádro, dělení chromosomů a vnitřní cytoplazmatický membránový systém. Naproti tomu postrádají Golgiho aparát, centrioly, peroxizomy a mitochondrie, které jsou nahrazeny organelou mitochondriím podobnou, zvanou mitozom (Williams a kol., 2002; Vávra, 2005). Nicméně jejich zjevná jednoduchost je pouze sekundární znak odvozený od adaptace na vnitrobuněčný parazitizmus. Fylogenetické studie ukázaly, že mikrosporidie se vyvinuly z předka, který měl mitochondrie, a jsou blízce příbuzné houbám (James a kol., 2006; Liu a kol., 2006; Corradi a Keeling, 2009).

Mikrosporidie byly poprvé popsány zhruba před 150 lety, kdy byl identifikován organizmus, *Nosema bombycis*, který byl zodpovědný za zhoubné onemocnění housenek bource morušového (Nägeli, 1857). Novodobé výzkumy ukazují, že mikrosporidie jsou všudypřítomné a jsou nalézány v obratlovcích i bezobratlých, stejně jako u některých protist (Weiss a Becnell, 2014). První popis mikrosporidiové infekce u savců byl v roce 1922 (Wright a Craighead, 1922) u laboratorních králíků s encefalitidou. Původce tohoto onemocnění byl studován, popsán a následně pojmenován *Encephalitozoon cuniculi* (Levaditi a kol., 1923). Tento název vědci užívali po řadu let. V roce 1964 bylo navrženo, aby se rod *Encephalitozoon* přejmenoval na *Nosema*, a to kvůli podobnosti s organizmy nalezenými v členovcích (Lianson a kol., 1964). Označení *Nosema cuniculi* se udrželo až do roku 1971, kdy Shaddock a Pakes navrhli navrácení k původní nomenklatuře (Shaddock a Pakes, 1971). Mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* byly nalézány jako patogenní agens u širokého spektra laboratorních, domácích a divokých zvířat, avšak první nález této mikrosporidie u člověka byl popsán až v roce 1959 (Matsubayashi a kol., 1959). V roce 1985 byl popsán případ pacienta s AIDS, jež trpěl profúzním průjmem. Původcem těchto potíží byla mikrosporidie rodu *Enterocytozoon*, *Enterocytozoon bieneusi* (Desportes a kol., 1985). Se šířením viru HIV (Human Immunodeficiency Virus) způsobující syndrom získané imunitní

nedostatečnosti (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) v devadesátých letech minulého století se zvyšoval i počet zaznamenaných mikrosporidiových infekcí způsobených jak rodem *Encephalitozoon*, tak rodem *Enterocytozoon*. Mnoho AIDS pacientů trpělo krom jiného i onemocněním způsobeným těmito mikrosporidii. Později byly některé druhy mikrosporidií zařazeny mezi oportunní patogeny infikující jedince se sníženou funkcí imunitního systému, zejména HIV-infikované pacienty či pacienty imunosuprimované potransplantační nebo protinádorovou terapií (Canning a Hollister, 1992).

1.2. Charakteristika mikrosporidií

1.2.1. Taxonomie

Když Nägeli popsal mikrosporidii *N. bombycis*, charakterizoval ji jako kvasinkám-podobnou houbu a zařadil ji mezi Schizomycety (Nägeli, 1857). Ovšem toto zařazení bylo následujících letech vyvráceno. Roku 1882, Edouard-Gérard Balbiani zařadil *Nosemu* do nově vytvořené skupiny, kterou pojmenoval Microsporidia, a začlenil je do skupiny prvoků zvaných Sporozoa (Balbiani, 1882). Tato skupina zahrnovala parazity, v jejichž životním cyklu bylo stádium spory; byly zde například někteří zástupci třídy Apicomplexa (Alveolata), Haplosporidia (Rhizaria) a členové podskupiny známé jako Cnidosporidie, do které právě spadaly mikrosporidie (Kudo, 1947). V éře výzkumu morfologie parazitů pomocí elektronové mikroskopie bylo odhaleno, že mikrosporidie nemají spoustu znaků, které jsou jinak běžné u eukaryotických buněk. Jednalo se o absenci mitochondrií, Golgiho aparátu, peroxizomů nebo bičíku a dalších 9+2 mikrotubulárních struktur (Vávra a Larsson, 1999). Navíc bylo zjištěno, že ribozomy mikrosporidií sedimentují jako prokaryotické 70S, nikoli jako eukaryotické 80S (Curgy a kol., 1980). Jelikož absence mitochondrií byla shledána u dalších jiných eukaryot, začalo se uvažovat o tom, že mikrosporidie jsou velmi starobylé eukaryotické organizmy, Archezoa (Cavalier-Smith, 1983). Tato hypotéza měla základ v tvrzení, že některé linie eukaryotických organizmů se při vývoji oddělily ještě před endosymbiózou mitochondrií. Do podříše Archezoa byly zařazeny Archamoeby, Metamonády, Parabasalia a Mikrosporidie (Cavalier-Smith, 1987). Popsání genu malé a velké podjednotky rRNA (SSU a LSU rRNA) u mikrosporidie *Variamorpha necatrix* poskytlo oporu hypotéze, že mikrosporidie jsou starobylé eukaryotické organizmy (Vossbrinck a kol., 1987). Analýzy isoleucyl aminoacyl-tRNA syntetázy,

elongačního faktoru 1 α a elongačního faktoru 2 podporovaly pozici mikrosporidií uvnitř eukaryot (Brown a Doolittle, 1995, 1999).

První nový přístup k řazení mikrosporidií ve fylogenetickém stromě přišel s re-analýzou meiosis mikrosporidií, kdy se ukázalo, že má více podobných znaků s meiózou u hub (Flegel a Pasharawipas, 1995). Molekulárně-fylogenetická data poskytly řadu silných důkazů o tom, že mikrosporidie jsou opravdu spíše příbuzné s houbami, a to buď jako bazální větev říše Fungi nebo jako sesterská skupina (Weiss a kol., 1999; Keeling a kol., 2000; Capella-Gutierrez a kol., 2012). Analýza α -tubulinu, β -tubulinu, glutamyl-tRNA syntetázy, seryl-tRNA syntetázy, vakuolární ATPázy, vazebného proteinu TATA boxu, iniciačního faktoru transkripce IIB, podjednotky A vakuolární ATPázy, proteinu vázajícího guanidin trifosfát, genu heat shock proteinu (HSP70), největší podjednotky RNA polymerázy II (RPB1) a transkripčního faktoru IIB demonstruje, že mikrosporidie nejsou primitivní eukaryota, ale jsou příbuzné s houbami (Edlind a kol., 1996; Keeling a Doolittle, 1996; Hirt a kol., 1997, 1999; Fast a kol., 1999; Keeling a kol., 2000; Arisue a kol., 2002). Navíc mikrosporidiální geny malé podjednotky rRNA postrádají vazebné místo pro paromomycin, což je opět podobnost s houbami (Edlind, 1998). Dále mikrosporidiový gen EF-1a má inserci, která se nachází pouze u hub a zvířat, nikoliv u prvoků (Edlind, 1998; Weiss a Vossbrinck, 1999; Weiss a kol., 1999). V neposlední řadě, chitin obsažený ve stěně spóry a zásoba trehalózy, jako hlavní cukerné rezervy, potvrzuje příbuznost s houbami a upevňuje tak pozici mikrosporidií (Undeen a Vander Meer, 1999; Weiss a Becnel, 2014).

Nyní jsou mikrosporidie pevně zakotveny uvnitř nadříše Opisthokonta a specificky mezi houby - Fungi (Adl a kol., 2005, 2012). Podle posledních poznatků jsou za nejbližší známé příbuzné mikrosporidií pokládáni zástupci oddělení Cryptomycota (příkladem je *Rozella allomyces* parazitující chytridní houbu *Allomyces arbuscula*), a paraziti zelených řas a rozsivek známí jako Aphelidea (James a kol., 2006). Obě tyto skupiny spojuje s mikrosporidii jeden důležitý znak – jsou to vnitrobuněční paraziti a vstupují do buňky hostitele pomocí takzvané „injekční trubice“.

1.2.2. Morfologie

Infekčním stádiem mikrosporidií je spora, jejíž velikost se pohybuje od 1 do 20 μm na délku. Jsou Gram pozitivní a velmi rezistentní vůči podmínkám vnějšího

prostředí. Jejich silná buněčná stěna se skládá ze tří vrstev; vnější proteinové vrstvy zvané exospora, vnitřní chitinové vrstvy zvané endospora a plazmatické membrány uzavírající infekční sporoplazmu a ostatní organely (Canning a kol., 1986).

Spory mikrosporidií mají strukturu, která je v přírodě zcela unikátní. Je jím vystřelovací aparát, pomocí kterého invadují hostitelskou buňku. Tento aparát se skládá ze tří částí; polaroplastu, zadní vakuoly a dlouhé vláknité pólové trubice). Polaroplast je systém membránových útvarů, jež vytváří lamely, váčky nebo tubuly v přední části spory. Zadní vakuola leží na opačné straně než polaroplast a je produktem Golgiho váčků. Pólová trubice je dutá a na předním konci spory je připevněná zevnitř k endospoře pomocí kotvícího disku v místě jejího ztenčení. Odtud poté trubice sestupuje středem spory a stáčí se v závitěch v její střední a zadní části. Délka pólové trubice se pohybuje v rozmezí od 50–500 μm a její uspořádání a počet závitů je druhově specifické (Vávra, 1976). Struktura trubice se skládá z několika vrstev, jejichž význam je dosud nejasný.

Infekce začíná klíčením spory, kdy změnou pH, osmotického tlaku nebo iontových poměrů dojde k bobtnání polaroplastu a zadní vakuoly a tím k nárůstu tlaku uvnitř spory (Vávra, 1963; Keohane a Weiss, 1998). Tomuto kroku ovšem ještě předchází dekompartmentace organel, štěpení disacharidů trehalosy na glukózu pomocí enzymu trehaláza, a následné vniknutí vody dovnitř spory přes aquaporiny čímž dojde ke zvýšení tlaku uvnitř spory (Undeen a kol., 1987). Někdy zadní vakuola slouží jako peroxisom obsahující katalázu a acetyl-CoA oxidázu a oxidací mastných kyselin v zadní vakuole se vytvoří potřebná energie pro klíčení (Findley a kol., 2005). Pólová trubice vystřelí z přední části spory a přitom se převrací naruby. Po rozvinutí v plné délce se začne zvětšovat zadní vakuola, a ta vytlačí vystřelenou pólovou trubicí obsah spory ven, potažmo do hostitelské buňky. Materiál polaroplastu, který je rovněž vytlačen ze spory, se nejspíše podílí na vytvoření plazmatické membrány sporoplasmy. Celý tento proces trvá přibližně pouhé 2 sekundy. Směr vystřelení je však více méně náhodný a často tak svůj cíl mine. Mikrosporidie tak kvalitu přenosu nahrazují kvantitou spor.

Ačkoli mikrosporidie mají mnoho znaků prokaryot, jejich jádro je typicky eukaryotické; je ohraničeno dvojitou membránou s póry. Jadérko je vidět zřídka, pouze je-li mikrosporidie ve stádiu tvorby spory (Vávra, 1976). Někdy se jádro mikrosporidií vyskytuje jako diplokaryon, tzn., že dvě jádra jsou v těsném kontaktu. Obě jádra diplokaryonu jsou strukturně identická a během buněčného cyklu se

chovají synchronně. Každé jádro má svou vlastní membránu a v místě styku jsou zploštělá a bez pórů (Vávra, 1976). Některé druhy mikrosporidií jsou diplokaryotické pouze v určité fázi vývoje (meronti u rodu *Enterocytozoon*), jiné mají diplokaryon v průběhu celého vývojového cyklu (*Nosema* spp.), jiné zase obsahují pouze monokaryont ve všech fázích vývojového cyklu (rod *Encephalitozoon*) (Canning, 1988).

Naproti tomu mikrosporidiální ribozomy jsou prokaryotního typu (70S) s podjednotkami 50S a 30S. Zároveň postrádají 5.8S rRNA a stejně jako prokaryota mají oblast korespondující s částí 5.8S rRNA ve velké podjednotce (Vávra a Lukeš, 2013). V časných vývojových fázích jsou ribozomy volně roztroušené v cytoplasmě, ale s pokračující merogoniální a sporogoniální fází se ribozomy připojují k lamelám endoplasmatického retikula. V mladých sporách je již většina ribozomů připojena k endoplasmatickému retikulu a tvoří tzv. polyribozomy.

Chybějící mitochondrie jsou u mikrosporidií nahrazeny mitosomy, což jsou vlastně redukované mitochondriální zbytky, jež vypadají jako malé váčky s dvojitou membránou tvořící malé shluky o 3 až 6 jednotkách (Williams a kol., 2002).

Mikrosporidie jsou metabolicky zcela závislé na hostiteli. Mají přibližně 2000 genů, ale ztratily geny pro syntézu primárních metabolitů a tak většinu ATP čerpají z hostitelské buňky. Naproti tomu geny, které vytvářejí transportní proteiny, jsou více než nadpočetné. Kompaktnost genomu je dána ztrátou nebo zkrácením genů a genových spacerů. Některé mikrosporidie došly v této redukci až tak daleko, že jejich genom je považován za minimální eukaryotický genom. Např. *Encephalitozoon cuniculi* má genom o velikosti 2,9 Mbp (Mega base pairs – mega párů bází) v 11 chromosomech (pojmenovány I až XI), což je dokonce menší než běžné genomy bakterií (*Escherichia coli* má 4,6 Mbp; Katinka a kol., 2001).

1.2.3. Životní cyklus

Jakmile se sporoplasma dostane do cytoplazmy hostitelské buňky, započne proces proliferace (merogonie) uvnitř parazitoformní vakuoly, jako v případě mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*, nebo v přímém kontaktu s cytoplasmou hostitelské buňky (například u rodu *Enterocytozoon*). Uvnitř hostitelské buňky sporoplasma prochází rozsáhlým dělením buď merogonií (binární dělení, rod *Encephalitozoon*), nebo schizogonií (mnohonásobný dělení, rod *Amblyospora*). Jak sporoplasma roste, mění se ve stádium zvané meront.

Merogonií nebo schizogonií vznikají meronty, což jsou kulaté buňky obklopené jednoduchou membránou. Obsahují velké jádro, málo vyvinuté endoplasmatické retikulum a spoustu ribozomů připojených k vezikulám endoplasmatického retikula nebo k jaderné membráně (Canning a kol., 1986). Meronty prodělávají opakované dělení, přičemž jaderné dělení se děje bez dělení buněčného, z čehož vzniknou mnohojaderné plasmodiální formy buněk a postupně tak zaplňují hostitelskou buňku.

Z merontů se postupně vyvinou sporonty, jež jsou charakterizované elektron-denzní stěnou na povrchu, zvýšeným množstvím ribozomů a endoplasmatického retikula a jejich reorganizací; endoplasmatické retikulum je více uspořádané a četné ribozomy připojené na endoplasmatické retikulum vytváří útvary zvané polyribozomy (Vávra a Larsson, 1999). Tyto orgány rovněž projdou binárním nebo mnohonásobným dělením a rozdělí se do sporoblastů, ze kterých se v konečné fázi vyvinou jednotlivé zralé spory.

Na konci proliferativní fáze je cytoplazma hostitelské buňky zcela vyplněná sporama, které jsou po prasknutí buněčné membrány uvolněny do okolního prostředí hostitelské buňky a mohou tak infikovat další buňky a životní cyklus se opakuje.

Takto popsaný životní cyklus se celý odehrává v jednom hostiteli – to se týká především savčích mikrosporidií například rodu *Encephalitozoon*. Některé mikrosporidie mají složitější vývojové cykly vyžadující rozdílné hostitele a zahrnující více než jednu generaci parazita mající rozdílnou morfologii. Většinou se jedná o druhy napadající planktonní korýše (buchanky a perloočky). Experimenty bylo zjištěno, že tyto korýše nelze nakazit sporama pro ně specifických mikrosporidií, což naznačuje, že zde musí být nějaký další hostitel či mezihostitel, nejpravděpodobněji létající hmyz (Vávra, 2005).

1.3. *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi se typicky vyvíjí uvnitř parazitoformní vakuoly vytvořené z endoplasmatického retikula hostitelské buňky (Bohne a kol., 2011). Jak parazit roste a dělí se, parazitoformní vakuola postupně zaplní většinu prostoru v buňce. Všechna vývojová stádia mají během celého vývojového cyklu jednoduché jádro. Meronti jsou obvykle adherováni k membráně vakuoly a dělí se opakovaným binárním dělením. Vzhledem k tomu, že cytokineze nenastává okamžitě po každém dělení cytoplazmy merontu, vznikají malé řetízky merontů (Weidner, 1976).

Sporonti se nacházejí v centru vakuoly a mají vyvinutou silnou povrchovou vrstvu zvanou plasmalema, z níž se poté vytvoří exospora spor. Dělením sporontů vznikají sporoblasty, které se poté vyvinou ve spory. Zralé spory obsahují jedno jádro a jejich velikost se pohybuje od 2,0 do 2,5 μm na délku a 1,0 až 1,5 μm na šířku. Pólová trubice uvnitř spory má pět až sedm otáček v jedné řadě (počet otáček pravděpodobně koresponduje s vyzrálostí spory), a obsahují jedno jádro (Sprague a Vernick, 1971; Canning, 1993). Některé spory při uvolňování z parazitoforní vakuoly ihned vystřelí pólovou trubicí, takže dochází k efektivnímu přenosu parazita uvnitř tkáně (Wittner a Weiss, 1999).

Před zjištěním, že mikrosporidie jsou původci oportunních infekcí během prvních let pandemie AIDS v 80. letech, byly infekce způsobené *E. cuniculi* nalézány především u zvířat (Snowden a kol., 1998; Didier a kol., 2000). Jak již bylo řečeno výše, *E. cuniculi* byl prvně identifikovaná v mozku, míše a ledvinách králíka s motorickou paralýzou (Wright a Craighead, 1922). Poté byl *E. cuniculi* nalézán u širokého spektra savců včetně člověka (Canning a kol., 1986; Canning a Hollister, 1992). *Encephalitozoon cuniculi* je také první mikrosporidií úspěšně převedenou ze savce do buněčné kultury (Shadduck, 1969), což umožnilo další výzkum tohoto parazita jak *in vitro*, tak *in vivo*. Dalšími izoláty *E. cuniculi*, které byly úspěšně převedeny do buněčné kultury, byly ze psa (Shadduck a kol., 1978; Botha a kol., 1979), laboratorní myši (Vávra a kol., 1972) a králíka (Cox a Pye, 1975). Na základě ultrastrukturálních a barvicích metod se předpokládalo, že různé izoláty *E. cuniculi* jsou identické (Montrey a kol., 1973; Pakes a kol., 1975; Shadduck a kol., 1979). Nicméně Weiser se domníval, že musí existovat několik genotypů *E. cuniculi*. Základem této domněnky byly rozdílné léze a distribuce parazita v těle hostitele u přirozených infekcí psů, králíků a myši (Weiser, 1964, 1965).

Teprve na základě molekulárních rozdílů založených na počtu opakování 5'-GTTT-3' sekvence ve vnitřním přepisovatelném mezerníku (Internal Transcribed Spacer, ITS) rRNA byly popsány čtyři genotypy *E. cuniculi* (Didier a kol., 1995b). Genotyp izolovaný z králíka byl označen I a má 3 opakování dané sekvence. Genotyp II mající dvě opakování pochází z myši a později byl nalezen v norských polárních liškách (*Alopes lagopus*) (Mathis a kol., 1996; Akerstedt a kol., 2002). Genotyp III obsahuje čtyři opakování, byl původně popsán u domácích psů (Shadduck a kol., 1978) a brzy poté u lidí a u primátů (Didier a kol., 1995b; Juan-Salles a kol., 2006). A genotyp IV, který byl detekován u pacienta po transplantaci

ledviny má pět opakování GTTT sekvence v ITS regionu (Talabani a kol., 2010). Tyto genotypy nejsou přísně hostitelsky specifické. První tři uvedené genotypy *E. cuniculi* byly nalezeny jak u zvířat, tak i u lidí, což ukazuje na potenciální zoonotický a antropotický přenos těchto mikrosporidií (Didier a kol., 2000).

Většina z toho, co je známo o biologii savčí mikrosporidie je primárně založeno na studiu mikrosporidie *E. cuniculi* genotyp II, která je hojně využívána pro experimentální infekce, a výše uvedené charakteristiky vyplývají především ze studia tohoto genotypu. *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III je relativně nedávno „objevený“ genotyp této mikrosporidie a od *E. cuniculi* II se liší především hostitelskou specifikou, parazitární distribucí a zátěží, a průběhem infekce. Následující kapitola je věnována výčtu a krátkému popisu infekcí způsobených *E. cuniculi* III

1.3.1. *Encephalitozoon cuniculi* III

Jak již bylo řečeno výše, *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III, označovaný též jako „psí“ genotyp, byl původně izolován z domácích psů (Shaddock a kol., 1978). Typické pro něho jsou 4 opakování sekvence 5'-GTTT-3' v oblasti ITS rRNA (Didier a kol., 1995b; Xiao a kol., 2001).

Na rozdíl od *E. cuniculi* genotyp II, který byl diagnostikován u mnoha druhů hostitelů, *E. cuniculi* genotyp III byl identifikován pouze u pestrušky písečné, králíků, ptáků, prasat, psů, polárních lišek, sněžného leoparda, tamarinů a kotulů, a v neposlední řadě také u člověka (Cutlip a Beall, 1989; Reetz a kol., 2004, 2009; Asakura a kol., 2006; Juan-Sallés a kol., 2006; Kašičková a kol., 2009; Snowden a kol., 2009; Valenčáková a kol., 2011; Hocevar a kol., 2014; Hofmannová a kol., 2014; Meng a kol., 2014; Scurrall a kol., 2015). Zatímco prasata a ptáci nevykazovali klinické příznaky infekce, u psů bylo popsáno množství klinických symptomů včetně slepoty, nefritidy a neurologických poruch (Botha a kol., 1986; Snowden a kol., 2009). Také v koloniích tamarinů z evropských Zoo byly hlášeny vysoké četnosti úmrtí mláďat způsobené infekcí *E. cuniculi* genotypu III (Guscetti a kol., 2003; Reetz a kol., 2004). Stejně tak byla popsána letální encephalitozoonóza u skupiny hlodavců, pestrušky písečné (*Lagurus lagurus*). V tomto případě však byly postiženi dospělci stejně tak jako juvenilní jedinci (Hofmannová a kol., 2014). Naproti tomu, experimentální infekce opic izolátem *E. cuniculi* genotyp III, jež byl získán ze psů nebo králíků, nevyvolala akutní infekci, nýbrž chronickou asymptomatickou infekci

(van Dellen a kol., 1989; Didier a kol., 1994). Tento fakt ukazuje na to, že rozdíly v průběhu infekce způsobené genotypem III nezáleží pouze na imunologickém stavu hostitele, jak bylo také úspěšně dokázáno na myším modelu (Kotková a kol., 2013, 2017). Mnoho dalších faktorů jako je genotyp mikrosporidie, věk hostitele nebo způsob infekce může ovlivnit průběh a dopad infekce na hostitelský organizmus.

1.4. Diagnostika mikrosporidií

Diagnostika mikrosporidií je buď přímá, založená na demonstraci mikrosporidiálních spor nebo mikrosporidiální DNA v biologických vzorcích (stolice, moč, histologické preparáty, apod.), nebo nepřímá, založená na stanovení specifických protilátek v krvi.

1.4.1. Transmisní elektronová mikroskopie

Jak známo, všechny mikrosporidie vytvářejí spory odolné vnějšímu prostředí. Zlatým standardem pro diagnózu mikrosporidiózy, respektive mikrosporidiálních spor, zůstává transmisní elektronová mikroskopie (TEM), pomocí které můžeme vizualizovat pólovou trubici a další kmenově nebo druhově specifické ultrastrukturální charakteristiky (Orenstein a kol., 1992). Avšak z důvodu časové náročnosti a nutnosti drahého vybavení a kvalifikace pracovníků laboratoře pro zpracování vyšetřovaného materiálu nebývá TEM první volbou při vyšetřování příčin onemocnění (Franzen a Müller, 1999; Weber a kol., 2000).

1.4.2. Barvicí metody

Nejvíce rozšířenou a nejlépe použitelnou metodou pro stanovení spor mikrosporidií je použití světelného mikroskopu. Ovšem spory měří od 1 do 20 μm a nejsou dostatečně barveny běžnými barvicími technikami (Giemsa, Gramovo barvení nebo hematoxylin-eosin) používanými v parazitologických a patologických laboratořích. Při nízkém počtu parazitů ve vzorku nemusí vůbec dojít k jejich zachycení. Proto mikroskopická vizualizace tohoto parazita vyžaduje speciální barvicí metody a adekvátní mikroskopickou techniku (především fluorescenční mikroskop). Tyto metody zahrnují barvení histologických preparátů, vzorků stolice, moči či jiných tělních tekutin.

Modifikované metody barvení trichromem (Weber-Green nebo Ryan-Blue) jsou založeny na skutečnosti, že barva prochází do spory velmi obtížně. Proto se používá větší koncentrace chromotropu 2R a doba barvení je mnohem delší než u běžných barvicích metod (Garcia, 2002). Stěna spor získá barvu od růžové po fialovou, ale vnitřek spory zůstává neobarvený, případně se může objevit horizontální nebo diagonální pruh, který představuje pólovou trubici (Garcia, 2002).

Chemofluorescentní barviva Calcofluoru White M2R, Uvitex 2B nebo Fungifluour (Franzen a Müller, 1999, 2001), se váží na chitin, jež je součástí stěny spory, a spory se poté ve fluorescenčním mikroskopu jeví jako bílé nebo tyrkysové při použití excitačního filtru 350–440 nm. Ovšem kvasinky také obsahují chitin a barvení s chemofluorescentními barvičkami může vést k falešně pozitivním výsledkům, především ve vzorcích trusu a stolice. Proto se doporučuje používat chemofluorescentní barvení spolu s tradičními histologickými barvenými (barvení modifikovaným trichromem) pro získání lepší senzitivity a specifity vyšetření (Weber a kol., 1992). Spory mikrosporidií se tak barví růžově proti modrému nebo zelenému pozadí a lze v nich pozorovat zadní vakuolu, jež se barví světlejším odstínem růžové a centrální část odpovídající pólové trubici je naopak tmavší, což je jasný ukazatel pro odlišení mikrosporidií od kvasinek.

Ačkoli jsou tyto metody mnohem vhodnější pro detekci mikrosporidií ze vzorků tělních tekutin a tkání než TEM, rozlišení rodu nebo druhu není tímto vyšetřením možné.

1.4.3. Stanovení antigenu

Dalším způsobem diagnostiky spor a zároveň druhové určení mikrosporidií může být rovněž provedeno pomocí nepřímé imunofluorescence (Accoceberry a kol., 1999; Sheoran a kol., 2005). Principem metody je navázání monoklonálních nebo polyklonálních protilátek na antigen (povrchové struktury mikrosporidií). Jejich vizualizace je provedena další inkubací se sekundárními protilátkami značenými fluorochromy. Monoklonální protilátky (protilátky získané z buněčné kultury) jsou druhově specifické proti proteinům ve stěně spor a proteinům pólové trubice parazita (Beckers a kol., 1996), a v současné době jsou dodávány ve formě laboratorních kitů. Naproti tomu polyklonální protilátky (protilátky izolované ze séra imunizovaného zvířete, jsou zacílené proti různým epitopům, a pravděpodobně obsahují další, nespecifické protilátky, a proti *E. hellem*, *E. cuniculi* a *E. intestinalis* vykazují

imunologicky zkříženou reaktivitu (Aldras a kol., 1994; Ombrouck a kol., 1995). Navíc, tato technika zobrazování spor v biologickém materiálu je ze všech nejméně citlivá. Didierová a kol. (1995a) srovnávala chromotropní barvení, barvení pomocí Calcofluoru a detekci polyklonálními protilátkami. Metoda stanovení mikrosporidiálních spor ve vzorcích stolice, moči a duodenální tekutiny pomocí nepřímé imunofluorescence byla nejméně senzitivní.

1.4.4. Molekulární metody

Molekulární diagnostika je stále více využívána, protože dovoluje detekci velmi malého množství spor (prahová hodnota je 10^2 spor/g fekálního materiálu) nebo jiného stádia parazita, které by nebylo možné stanovit pomocí mikroskopu (cut off pro mikroskopii je 10^4 až 10^6 spor na gram vzorku).

V PCR se cílová DNA patogena váže speciálně navrženým setem primerů a opakovaně se kopíruje v přítomnosti nukleotidů a termostabilního polymerázového enzymu. Výsledkem je obrovské množství kopií původní sekvence DNA (amplikony). Těchto amplikonů se dále využívá pro stanovení pořadí nukleotidů v konkrétním úseku DNA, vytváření fylogenetických stromů nebo k analýze jednotlivých genů.

Pro detekci a druhové určení mikrosporidií se nejčastěji používají fylogeneticky konzervované primery amplifikujících malou podjednotku rRNA, velkou podjednotku rRNA a ITS region. Tyto lokusy představují nejčastěji používaný cíl PCR, poněvadž na rozdílech v jejich sekvenci je založeno rozlišení jednotlivých genotypů v rámci rodu *Encephalitozoon* (Weiss a Vossbrinck, 1999). Některé publikace popisují detekci mikrosporidií pomocí real-time PCR (RT-PCR) (Wolk a kol., 2002; Menotti a kol., 2003a,b; Verweij a kol., 2007). RT-PCR detekuje zvyšování počtu amplikonů v reálném čase buď pomocí interakce s fluorescentní barvičkou nebo fluorescenčně značenou proubou. RT-PCR je jednorovná analýza, jež nevyžaduje další postamplifikační procesy, což snižuje riziko kontaminace, které je mnohem vyšší u nested PCR (Monis a Giglio, 2006).

1.4.5. Stanovení protilátek

Serologické testy jako jsou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), Western Blot nebo IFA (indirect immunofluorescence assay) umožňují detekovat cirkulující protilátky v těle hostitele a patří mezi tzv. testy nepřímé (nestanovuje se patogen jako takový, ale imunitní odpověď hostitelského organismu). V současné době se tato metoda nedoporučuje používat pro diagnostiku mikrosporidiových infekcí z důvodu variabilní exprese protilátek u imunokompetentních jedinců, neschopnosti rozlišit mezi akutní (IgM protilátky) a prodělanou infekcí (IgG protilátky) (Bergquist a kol., 1984), vysoké prevalence anti-mikrosporidiálních protilátek ve zjevně zdravé, imunokompetentní populaci (van Gool a kol., 1997; Sak a kol., 2010), a kvůli zkřížené reaktivitě protilátek mezi různými druhy mikrosporidií (Aldras a kol., 1994; Didier a kol., 1995a). Nicméně, tyto serologické analýzy mohou být užitečné pro diagnózu subklinických infekcí potenciálních dárců orgánů nebo pacientů, kteří mohou být vystaveni riziku reaktivace infekce po imunosupresi. Tato metoda také není vhodná pro vyšetřování imunodeficitních jedinců, protože mají sníženou nebo nespecifickou protilátkovou odpověď (Weber a kol., 2000; Garcia, 2002).

1.5. Přenos mikrosporidií

Mikrosporidie mají celosvětové rozšíření a mohou být nalezeny u téměř každého živočišného druhu. Z celkového počtu přes 1300 druhů mikrosporidií klasifikovaných v kmenu Microsporidia, jsou mikrosporidie nejčastěji popisovány jako původci onemocnění u hmyzu, ptáků a ryb. U 17 druhů je známo, že způsobují infekce člověka (Franzen a Müller, 2001; Didier, 2005; Fayer a Santin-Duran, 2014).

Dřívější znalosti o lidské mikrosporidioze a její epidemiologii byly omezené z důvodu obtížné identifikace malých spor světelnou mikroskopií. První lidské infekce začaly být popisovány jako sporadické reporty ve dvacátých letech dvacátého minulého století. Pravděpodobně úplně prvním zaznamenaným případem lidské mikrosporidiové infekce bylo nález agens označeného jako *Encephalitozoon chagasi* u novorozeněte (Torres, 1927). Většina autorů jako první případ lidské mikrosporidie citují případ chlapce, který trpěl křečemi a byl u něj diagnostikován *Encephalitozoon* sp. (Matsubayashi a kol., 1959). Sporadické případy výskytu lidských mikrosporidíóz byly detekovány až do vypuknutí pandemie AIDS. Zájem o

mikrosporidie vzrostl, když byl v enterocytech AIDS pacienta nalezen do té doby nepopsaný *Enterocytozoon bieneusi* (Desportes a kol., 1985) a v kosterním svalstvu dalšího pacienta s AIDS byl nalezen neznámý druh mikrosporidie (Ledford a kol., 1985). Studium těchto a jim podobných případů pomohlo získat informace o epidemiologii mikrosporidií, což se dále odráželo v léčebných postupech a politice veřejného zdraví.

Většina mikrosporidiových infekcí je důsledkem fekálně-orálního přenosu spor, většinou způsobený požitím kontaminovaného jídla nebo vody od infikovaných zvířat nebo lidí (Didier a Weiss, 2011). Lidské patogenní mikrosporidie jako *E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem* a *Vittaforma corneae* byly detekovány v odpadních vodách, zavlažovací i pitné vodě (Dowd a kol., 1998; Thurston-Enriquez a kol., 2002; Coupe a kol., 2006). Relativně málo studií bylo provedeno na přítomnost mikrosporidií v jídle (Calvo a kol., 2004; Jedrzejewski a kol., 2007; Kváč a kol., 2016; Sak a kol., 2019). Byl popsán jeden případ propuknutí mikrosporidie způsobené *E. bieneusi* spojené s kontaminovaným jídlem servírovaným na konferenci (Decraene a kol., 2012). Nedávné studie také poskytly důkazy o přítomnosti spor mikrosporidií *E. cuniculi* v čerstvém kravském mléce (Kváč a kol., 2016) a ve vepřovém mase (Sak a kol., 2019), a zároveň tyto studie upozorňují na neúčinnost pasterizace mléka, respektive fermentace uzenin podle tradičních postupů.

Přenos mikrosporidií může být uskutečněn také přímým kontaktem přes poraněnou kůži, okem, inhalací spor, sexuálním přenosem nebo transplantací orgánu od infikovaného dárce (Bryan a Schwartz, 1999; Didier a Weiss, 2011; Ditrich a kol., 2011; Hocevar a kol., 2014). Nezanedbatelná cesta přenosu je vertikální (kongenitální, transplacentální) přenos. Tento způsob přenosu mikrosporidií nebyl dosud pozorován u člověka, ale byl popsán u primátů a dalších jiných savců.

1.5.1. Transplacentální přenos

Transplacentální přenos mikrosporidie *E. cuniculi* z matky na potomky byl doposud popsán u hlodavců, masožravců (lišky a psi), koní a primátů. Mnoho publikací popisujících možný přenos parazita přes placentu se opírá o nepřímé důkazy, jako je průkaz protilátek u mláďat, nebo bylo využito histologických preparátů (Anver a kol., 1972; Owen and Gannon, 1980; van Rensburg a kol., 1991). Podle Owena a Gannona (1980) monitorování hladin protilátek u mláďat nepřináší žádný

důkaz o tom, že se jedná o kongenitální přenos. Zvýšené titry protilátek u mláďat jsou podle nich spíše důsledkem přenosu protilátek mateřským mlékem.

Mnoho studií při vyšetřování mikrosporidie u mláďat také nebere v úvahu možnou kontaminaci prostředí a tedy horizontální přenos infekce po narození (Perrin, 1943; Innes a kol., 1962). Je známo, že nejčastější cesta přenosu infekce je fekálně-orální, tedy infekce sporami, jež nakažený jedinec vylučuje močí nebo výkaly. Pouze tři publikace zabývající se transplacentálním přenosem mikrosporidií popisují přísně aseptické prostředí a postup získání vyšetřovaných mláďat pomocí císařského řezu. Nálezy encephalitozoonózy u těchto gnotobiotických zvířat silně podporuje teorii kongenitálního přenosu parazita (Hunt a kol., 1972; Boot a kol., 1988; Kotková a kol., 2018).

Mnoho dalších publikací popisovalo experimentální nebo přirozený transplacentální přenos u širokého spektra savců. V některých případech byly popisovány neurologické poruchy u neonatálních mláďat, u jiných naopak nebyly pozorovány žádné příznaky, ale histopatologické vyšetření potvrdilo infekci způsobenou *E. cuniculi*. Stručný popis případů u některých skupin vyšších obratlovců následuje:

Myši

Vertikální přenos mikrosporidie *E. cuniculi* u myší není příliš často zkoumán, o čemž svědčí i malé množství publikací (Perrin, 1943; Innes a kol., 1962; Wilson, 1986). Navíc výsledky jednotlivých experimentů se mezi sebou liší v názoru, zda *E. cuniculi* prochází myší placentou či nikoli. Některé z nich vyvrátily tvrzení o vertikálním přenosu a přikláněly se k možné infekci z kontaminovaného prostředí (Owen a Gannon, 1980; Wilson, 1986), jiné předpokládají, že zvířata mohla být nakažena pouze přes placentu (Perrin, 1943; Innes a kol., 1962).

Králíci

První zprávy o možném vertikálním přenosu mikrosporidií u králíků měly protichůdné výsledky. Především Owen a Gannon (1980) tvrdili, že zvýšené titry protilátek proti mikrosporidii rodu *Encephalitozoon* u mláďat králíků jsou způsobené přenosem protilátek z matky přes mateřské mléko. Důkazem byl fakt, že protilátky z krve mláďat vymizely, jakmile byla odstavena. Cox a kol. (1977) a Hunt a kol. (1972) našli u mláďat králíků léze na mozku způsobené mikrosporidiovou infekcí,

ovšem Owen a Gannon (1980) se domnívají, že jde o infekce z kontaminace prostředí. Jiné publikace popisují přenos parazita *in utero* u králíků, jež byly získány císařským řezem (Innes a kol., 1962; Hunt a kol., 1972; Baneux a Pognan, 2003). V případě, že připustíme možný přestup parazita přes placentu, není stále ověřeno, jak častý a důležitý je tento způsob přenosu parazita u přirozených infekcí králíků.

Psi

Experimentálně byl prokázán transplacentální přenos mikrosporidie *E. cuniculi* z asymptomatických fen na štěňata, a je celkem možné, že se jedná o běžný způsob nákazy štěňat (Plowright, 1952; Stewart a Botha, 1989; McInnes a Stewart, 1991; Snowden a kol., 2009). V roce 1952, Plowright popsal syndrom granulomatózní encefalitidy a nefritidy u dvou vrhů štěňat, a na základě histopatologického vyšetření identifikoval mikrosporidii *E. cuniculi* (Plowright, 1952; Plowright a Yeoman, 1952). Ve zprávě z roku 1966 z Jihoafrické republiky Basson a kol. (1966) popisovali podobné histopatologické nálezy u jednoho vrhu štěňat, ovšem v publikaci použili starší označení pro *E. cuniculi*, *Nosema cuniculi* (Basson a kol., 1966). V roce 1978 byla zdokumentována první spontánní infekce způsobená *E. cuniculi* u štěňat beagla ve Spojených Státech (Shaddock a kol., 1978). Neurologické znaky onemocnění zahrnovaly anorexii, třes přecházející v křeče, slabost a bolestivé vytí. Následná pitva uhynulých štěňat odhalila encefalitidu a nefritidu. V lézích postižených orgánů byly pozorovány protozoální organizmy a v séru infikovaných štěňat a jejich rodičů byly pomocí nepřímé imunofluorescence nalezeny protilátky proti *E. cuniculi*. Snowden a kol. (2009) popsal sérii 19 případů mikrosporidie u štěňat s fatálními důsledky. Tato štěňata trpěla nechutenstvím a měla progresivní neurologické příznaky. Histopatologické vyšetření ukázalo mozkové a renální léze. Následnou molekulární analýzou byla u 13 z nich potvrzena identita patogenů jako *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III.

Polární lišky

U polárních lišek bylo provedeno několik experimentů, při kterých byla zvířata orálně nebo intrauterinně infikována mikrosporidií *E. cuniculi* (Nordstoga a kol., 1978; Mohn a kol., 1982; Mohn a Nordstoga, 1982; Akerstedt, 2003). U samic se zřídka rozvinuly klinické příznaky, přesto u nich infekce zůstala v subklinickém stavu, což mohlo být zdrojem infekce, která byla poté transplacentálně přenesena na

mláďata i několik let po prvotní infekci (Mohn a kol., 1974; Nordstoga a kol., 1978). Zdá se proto, že hlavní cesta infekce mladých zvířat, u kterých byly zaznamenány jasné projevy infekce, je přes placentu. Typické pro tyto případy je, že většina nebo všechna liščata z vrhu onemocněla a uhynula, přestože matka zůstala asymptomatická (Arnesen a Nordstoga, 1977). U přirozených infekcí dochází k serokonverzi klinicky nemocných liščat v případě, že žijí dostatečně dlouho, a asymptomatická mláďata se mohou (ovšem nemusí) stát seropozitivními (Mohn a Nordstoga, 1982).

Domácí kočky

Pouze několik kazuistik dokumentuje mikrosporidiové infekce u domácích koček. Van Rensburg a du Plessis (1971) popisovali neurologické onemocnění u tří koťat z jednoho vrhu Siamské kočky. Koťata trpěla křečemi a záškuby svalů. Histopatologické vyšetření jednoho z nemocných koťat odhalilo především na mozku a v ledvinách diseminovanou infekci *E. cuniculi* (v článku označenou jako *Nosema cuniculi*). Další menší léze byly pozorovány na slezině a v lymfatických uzlinách. Tyto nálezy encefalitidy a nefritidy jsou podobné těm, které byly popsány u štěňat (Plowright 1952). Relativně nedávná zpráva zase popisovala případ kotěte s mozkovou hyperplázií a generalizovanou encephalitozoonózou. Diagnostika byla provedena pomocí histopatologie, a následně potvrzena molekulární analýzou. Obě metody potvrdily, že *E. cuniculi* je původce onemocnění (Rebel-Bauder a kol., 2001).

Koně a malí přežvýkavci

Doposud byly popsány tři případy potratu a úhynu plodu u koní, jež byly připisovány infekci *E. cuniculi* (van Rensburg a kol., 1991; Patterson-Kane a kol., 2003; Szeredi a kol., 2007). Ve dvou případech došlo k potratu, jež byl způsoben placentitidou. Histologické vyšetření placenty ukázalo rozsáhlý zánět obsahující buňky s intracelulárními parazity uvnitř (Patterson-Kane a kol., 2003; Szeredi a kol., 2007). Ovšem ve tkáni plodu nebyl nalezen žádný důkaz mikrosporidiové infekce. Naproti tomu v případě z roku 1991 byla placenta histologicky normální, ale plod vykazoval lymfoplasmatickou intersticiální nefritidu (van Rensburg a kol., 1991). V postižených ledvinách bylo přítomno mnoho organismů připomínajících *E. cuniculi*. Tyto organismy se vyskytovaly v oblastech zánětu, v renálních glomerulech

a intracelulárních cystách epiteliálních buněk renálního tubulu. Barvily se Gramovo barvením a některé ultrastruktury jako polární vakuola a spirálovité pólové vlákno bylo mikroskopicky rozlišitelné.

Pouze jediný případ potratu způsobený mikrosporidii *E. cuniculi* byl zaznamenán u alpaky (*Lama pacos*). Placentitida, předčasný porod a perinatální úmrtí byly důsledkem mikrosporidie stejně jako v případě potratů popsaných u koní (Webster a kol., 2008). Ovšem mikroskopické vyšetření neodhalilo žádné mikroorganismy v žádném vyšetřovaném vzorku tkáně, kromě placenty.

Primáti

Velký množství zpráv o nálezu mikrosporidii u mláďat primátů indikuje, že mikrosporidiové infekce nejsou u opů vzácností. Například ve Spojených státech byla popsána diseminovaná přirozená infekce, která vyústila ve vysokou morbiditu a vážnou encefalitidu u mrtvě narozených mláďat nebo velmi mladých jedinců kotula veverovitého (*Saimiri sciureus*). Tato infekce byla způsobena mikrosporidii rodu *Encephalitozoon* (Brown a kol., 1973; Zeman a Baskin, 1985). Neuropatologické symptomy podporovaly domněnku, že jde o infekci *E. cuniculi*, což bylo potvrzeno identifikováním parazita pomocí elektronové mikroskopie. Relativně nedávno byl identifikován *E. cuniculi* genotyp III jako příčina vážné diseminované infekce, která vyústila ve smrt mláďat v kolonii tamarinů vousatých (*Saguinus imperator*), tamarinů pinčích (*Saguinus oedipus*) a lvíčka zlatého (*Leontopithecus rosalia rosalia*) ve dvou evropských Zoo (Guscetti a kol., 2003; Reetz a kol., 2004). Dále byla diagnostikována diseminovaná encephalitozoonóza u 2 mladých sourozenců tamarinů pinčích (*Saguinus oedipus*), 3 neonatálních tamarinů vousatých (*S. imperator*) a mláděte kotula veverovitého (*Saimiri sciureus*), který byl starý necelých 24 hodin (Anver a kol., 1972; Juan-Sallés a kol., 2006). U tamarinů pinčích a mláděte kotula byly nalezeny léze převážně v centrální nervové soustavě. Pomocí histologických preparátů, světelné a elektronové mikroskopie byl parazit diagnostikován jako mikrosporidie rodu *Encephalitozoon*. U tamarinů byly nálezy potvrzeny pomocí PCR a sekvenací dourčeny jako *E. cuniculi* genotyp III. Navíc, matky tamarinů vousatých byla seropozitivní na *E. cuniculi*.

Van Dellen a kol. (1989) provedli experimentální infekce u kočkodanů (*Cercopithecus pygerythrus*) pomocí mikrosporidie *E. cuniculi* genotyp III, jež byla izolována z ledvin psa s přirozenou fatální infekcí tímto parazitem. Zároveň byl také

zkoumán přenos infekce *E. cuniculi* III z infikovaných mláďat na jejich matky a také z matek na potomky přes placentu. Následné pitvy prokázaly infekce u všech testovaných opic. Granulomatózní léze různé velikosti byly nalézány v játrech, v ledvinách a na mozku, a byly podobné těm, jež byly u psa. Pro potvrzení patogenního agens byly experimentálně navozené infekce reizolovány a převedy do buněčné kultury, nebo byly v tkáňových preparátech sledovány spory. Obě metody byly podpořeny výsledky serologických vyšetření.

1.6. Mikrosporidiové infekce vs. imunita

Mikrosporidie patří mezi parazity, u kterých se často setkáváme s rovnováhou ve vztahu parazit-hostitel u imunokompetentního hostitele, což vede k tomu, že se onemocnění jeví jako bezpříznakové, přestože parazit v těle hostitele perzistuje (Didier a kol., 2000; Vávra a Lukeš, 2013). Pokud dojde k posunu rovnováhy směrem k imunitní nedostatečnosti nebo naopak k hyperimunitní odpovědi, projeví se krom jiného i klinické příznaky onemocnění způsobené mikrosporidii, jež mohou vést až k smrti hostitele (Franzen a kol., 1995; Franzen, 2008).

Většina faktů, jež je známá o imunitní odpovědi proti mikrosporidii, byla získána díky experimentům na různých kmenech myší, především na BALB/c, C57Bl/6 a kmenech myší od nich odvozených. U imunokompetentních kmenů myší se po infekci *E. cuniculi* vyvine ascites, který posléze vymizí (Canning a kol., 1986), ale vytvoří se latentní persistence mikrosporidií v těle hostitele (Kotková a kol., 2013). U imunodeficitních kmenů myší (SCID a athymické myši) se po experimentální infekci vytvoří letální onemocnění, které je obvykle manifestováno ascitem s rozsevem spor v těle hostitele (Gannon, 1980b; Schmidt a Shaddock, 1983, Kotková a kol., 2103).

Intracelulární parazitizmus mikrosporidií je dán zejména jejich schopností uniknout nitrobuněčným mechanismům zabíjení fagocytujícími buňkami. Pohlcením mikrosporidií makrofágy vede k produkci IL-12, který směřuje k diferenciaci prekurzorů T_H lymfocytů na podtyp T_H1 , produkující IFN- γ . Tento cytokin aktivuje makrofágy a mimo jiné v nich indukují enzym iNOS (indukovatelná syntetáza oxidu dusnatého). Tento enzym produkuje z argininu vysoce baktericidní oxid dusnatý (NO). K aktivaci makrofágů přispívají i protilátky třídy IgG, které jsou pod vlivem IFN- γ syntetizovány plasmatickými buňkami. Imunokomplexy obsahující tyto protilátky se dobře váží na Fc-receptory makrofágů, a tím je stimulují. V případě,

kdy mikrosporidie uniknou z fagolysozomu do cytoplasmy, se uplatňují i cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty, které rozeznávají komplexy peptidových fragmentů patogena s MHC gp I na povrchu infikované buňky. CD4⁺ T lymfocyty zase pomáhají v aktivaci CD8⁺ T lymfocytů (Valenčáková a Halanová, 2012).

1.6.1. Vrozená imunitní odpověď

Vrozená imunitní odpověď nastupuje vždy v první linii v boji proti patogenům, je nespecifická a často vyvolává zánět. Makrofágy, dendritické buňky, složky komplementu a NK buňky jsou indukovány během časně fáze mikrosporidiové infekce a pomáhají k přechodu od vrozené k adaptivní imunitní odpovědi (Hořejší a Bartůňková, 2005).

1.6.1.1. Makrofágy

Makrofágy jsou součástí časně vrozené imunitní odpovědi. Dokáží rychle rozpoznat „vetřelce“ pomocí několika tříd receptorů, včetně PRR (Pattern recognition receptor, v překladu receptory rozeznávající molekulové vzory), na jejich povrchu. Důsledkem toho dochází k produkci hostitelských obranných mediátorů včetně chemokinů, cytokinů, oxidu dusnatého (NO) a NO-syntázy. IFN- γ produkovaný aktivovanými T lymfocyty dává makrofágům signál k zabití intracelulárních patogenů pomocí oxidačního vzplanutí. Pokud se mikrosporidii podaří vyhnout se všem těmto protektivním mechanismům, poslouží makrofág jako tzv. Trojský kůň a roznese mikrosporidie v těle hostitele (Mathews a kol., 2009).

Ačkoli se mikrosporidie dostávají do hostitelských buněk především penetrací buněčné membrány pomocí pólové trubice, fagocytóza je další možností vstupu do buňky (Franzen, 2004). Ovšem procesy následující po fagocytóze mohou ovlivnit schopnost parazita přežít uvnitř makrofágu. Dřívější studie tvrdily, že mikrosporidie jsou schopné inhibovat fúzi fagozomu s lysozomem (Couzinet a kol., 2000), ale novější studie ukázaly, že spory jsou nalézány ve fagolysozomu u profesionálních i neprofesionálních fagocytů (Franzen a kol., 2005). Nicméně po dalším zkoumání procesů následujících bezprostředně po fagocytóze se ukázalo, že spory, které zůstanou ve fagolysozomu jsou zabity. Pouze ty, které uniknou z endozomu do cytoplasmy pomocí pólové trubice jsou schopné přežít a dokončit svůj vývojový cyklus uvnitř makrofágu (Franzen a kol., 2005).

Aby makrofág dokázal účinně ničit intracelulární parazity, je potřeba, aby se změnil v aktivovaný makrofág. Pro tuto přeměnu jsou nezbytné cytokiny produkované T_H1 -buňkami (především $IFN-\gamma$), a naopak pro vznik a pomnožení zralých T_H1 -buněk je nezbytný styk s infikovanými nebo jinak aktivovanými makrofágy (Hořejší a Bartůňková, 2005).

1.6.1.2. $IFN-\gamma$

Jak již bylo výše řečeno, $IFN-\gamma$ je důležitý aktivátor makrofágů a má zásadní význam pro přirozenou i získanou imunitu proti intracelulárním patogenům. Jeho nedostatečná tvorba vede k celé řadě zánětlivých onemocnění (Schoenborn a Wilson, 2007). Tento cytokin je produkován především NK buňkami a NKT buňkami, jež jsou součástí vrozené imunitní odpovědi, a v pozdější fázi imunitní odpovědi $CD4+$ a cytotoxickými $CD8+$ T lymfocyty (Salát a kol., 2001).

Významným důsledkem aktivace makrofágů $IFN-\gamma$ je produkce oxidu dusného (NO), jakožto mikrobicidního prostředku fagocytů. Zároveň však byla popsána $IFN-\gamma$ zprostředkovaná ochrana před infekcí *E. cuniculi* nezávislá na produkci NO. V rámci tohoto pokusu byly použity myši s defektním genem pro NO syntetázu, které přežily infekci *E. cuniculi* stejně jako myši s funkčním genem. Pokud však byla imunokompetentním myším aplikována protilátka k neutralizaci $IFN-\gamma$, myši infekci podlehly (Khan a Moretto, 1999).

Sérií experimentů byl dále prokázán protektivní účinek $IFN-\gamma$. Jestliže SCID myším, jež byly per orálně infikovány sporami *E. cuniculi*, byl podán $IFN-\gamma$ nebo $CD4+$ T lymfocyty z imunokompetentních myší, jejich doba přežití se prodloužila. Pokud ovšem tyto myši dostaly $CD4+$ T lymfocyty z $IFN-\gamma$ -deficitních myší, nemělo to žádný efekt (Salát a kol., 2008).

1.6.2. Adaptivní imunitní odpověď

Adaptivní imunita vstupuje do hry v pozdější fázi mikrosporidiové infekce, kdy přítomnost molekul z patogenních mikroorganismů aktivuje přes specifické antigenní imunoreceptory příslušné klony T a B lymfocytů. Jedná se buď o nativní soubor molekul patogena pro B lymfocyty, nebo krátký naštěpený antigenní materiál prezentovaný pro T lymfocyty pomocí MHC komplexu na antigen prezentujících buňkách. Po této aktivaci lymfocytů dochází k jejich klonální expanzi. T

lymfocyty představují v rámci adaptivní imunity složku buněčné imunity, zatímco B lymfocyty produkující protilátky jsou účinné nástroje humorální imunity (Sompayrac, 2015).

1.6.2.1. Buněčná imunita

Buněčná imunita představuje důležitou roli v boji proti letální encephalitozoonóze. Tato odpověď je aktivovaná T_H lymfocyty nesoucími receptor $CD4+$ (charakteristické zejména produkcí řady cytokinů regulujících jiné buňky) a T_C lymfocyty s receptorem $CD8+$ (zvané též CTL; charakteristické hlavně schopností cytotoxicky zabíjet jiné buňky). Bylo pozorováno, že adoptivní přenos T lymfocytů ze splenocytů imunokompetentních myší ochránilo athymické BALB/c (nu/nu) myši nebo SCID myši infikované mikrosporidii rodu *Encephalitozoon* před smrtí (Schmidt a Shadduck 1984; Heřmánek a kol., 1993).

Ochrannou funkci proti mikrosporidiovým infekcím u myší mají především $CD8+$ T lymfocyty, $CD4+$ hrajou v protektivní imunitě mnohem menší roli (Moretto a kol., 2000; Salát a kol., 2002; Ghosh a Weiss, 2012). To bylo potvrzeno experimenty na laboratorních myších, kdy u imunitně suprimovaných zvířat (na genetickém základu – SCID myši, nebo farmakologicky) se vyvinula fatální diseminovaná infekce (Koudela a kol., 1993; Kotková a kol., 2013). Následnými experimenty bylo zjištěno, že SCID myši je možno ochránit před vznikem letální infekce adoptivním přenosem naivních splenocytů obsahujících funkční $CD8+$ T lymfocyty (Braunfuchsová a kol., 2001; Khan a kol., 1999).

Jak již bylo řečeno, zejména $CD8+$ T lymfocyty jsou rozhodující při protektivní ochraně proti encephalitozoonóze, jak bylo demonstrováno na $CD8$ knockout myších, které infekci podlehly (Sak a kol., 2017; Khan a kol., 1999). Cytokiny sekretované tímto subtypem T lymfocytů jsou také součástí obranného mechanismu proti infekci, ovšem mnohem pravděpodobněji je to jejich přímá cytotoxicita, jež je rozhodující. Důkazem toho byla infekce myší, jež měly deficit tvorby perforinu, jehož funkce je v cytolytické aktivitě T lymfocytů. Tyto myši mikrosporidiové infekci podlehly (Khan a kol., 1999).

Ve většině případů jsou $CD8+$ T lymfocyty inicializovány pomocí IL-2, který produkují $CD4+$ T lymfocyty (Smith, 1988). Nicméně, i v nepřítomnosti $CD4+$ T lymfocytů jsou $CD8+$ T lymfocyty schopny se během infekce aktivovat (Binder a

Kundig, 1991). V takovém případě přealy jejich roli $\gamma\delta$ T lymfocyty (Moretto a kol., 2001; Moretto a kol., 2004).

Jak již bylo řečeno, absence CD4⁺ T lymfocytů u knockout myši nevede ke smrti zvířat infikovaných mikrosporidii *E. cuniculi*. Ovšem je zajímavé, že pokud klesne počet CD4⁺ T lymfocytů u pacienta s HIV pod hranici 100 buněk/mm³ krve, propuknou klinické příznaky mikrosporidie (Valenčáková a Halanová, 2012). Nicméně, experimentální studie provedených na myších ukázaly, že CD4⁺ T lymfocyty nejsou krucální pro přežití myši infikovaných *E. cuniculi* (Moretto a kol., 2001; Salát a kol., 2006).

1.6.2.2. Humorální imunita

Představiteli humorální imunity jsou B lymfocyty a jimi produkované protilátky. Protilátky jsou produkty plasmatických buněk, které se diferencují z B lymfocytů po setkání s antigenem. Protilátky jsou glykoproteiny zvané imunoglobuliny. Mají strukturu molekuly uspořádané do tvaru Y. Rozvětvená část se nazývá variabilní a na ni se váže antigen. Variabilní část určuje specifitu protilátky, tj. proti jakému antigenu je namířena. Druhá část protilátky se nazývá konstantní (Fc fragment) a podle ní se rozlišuje pět tříd (izotypů) imunoglobulinů: G, M, A, D a E. Části Fc se protilátka váže na buňky, které mají pro ni receptor (granulocyty, buňky NK a makrofágy), a pomáhá tak odstraňovat navázané cizorodé látky (Šterzl, 1993).

Jako první se v imunitní reakci tvoří izotyp IgM. K produkci tohoto izotypu nepotřebují lymfocyty B pomoc od lymfocytů T. V další fázi imunitní reakce se tvoří IgG po kontaktu B lymfocytu s příslušným T lymfocitem. Protilátky IgG mají vyšší schopnost vázat antigen a přetrvávají v organismu dlouhou dobu jako produkt paměťové imunitní reakce.

Imunoglobuliny obsažené v séru představují sumu různých protilátek proti nejrozličnějším antigenům, se kterými se jedinec v průběhu života setká. V séru je nejvíce zastoupen izotyp IgG. Přestupuje i do intersticiálního prostoru a také placentou do plodu, kde chrání novorozence do doby, než začne tvořit vlastní protilátky. Hlavní úloha imunoglobulinu A není v séru, ale na sliznicích a v tělních sekretech (mateřské mléko, sliny, sekrety dýchacích cest a dalších sliznic). Tento imunoglobulin má za úkol neutralizovat antigeny, které se dostanou na sliznice. Imunoglobulin M se v séru objevuje při akutních infekcích. Imunoglobulin E je za fyziologických okolností jen nepatrným množstvím a jeho koncentrace se zvyšuje při

parazitárních chorobách a alergiích. Úloha imunoglobulinu D je vázána zejména na lymfocytech B, kde je zakotven v membráně a tvoří receptor pro antigen (Hořejší a Bartůňková, 2005; Sompayrac, 2015).

Humorální imunita se uplatňuje především v obraně proti extracelulárním patogenům. Složky humorální imunity působí jako opsoniny, tj. látky, které vazbou na mikroba usnadňují jeho pohlcení fagocytujícími buňkami. Dále mají protilátky schopnost vázat komplement, který se tímto aktivuje a způsobí rozpad mikroorganismu, na nějž se komplex protilátky a komplementu naváže. Mikroorganismus může být také zničen cytotoxickým lymfocitem nebo makrofágem. Protilátka zprostředkuje kontakt mezi těmito dvěma buňkami (tzv. reakce ADCC, buněčná cytotoxicita zprostředkovaná protilátkami) (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Bylo zjištěno, že adoptivní přenos B lymfocytů nebo hyperimunního séra do athymických BALB/c (nu/nu) myší nebo do SCID myší neochránilo tato zvířata před rozvojem letální encephalitozoonózy. Nicméně byla sledována silná protilátková odpověď proti různým antigenům mikrosporidií a mnoho těchto protilátek mělo zkříženou reaktivitu s jinými druhy mikrosporidií (Cox a kol., 1979; Schmidt a Shaddock, 1983). U 5 až 50 % lidí z vyšetřované populace byly nalezeny protilátky proti různým druhům mikrosporidií (van Gool a kol., 1997; Kučerová-Pospíšilová a Ditrich, 1998; Sak a kol., 2011). Také bylo pozorováno, že novorozená mláďata králíků jsou proti infekci *E. cuniculi* chráněna po dobu dvou týdnů mateřskými protilátkami (Bywater a Kellett, 1979). Experimenty *in vitro* prokázaly, že infectivita mikrosporidií klesá po ošetření imunním sérem a komplementem (Schmidt a Shaddock, 1984; Sak a kol., 2004), monoklonálními protilátkami proti povrchu spor mikrosporidií (mAb 3B6) nebo po inkubaci s monoklonálními a polyklonálními protilátkami proti proteinům pólové trubice (PTP1). Je tedy vysoce pravděpodobné, že protilátky hrají roli při eliminaci infekce, avšak samy nejsou schopny předejít mortalitě nebo vyléčit infekci (Sak a kol., 2006).

1.7. Modelové organizmy pro studium imunitní odpovědi *in vivo*

Jak již bylo výše řečeno, rozdílné průběhy infekce způsobené *E. cuniculi* závisí především na imunologickém statusu hostitele. Tato skutečnost byla mnohokrát potvrzena studiemi, kde byly myši použity jako modelové organizmy (Koudela a kol., 1993; Khan a kol., 2001; Kotková s kol., 2013). Jako nejčastěji

používaným kmenem jsou inbrední geneticky imunokomprimované myši (SCID a athymické myši). Tyto kmeny myší vznikají z imunokompetentního kmenu myší BALB/c, které tak při experimentálních infekcích slouží jako pozadí. Dále bylo zjištěno, že adoptivním přenosem aktivovaných T buněk získaných z BALB/c myší mohou být imunokomprimované SCID myši zachráněny před letální infekcí způsobenou *E. cuniculi* (Braunfuchsová a kol., 2001). Studie s knockout myšmi zase ukázaly, že cytotoxické CD8 T lymfocyty jsou důležité v ochraně proti mikrosporidiím, a že jejich aktivace není závislá na CD4 T lymfocytech (Khan a kol., 1999; Moretto a kol., 2000; Sak a kol., 2017).

Podrobnější popis kmenů myší nejčastěji používaných při studiu průběhu infekce způsobené *E. cuniculi* následuje.

1.7.1. Imunokompetentní myši BALB/c a C57BL/6

Jako modelový organismus s neporušenou funkcí imunitního systému bývají nejčastěji voleny myši kmene BALB/c a C57BL/6. Tyto dva kmeny jsou často používány v biologickém výzkumu zahrnujícím imunologii, vývojovou biologii, genetiku, neurobiologii a mnohé další.

BALB/c myši jsou albinotické, laboratorně chované myši, ze kterých byly vyvinuty další podkmeny. Zakládající zvířata kmene byla získána Halseyem J. Baggem z Memorial Hospital v New Yorku od dealera myší v Ohio v roce 1913. Jméno BALB je zřetězení Bagg a Albino. Od roku 1920 bylo potomstvo původní kolonie systematicky kříženo, sourozenec se sourozcem, po 26 generací přes 15 let (Les, 1990). Tento kmen je především dobře znám pro produkci plasmacytomů po injekci minerálním olejem tvořícím základ pro produkci monoklonálních protilátek. Byla u nich pozorována nízká incidence rakoviny mléčné žlázy, ale jiné typy rakovin (především retikulární neoplazmy, plicní a ledvinové nádory) se mohou u nich během života rozvinout. BALB/c myši mají dlouhou reprodukční životnost, vykazují vysokou hladinu úzkosti a jsou relativně odolné vůči ateroskleróze vyvolané dietou (Jax mice database, 2018).

Inbrední kmen myší C57Bl byl vytvořen C.C.Littlem v Bussey institutu pro výzkum aplikované biologie roku 1921. Z tohoto kmene byly odvozeny některé subtypy nesoucí spontánní nebo indukované mutace. C57Bl/6 myši jsou nejznámějším inbredním kmenem odvozeným od C57Bl kmene. Mezi jednotlivými

podkmeny C57Bl/6 byly pozorovány rozdíly v chování, toleranci pro glukózu, alkohol nebo léky (Mekada a kol., 2009).

Tyto dva kmeny imunokompetentních myší se používají jako negativní kontroly z důvodu porovnání imunitních mechanismů s imunodeficientními kmeny myší vyvinutých na jejich základě.

1.7.2. Myši s defektním genem pro tvorbu CD4⁺ T lymfocytů

Myši homozygotní pro cílenou mutaci genu *Cd4^{tm1Mak}* mají signifikantní blok pro tvorbu CD4⁺ T lymfocytů; 90 % jejich cirkulujících T-buněk jsou CD8⁺. U takto geneticky upravených homozygotních myší není detekován na buňkách thymu a lymfatických uzlin povrchový protein CD4 (Jax mice database, 2018). Navíc, přítomné CD8⁺ T lymfocyty významně reagují s několika epitopy hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy II, kromě očekávaných reakcí s epitopy MHC třídy I (Tyznik a kol., 2004).

Pomocí těchto myší lze úspěšně studovat vývoj CD4⁺ T lymfocytů a náchylnost hostitele k virové infekci a zánětu. Z hlediska našeho výzkumu jsme tyto myši použili pro sledování průběhu mikrosporidiózy a účinků imunitního systému v boji proti těmto parazitům.

1.7.3. Myši s defektním genem pro tvorbu CD8⁺ T lymfocytů

Tento kmen myší byl vyvinut cílenou mutací genu pro CD8 receptor (*Cd8a^{tm1Mak}*) na chromosomu 6 u C57BL/6 myší. Mutace v tomto genu způsobuje neschopnost vývoje CD8⁺ cytotoxických lymfocytů. Naproti tomu, vývoj a funkce pomocných CD4⁺ T buněk jsou nezměněny. Mutací tohoto genu bylo dosaženo tak, že do exonu 1 byl vložen gen rezistence na neomycin. Pomocí analýzy buněk thymu a lymfatických uzlin homozygotních CD8 knockout myší průtokovou cytometrií bylo potvrzeno, že na povrchu T buněk nebyl exprimován žádný detekovatelný kódovaný protein. Absence cytotoxických lymfocytů má pak za následek zvýšenou citlivost k vnitrobuněčným infekcím (Jax mice database, 2018).

Využití těchto myší jako modelových organismů pro sledování průběhu infekce způsobené *E. cuniculi* bylo důležité rovněž z hlediska ověření důležitosti cytotoxických CD8 T lymfocytů v boji proti těmto patogenům.

1.7.4. Myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID)

Vhodným modelem pro sledování různých aspektů oportunních infekcí u zvířat i u člověka jsou imunodeficientní myši (SCID). Myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (severe combined immunodeficiency - SCID) kmene C.B-17 byly vyvinuty na základě BALB/c myši genetickou autozomální recesivní mutací (*scid* gen) na 16. chromozomu. V homozygotním stavu tato mutace způsobuje defekt VDJ rekombinantního systému, který je využíván při přestavbě genů pro antigen-specifické receptory B a T lymfocytů. Z toho důvodu nemají SCID myši funkční B a T lymfocyty. Sérum SCID myši obsahuje velmi málo imunoglobulinů, nebo nejsou vůbec detekovatelné. Nespecifická imunita stejně tak jako diferenciací granulocytů, erytrocytů, monocytů, makrofágů a NK buněk není tímto defektem postižena (Bosma, 1983).

Použití SCID myši pro studium mikrosporidiózy charakterizovali Koudela a kol. (1993). V experimentech mohou představovat jedince po imunosupresi, případně pacienty s HIV. Tyto myši jsou rovněž vhodným modelovým organismem pro experimenty s adaptivními přenosy buněk imunitního systému.

II. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo komplexní studium infekcí vyvolaných mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II a genotyp III u imunokompetentních a imunodeficitních hostitelů (hlodavců) a dále studium možného kongenitálního přenosu mikrosporidií z matky na plod.

Dílčí cíle:

- 1) charakterizace průběhu infekcí způsobených *E. cuniculi* genotypem II a genotypem III u experimentálně infikovaných hostitelů;
- 2) zjištění účinnosti léčby albendazolem u SCID a BALB/c myši infikovaných *E. cuniculi* genotypem III;
- 3) zjištění účinnosti léčby albendazolem u C57Bl/6 myši, CD4 a CD8 knockout myši infikovaných *E. cuniculi* genotypem II;
- 4) pomocí metody RT-PCR zjistit skutečnou parazitární zátěž hostitelského organismu;
- 5) studium transplacentárního přenosu *E. cuniculi* genotyp II u imunokompetentních i imunodeficitních hostitelů.

III. SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Všechny dosažené výsledky (obrázky, grafy a tabulky), použitý materiál a metody je možno nalézt v níže přiložených publikacích. Články "The course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice" "Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis", "Differences in the intensity of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III - comparison using quantitative real-time PCR" a "Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model", které vznikly v době doktorského studia, jsou hlavním předmětem této disertační práce.

Publikace "Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole", je uvedena jako dodatek, jelikož výsledky, které jsou v ní uvedeny, byly získány v době mého magisterského studia a byly součástí mé magisterské práce. Tato publikace je však úzce spojená s výsledky prezentovanými v disertační práci a proto je přiložena k nahlédnutí.

Mikrosporidie jsou pozoruhodné parazitující mikroorganizmy, které fascinují vědce již téměř dvě století. Mikrosporidie mohou infikovat jak bezobratlé, tak obratlovce, u kterých způsobují celou řadu onemocnění od skrytých benigních infekcí až po masivní poškození hostitelského organismu, které často končí smrtí.

Od roku 1959, kdy byla diagnostikována první mikrosporidie u člověka, bylo popsáno 17 druhů infikujících člověka, které u imunodeficitních jedinců způsobují mnohem vážnější zdravotní problémy ve srovnání s imunokompetentními jedinci (Didier a kol., 2004). *Encephalitozoon cuniculi*, jako první mikrosporidie identifikovaná u savce a zároveň první mikrosporidie, která byla úspěšně izolovaná a dlouhodobě kultivovaná v buněčné kultuře, patří mezi nejlépe prostudovaný druh mikrosporidie. Podle počtu krátkých opakování v ITS rRNA regionu jsou určovány čtyři různé (ne však přísně hostitelsky specifické) genotypy *E. cuniculi* (Didier a kol., 1995b; Talabani a kol., 2010).

Většina z toho, co je známo o biologii savčí mikrosporidie je primárně založeno na studiu mikrosporidie *E. cuniculi* genotyp II, která je hojně využívána pro experimentální infekce. Průběh infekce způsobené *E. cuniculi* genotyp II závisí především na imunologickém stavu hostitele, což bylo úspěšně dokázáno na myších

modelech (Sak a Ditrich, 2005; Sak a kol., 2006; Kotková a kol., 2013). Zatímco u imunokompetentních myší infikovaných *E. cuniculi* genotyp II se rozvinula latentní infekce, která zůstala asymptomatická dokud bylo množení parazita a imunitní odpověď hostitele v rovnováze (Gannon, 1980b; Niederkorn a kol., 1981; Kotková a kol., 2013), u imunokomprimovaných myší, jako jsou SCID nebo athymické nu/nu myši, se po infekci rozvinula akutní a většinou letální mikrosporidíóza (Schmidt a Shadduck, 1984; Koudela a kol., 1993; Kotková a kol., 2013).

Na základě literárních dat a našich experimentů se ukázalo, že jednotlivé genotypy *E. cuniculi* se významně liší v průběhu infekce, v odpovědi na léčbu albendazolem, ale také v různé toleranci hostitele na parazitární zátěž (Hofmannová a kol., 2014; Kotková a kol., 2017). Ovšem mechanismus této tolerance zatím zůstává neznámý.

3.1. Průběh infekce způsobené mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III u imunokompetentních BALB/c a imunodeficitních SCID myší

Zatímco *E. cuniculi* genotyp II můžeme nalézt u širokého spektra hostitelů a ve většině případů způsobuje asymptomatickou latentní formu infekce (Kašičková a kol., 2009; Neumayerová a kol., 2014), *E. cuniculi* genotyp III se zdá být mnohem agresivnější a infekce způsobené tímto genotypem často vedou ke smrti i imunokompetentního hostitele (Juan-Sallés a kol., 2006; Hofmannová a kol., 2014; Meng a kol., 2014). Výsledky našich experimentů ukázaly, že infekce vyvolaná *E. cuniculi* genotyp III má rychlý nástup (téměř všechny orgány byly pozitivní již týden po infekci), ale hostitel přežíval a měl jen velmi mírné klinické příznaky onemocnění. Zajímavé jsou výsledky u imunodeficitních SCID myší; zatímco infekce způsobená *E. cuniculi* genotyp II byla charakterizovaná postupným nárůstem počtu infikovaných orgánů a smrtí hostitele v době, kdy všechny orgány byly pozitivní na přítomnost mikrosporidií (cca 33. den po infekci) (Kotková a kol., 2013), infekce způsobená *E. cuniculi* genotypem III se již týden po infekci rozšířila do všech orgánů a tento stav zůstal až do smrti hostitele, cca 39. den po infekci. Překvapivé je, že přes enormě rychlou expanzi *E. cuniculi* genotypu III a postižení více orgánů, se myši dožívaly déle než myši s infekcí způsobenou *E. cuniculi* genotypem II. Zdá se, že přežití myší není závislé na parazitární zátěži, ale mnohem pravděpodobněji bude záviset na genotypu *E. cuniculi*. Předpokládáme, že *E. cuniculi* genotyp III aktivuje odlišnou část imunitního systému než *E. cuniculi*

genotyp II. Může to být způsobeno adaptací parazita, který tak transformuje imunitu k méně efektivní odpovědi, což následně může mít vliv na prodloužení života hostitele. Zdá se, že nejdůležitějším „zabíječem“ mikrosporidií u imunodeficitních myší jsou NK buňky, ale to je otázka dalších výzkumů.

Chemoterapie mikrosporidiózy je omezena pouze na několik léčiv zahrnujících albendazol a fumagilin, které jsou alespoň částečně účinné a redukuje počet parazitů (Didier, 2005). Albendazol a jeho deriváty se vážou k tubulinu v těle parazitů, brání jeho polymeraci a to následně vede k rozvratu metabolismu a smrti parazita. Léčba lidských mikrosporidiálních infekcí způsobených rodem *Encephalitozoon* pomocí albendazolu ukázala výrazné zlepšení příznaků onemocnění a postupnou likvidaci parazita ve všech orgánech (Molina a kol., 1995, Ditrich a kol., 2011). Ovšem recentní výsledky zpochybňují 100% účinnost albendazolu (Kotková a kol., 2013), kdy experimentální imunosupresí BALB/c myší, které byly po léčbě albendazolem negativní na přítomnost mikrosporidií, vyvovala opětovné rozšíření parazita do několika orgánů. Mikrosporidie rodu *Enterocytozoon* jsou na albendazol málo citlivé, proto jako lékem první volby je v tomto případě fumagilin. Je to antibiotikum z houby *Aspergillus fumigatus*, které používají především včelaři pro léčbu včelí nosematózy. Pro lidský organizmus je však toxický a může způsobovat trombocytopenii a neutropenii.

Encephalitozoon cuniculi genotyp III vykazuje zvýšenou rezistenci proti principiálnímu působení albendazolu. Nejenom že léčba pomocí albendazolu nevedla k eliminaci parazita ze všech orgánů, jako tomu bylo v případě *E. cuniculi* genotyp II, ale navíc počet pozitivních orgánů opět vzrostl okamžitě po ukončení léčby. U imunokompetentních SCID myší vedla léčba k prodloužení života o cca 37 dní, v případě že léčba byla započata 14. den po infekci. Léčba infekce u SCID myší od 28. DPI způsobila pouze vymizení parazita z žaludku a z krve. Zároveň prodloužila dobu přežití myší o 17 dní.

3.2. Porovnání parazitární zátěže organismu použitím metody qRT-PCR

Mikrosporidie bývají popisovány jako pomalu působící patogeny, a tedy méně virulentní než jiné skupiny patogenů. Nicméně, jak je uvedeno výše, jsou schopny se úspěšně množit ve vhodném hostiteli na enormní množství bez jakýchkoliv zjevných známek infekce u imunokompetentních hostitelů, což ukazuje,

že vysoká infekčnost, vysoká patogenita nebo obojí nemusí nutně odpovídat úrovni dopadu mikrosporidií na hostitelský organizmus.

Většina z dřívějších experimentálních studií je omezena na hodnocení doby přežití hostitele (Braunfuchsová a kol., 2001; Salát a kol., 2006) a skutečná parazitární zátěž nebyla doposud zkoumána. Na základě našich výsledků kvantifikace množství spor v jednotlivých orgánech během infekce byl u imunokompetentních BALB/c myši zjištěn progresivní průběh charakterizovaný šířením mikrosporidií do téměř všech orgánů s maximálním dosaženým počtem $3,8 \times 10^8$ spor na 1 g tkáně v případě *E. cuniculi* genotypu II, a $3,6 \times 10^9$ spor na 1 g tkáně v případě *E. cuniculi* genotypu III. Kromě toho, hodnocení vzorků pomocí RT-PCR potvrdilo omezenou účinnost albendazolu. Tato metoda odhalila přítomnost mikrosporidií v 5 ze 17 vyšetřených tkání a tělních tekutin (nepublikovaná data) u léčených BALB/c myši, jež se zdály být zcela negativní po vyšetření pomocí konvenční PCR.

Naše výsledky zaměřené na experimentální infekce imunodeficitních SCID myši *E. cuniculi* genotypem II nebo III ukázaly rozdílný průběh infekce a různou toleranci k parazitární zátěži. Ačkoli *E. cuniculi* genotyp II způsobil akutní infekci s masivní diseminací parazita do mnoha orgánů s maximem $2,9 \times 10^{10}$ spor na gram tkáně (28. den po infekci), hodnocení SCID myši infikovaných *E. cuniculi* genotypem III ukázalo mnohem dřívější vzestup a intenzivní rozšíření infekce v těle hostitele s maximem pozitivních orgánů již týden po infekci. Navíc absolutní počet spor ve tkáních byl 10× větší ve srovnání *E. cuniculi* genotyp II, tj. $4,9 \times 10^{11}$ spor na gram tkáně (35. den po infekci). Navzdory tomuto faktu, myši infikované *E. cuniculi* genotypem III přežívaly mnohem déle.

3.3. Průběh infekce způsobené *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II u imunokompetentních C57Bl/6 myši a z nich odvozených CD4 a CD8 knockout myši

Studium imunitní odpovědi proti mikrosporidiím je založeno především na experimentálních infekcích různých kmenů myši. Zpočátku byly využívány imunokompetentní kmeny myši BALB/c, C57Bl/6, C57Bl/10, DBA/1, DBA/2, 129/J a AKR (Niederhorn a kol., 1981). Dalším milníkem v rámci imunoparazitologie bylo využití hostitelů s různými defekty imunitního systému - athymické myši (Schmidt a Shaddock 1983, 1984; Didier a kol., 1994) a myši

s těžkou kombinovanou imunodeficiencí SCID (Koudela a kol., 1993, Salát a kol., 2001) a následovaly experimenty s kmeny myši, jež měly defektní geny pro syntézu konkrétních cytokinů (IFN- γ , IL-12) nebo defekty funkčně významných povrchových molekul lymfocytů (receptor pro IFN- γ , CD4 a CD8 povrchové molekuly) (Achbarou a kol., 1996, Khan a Moretto, 1999, Khan a kol., 1999, Salát a kol., 2002). Druhým způsobem, kterým je posuzován význam konkrétního imunitního mechanismu, jsou adoptivní přenosy přesně definovaných populací lymfocytů do SCID myši před následnou infekcí mikrosporidii. Počáteční studie tak ukázaly, že chemicky imunosuprimované nebo geneticky imunokomprimované (SCID a nu/nu) myši mohou být zachráněny adoptivním přenosem aktivovaných T buněk (Heřmánek a kol., 1993; Khan a kol., 1999; Braunfuchsová a kol., 2001). Data získaná z experimentů CD4 a CD8 knockout myšmi také ukázala, že cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty jsou zásadní pro ochranu hostitelského organismu před mikrosporidii, a že jejich aktivace nemusí být závislá na CD4⁺ T lymfocytech (Khan a kol., 1999; Moretto a kol., 2000).

Protože CD4 a CD8 knockout myši jsou vyvinuty z C57Bl/6 myši, pozorovali jsme u všech kmenů stejný počáteční průběh infekce, kdy došlo již během několika málo týdnů po infekci k diseminaci parazita do většiny orgánů hostitele. U CD4 knockout myši a C57Bl/6 byla tato počáteční fáze vystřídána chronickou fází charakterizovanou persistencí mikrosporidií v některých orgánech, u CD4 knockout myši byla většina zasažených orgánů mimo gastrointestinální trakt. U CD8 knockout myši se vyvinula letální mikrosporidióza končící smrtí hostitele cca 57. den po infekci, což je podstatně déle než tomu bylo u imunodeficitních SCID myši. Tyto výsledky ukazují na roli dalších imunitních mechanismů jako jsou CD4⁺ T lymfocyty, B lymfocyty a cytokiny. Parazitární zátěž u CD8 knockout myši byla $5,27 \times 10^9$ spor na gram tkáně 35. den po infekci a u CD4 knockout myši $1,19 \times 10^8$ spor na gram tkáně 28. den po infekci, což naznačuje, že přežití hostitele není závislé pouze na snížení množství spor. Tento výsledek podporuje základní koncepci o účinnosti buněčné imunity (především CD8⁺ T lymfocytů) v obraně proti mikrosporidióze.

Aplikace albendazolu vedla u C57Bl/6 a CD4 knockout myši k vymizení parazita ze všech orgánů týden, respektive 3 týdny po ukončení léčby. Aplikace albendazolu infikovaným CD8 knockout myšim vyústilo ve vymizení mikrosporidií z mnoha orgánů jeden týden po ukončení léčby a v prodloužení doby přežití.

Nicméně, po tomto dočasném ozdravení díky léčbě albendazolem se mikrosporidie opět rozšířily do téměř všech orgánů. Avšak v době ukončení experimentu (91. den po infekci) myši stále přežívaly i přes masivně rozšířenou infekci v těle hostitele.

3.4. Transplacentální přenos

Encephalitozoon cuniculi infikuje široké spektrum hostitelských buněk zahrnující makrofágy, epitelie, cévní endotélie, buňky ledvinných kanálků a ostatní typy buněk. Je tak nalézán ve většině tkání s predilekcí v mozku, plicích a ledvinách (Gannon, 1980a; Kotková a kol., 2013, 2017; Sak a kol., 2017). Diseminace infekce do různých částí těla hostitele je umožněna schopností tohoto druhu mikrosporidie infikovat a množit se uvnitř makrofágů, které jim zároveň slouží jako dopravní prostředek v těle hostitele (Cotte a kol., 1999). Přestože se jedinec může infikovat celou řadou způsobů, požití kontaminované potravy a vody, nebo inhalace spor představuje nejvýznamnější z nich (Cotte a kol., 1999; Thurston-Enriquez, 2002; Didier a kol., 2004).

Nejméně prozkoumaná, ovšem neméně důležitá cesta přenosu mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* je transplacentální přenos. Přenos infekce z matky na potomka přes placentu byl popsán u hlodavců, králíků, koní, masožravců (u psů a lišek) a primátů vyjma člověka (Snowden a kol., 1998; Snowden a Shaddock, 1999). U všech těchto skupin zvířat byla přítomnost mikrosporidií u mláďat, jež se narodila přirozeně nebo experimentálně infikovaným matkám, zjišťována především serologicky a/nebo histopatologicky. Rozsáhlé léze především na mozku, ale i v ledvinách a na plicích způsobené mikrosporidii zapříčinily, že většina mláďat se narodila již mrtvá nebo zemřela během několika málo dní po porodu (Innes a kol., 1962; Owen a Gannon, 1980; Baneux a Pognan, 2003; Mathis a kol., 2005).

Výsledky našich experimentů, kdy jsme perorálně infikovali SCID a BALB/c myši a poté je připustili v akutní nebo chronické fázi infekce, nebo kdy jsme intraperitoneálně injikovali spory mikrosporidií již zabřezlým myším, zprvu neprokázaly přenos mikrosporidií přes placentu. Vyšetření byly podrobeny jak plody vyjmuté pomocí císařského řezu, tak mláďata ihned po narození. Přestože matky vykazovaly systémovou mikrosporidiózu, molekulární testy nepotvrdily přítomnost mikrosporidií v tkáních mláďat.

Následující experimenty, ve kterých jsme mláďata přenesli ihned po porodu k náhradní neinfikované matce, již přenos mikrosporidií přes placentu prokázaly.

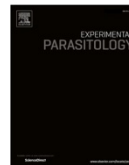
Vyšetřované orgány SCID mláďat, jež byla usmrcena až 3. týden života, byly pozitivní na přítomnost specifické mikrosporidiální DNA. Ovšem u 6 týdnů starých mláďat BALB/c myši, jež také byla přenesena k náhradní neinfikované matce, nebyla přítomnost mikrosporidií potvrzena. Teprve po aplikaci imunosupresiva Depo-medrolu BALB/c mláďatům (28. a 38. den po porodu) došlo k vytvoření příznivých podmínek pro pomnožení parazita a tím byly v době pitvy pozitivní všechny vyšetřované orgány. Je tedy zřejmé, že velmi malé množství spor, které ovšem není detekovatelné ani molekulárními metodami, prochází přes placentu a potřebují čas a podmínky pro pomnožení. Je zde také možnost ochrany mláďat mateřskými protilátkami (Owen a Gannon, 1980). Ovšem po jejich vymizení mají mikrosporide šanci se prosadit.

IV. ZÁVĚRY

- průběh infekce závisí nejenom na imunologickém stavu hostitele, ale také na genotypu mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi*;
- *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III má rychlejší nástup infekce než v případě *E. cuniculi* genotyp II; již první týden po infekci jsou všechny nebo téměř všechny orgány pozitivní na přítomnost parazita;
- počet pozitivních orgánů je vždy vyšší u infekcích způsobených *E. cuniculi* genotypem III, přesto se imunodeficitní SCID myši dožívají déle než s infekcí *E. cuniculi* genotyp II;
- zatížení jednotlivých orgánů mikrosporidii *E. cuniculi* genotyp III je o řád vyšší než v případě infekce *E. cuniculi* genotyp II;
- léčba albendazolem u imunokompetentních myší způsobí snížení počtu parazitů pod hranici detekce pomocí konvenční PCR (jsou-li infikovány *E. cuniculi* genotypem II), u imunodeficitních myší dojde pouze k prodloužení života hostitele o několik týdnů;
- léčba albendazolem imunokompetentních BALB/c myší infikovaných *E. cuniculi* genotypem III vedla ke snížení počtu infikovaných orgánů pouze dočasně; dva týdny po ukončení léčby dochází opět k diseminaci parazita v těle hostitele;
- z experimentů s knockout myšmi vyplývá důležitost buněčné imunity, především CD8 T lymfocytů, v boji proti mikrosporidiióze;
- transplacentální přenos parazita byl prokázán až několik týdnů po narození (u mláďat SCID myší) nebo po aplikaci imunosupresiva Depo-medrolu (u mláďat imunokompetentních BALB/c myší); z toho vyplývá, že k přenosu mikrosporidii přes placentu dochází.

V. PUBLIKACE, Z NICHŽ VYCHÁZÍ TATO PRÁCE

5.1. Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model. Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Květoňová, D., Kváč, M., 2018. Exp Parasitol 193: 51–57.



Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model

Michaela Kotková^{a,b}, Bohumil Sak^{a,*}, Lenka Hlásková^a, Dana Květoňová^a, Martin Kváč^{a,b}

^a Institute of Parasitology, BC CAS, v.v.i., Czech Republic

^b Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Encephalitozoon cuniculi
Transplacental transmission
Microsporidia
BABL/c
SCID

ABSTRACT

Microsporidia are obligate intracellular unicellular parasite of wide range of vertebrates. Although ingestion or inhalation of microsporidian spores is the main route of infection, assumed vertical transmission was described in some mammals. The present study was focused on proof of vertical transmission in mice under experimental conditions. Mice were infected with *E. cuniculi* genotype II intraperitoneally after mating, or perorally followed by mating in acute or chronic phase of infection. Fetuses were delivered by Caesarean section or mice were kept up to the parturition. Some of cubs were immediately after birth transferred to uninfected surrogate mothers. Group of cubs was immunosuppressed. All cubs were examined using polymerase chain reaction for the presence of *Encephalitozoon* after birth or in their age of 3 or 6 weeks, respectively. All fetuses delivered by Caesarean section, which were intraperitoneally or perorally infected were negative as well as all neonatal mice and youngsters tested in age of 6 weeks. Only immunosuppressed cubs and cubs of immunodeficient mice in age of 21 days were positive for *Encephalitozoon cuniculi* genotype II. Present results provided the evidence that transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* in mice occurs, but the mechanism of these transport is still unknown.

1. Introduction

Microsporidia are obligate intracellular parasites that infect a large number of vertebrate and invertebrate animals, including humans (Canning et al., 1986). Microsporidian spores are released into the environment by infected hosts and are ubiquitous, being found in surface waters, sediments, soil, and foods (Cotte et al., 1999; Dowd et al., 1998; Fournier et al., 2000; Siński, 2003). The natural route of entry of the parasite into the host is by ingestion or inhalation of infectious spores, or via wounds and transplacentally (Bryan and Schwartz, 1999; Deplazes et al., 2000).

Most of what is known about microsporidia is based on *E. cuniculi*, as this is the best-studied microsporidian species of mammals. *Encephalitozoon cuniculi*, the first microsporidia identified in mammals, was detected by Wright and Craighead (1922) and was named in 1923 by Levaditi et al. (1923). *Encephalitozoon cuniculi* infects wide spectrum of host cells including macrophages, epithelial cells, vascular endothelial cells, kidney tubule cells and possibly other cell types and can be found in most tissues, with a predilection for the brain and kidney (Gannon, 1980). It is responsible for various pathologies, affecting the nervous system as well as the respiratory and digestive tracts causing

hepatitis, peritonitis, pneumonitis, cystitis, nephritis and encephalitis (De Groote et al., 1995; Mertens et al., 1997; Weber et al., 1994).

Vertical transmission of *Encephalitozoon cuniculi* from mother to offspring has been described in rodents, rabbits, carnivores, horses and non-human primates so far (Baneux and Pognan, 2003; Didier et al., 1998; Snowden et al., 1998; Snowden and Shaddock, 1999; van Rensburg et al., 1991). Many reports of suspected transplacental transmission of *E. cuniculi* which have been published are based on circumstantial evidence such as the serological diagnosis, or histological diagnosis (Anver et al., 1972; Owen and Gannon, 1980; van Rensburg et al., 1991). According to Owen and Gannon (1980) the monitoring levels of antibody titers in nurslings gives no evidence that there was a placental transfer. Increased titers can only be attributed to maternal antibodies passed on to the young in the milk of their mothers.

Many reports didn't take in account the possibility of a postnatal (horizontal) contamination. It is generally accepted that the most common route of transmission is the oral one, since the spores are passed profusely in the urine or feces of infected individuals and thus the environment becomes contaminated. And the nurslings could get infected from their mothers by this way. Only two publications sufficiently described the strict aseptic environment in which the Caesarean

* Corresponding author. BC CAS, Institute of Parasitology, Laboratory of Veterinary and Medical Protistology, Branišovská 31, České Budějovice, Czech Republic.
E-mail address: casio@paru.cas.cz (B. Sak).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.09.001>

Received 4 May 2018; Received in revised form 23 July 2018; Accepted 4 September 2018

Available online 07 September 2018

0014-4894/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

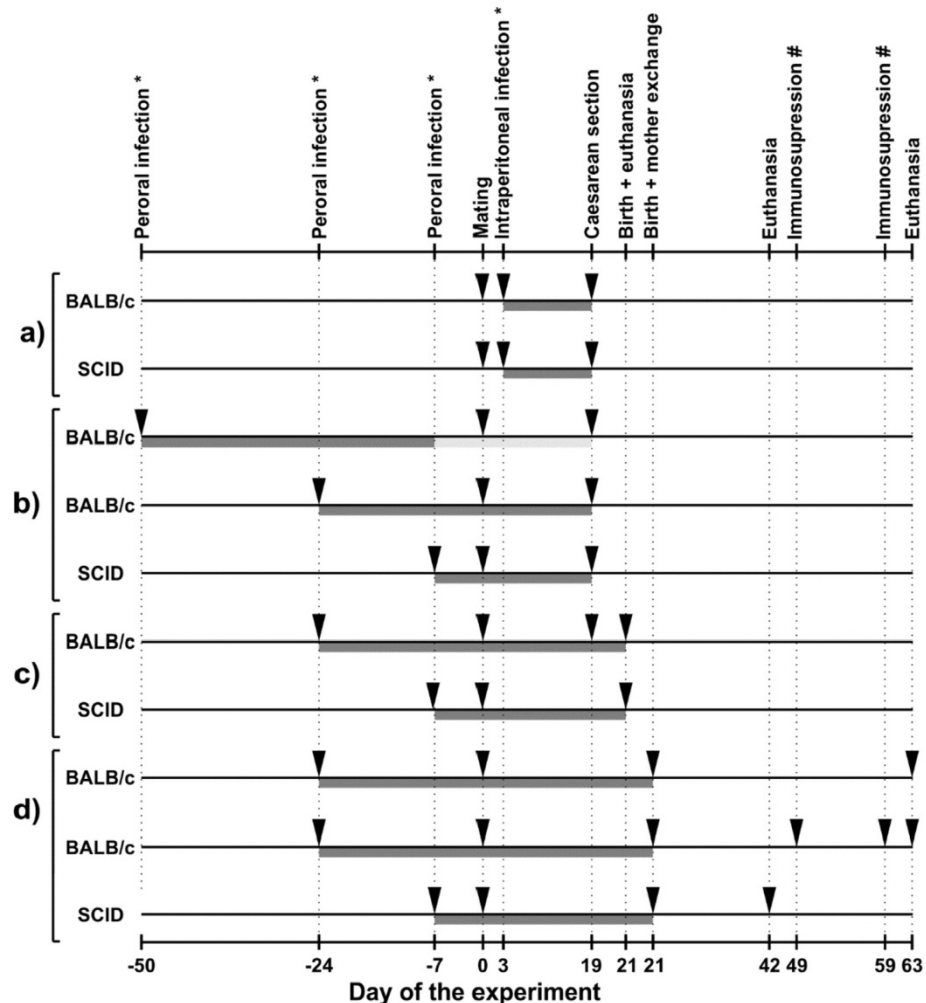


Fig. 1. Design of experiments. a) Intra-peritoneal infection of mother and presence of *E. cuniculi* genotype II in fetuses, b) peroral infection of mother and presence of *E. cuniculi* in fetuses, c) peroral infection of mother and presence of *E. cuniculi* in cubs after birth, d) peroral infection of mother, transfer of cubs to the uninfected surrogate mothers and presence of *E. cuniculi* in cubs. * infection with 10^7 *E. cuniculi* spores in 0.2 ml of sterile deionized water; # depo-medrol immunosuppression (dose 0.3 mg of methylprednisolone in 100 μ l of sterile deionized water); dark gray line represents chronic infection caused by *E. cuniculi* as reported by Kotková et al., (2013), light gray line represents acute infection caused by *E. cuniculi* as reported by Kotková et al., (2013).

section-derived offspring were kept to withstand scientific scrutiny. The findings of encephalitozoonosis in these gnotobiotic animals strongly support vertical transmission (Boot et al., 1988; Hunt et al., 1972).

Many other reports about experimental or natural vertical (trans-placental) transmission have been documented in a wide range of mammals (Hunt et al., 1972; Juan-Sallés et al., 2006; Mohn et al., 1974; Mohn and Nordstoga, 1982; Patterson-Kane et al., 2003; Plowright, 1952; Reetz et al., 2004; Szabo and Shadduck, 1987; Szeredi et al., 2007; Zeman and Baskin, 1985; Webster et al., 2008; Wilson, 1986). Many cases described the neurological disorders in infected neonatals (Plowright, 1952; Reetz et al., 2004; Zeman and Baskin, 1985) or they were without clinical symptoms (Juan-Sallés et al., 2006), but the histopathological findings confirmed the infection caused by *E. cuniculi*. The possibility of vertical transmission and the severity of congenital infection of *E. cuniculi* in murine model is described in present study.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement

All of the experimental procedures were conducted in accordance with the law of the Czech Republic on the use of experimental animals, safety and use of pathogenic agents. The study was approved by the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences and Institutional and National Committees (protocol no. 085/2013).

2.2. Experimental animals

Both adult immunodeficient SCID mice (strain C.B-17) of the BALB/c background and immunocompetent BALB/c mice were originally obtained from Charles River, Sulzfeld, Germany. Mice were housed in plastic cages with sterilized wood-chip bedding situated in IVC Air

Handling Solutions (Techniplast, Italy) with high-efficiency particulate air (HEPA) filters. The mice were supplied sterilized diet (TOP – VELAZ Praha, Czech Republic) and sterilized water *ad libitum*. Animal care takers wore sterile disposable coveralls, shoe covers, and gloves every time they entered the experimental room. All wood-chip bedding, feces, and disposable protective clothing were sealed in plastic bags, removed from the experimental room, and incinerated.

2.3. Parasite

The spores of *E. cuniculi* genotype II were originally isolated from a dexamethasone-treated laboratory mouse (Koudela et al., 1994). Microsporidia were grown *in vitro* in Green monkey kidney cells (VERO E6) maintained in RPMI-1640 medium (SIGMA) supplemented with 2.5% heat inactivated fetal bovine serum (FBS). Spores were isolated and purified from cells by centrifugation over 50% Percoll (SIGMA) at 1100 g for 30 min, washed three times in deionized water before storing in deionized water supplemented with antibiotics (SIGMA, 100 U/ml penicilline, 100 µg/ml streptomycine, 2.5 µg/ml amphotericine B) at 4 °C. The spores were washed in either in the PBS (for the intraperitoneal infection) or the deionized water (for peroral infection) before use.

2.4. Drugs

Depo-medrol (Pfizer Manufacturing Belgium N.V., Puurs, Belgium) containing 40 mg of methylprednisolone in 1 ml, was dosed for suppressing of the mouse immunity and for developing microsporidiosis as follows: a total 0.3 mg of methylprednisolone dissolved in 100 µl deionized water was intramuscularly applied by the insulin syringe.

2.5. Experimental protocols

A week prior experimental infections/mating, all maternal and surrogate mice used in the experiments have been daily tested for presence of specific *E. cuniculi* genotype II DNA in the fecal and urinal samples. The presence of specific DNA of *E. cuniculi* genotype II has been tested by nested PCR in spleen, liver, kidney and brain in cubs, maternal and surrogate mice after the dissection. Additionally, placenta and uterus have been tested in maternal mice. Three litters of each mouse strain were used for each experiment. Each maternal mouse was infected with a dose 1×10^7 spores of *E. cuniculi* genotype II.

2.5.1. Experiment a)

Females of SCID and BALB/c mice were intraperitoneally infected with *E. cuniculi* genotype II three days after the mating. Mice were euthanized 16 days post infection and fetuses were delivered by Caesarean section (Fig. 1).

2.5.2. Experiment b)

Females of BALB/c and SCID mice were orally infected with *E. cuniculi* genotype II and then they were mated in the acute stage of infection (SCID mice 7 days post infection - DPI, BALB/c mice 24 DPI) or in the chronic stage (BALB/c 50 DPI). Females were euthanized 19 days of their pregnancy, namely 26. DPI in SCID mice and 43. or 69. DPI in BALB/c mice. The placental tissue and fetuses were obtained by the Caesarean section and examined for the presence of *E. cuniculi* genotype II.

2.5.3. Experiment c)

Females of BALB/c and SCID mice were orally infected with *E. cuniculi* genotype II and then they were mated at the onset of the acute phase of infection; 7 DPI in SCID mice and 24 DPI in BALB/c mice. Mice were kept to the parturition and the presence of the parasite was detected in organs of neonatal mice.

2.5.4. Experiment d)

Females of BALB/c and SCID mice were orally infected with *E. cuniculi* genotype II at a dose 1×10^7 spores, and then they were mated at the onset of the acute phase of infection; 7 DPI in SCID mice, 24 DPI in BALB/c mice. Mice were kept to the parturition. The neonatal cubs were immediately after birth transferred to the uninfected surrogate mothers into a sterile box. Three litters of BALB/c cubs were immunosuppressed with depo-medrol (28 and 38 day post birth). The youngsters of SCID and BALB/c mice were euthanized in their age of 3 or 6 weeks, respectively, and their organs were examined for the microsporidia.

2.6. DNA isolation

Organ samples were homogenized by bead disruption using a FastPrep[®]-24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) and 0.5 mm glass beads (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) at the speed of 5.5 m/s for 1 min. Total DNA was extracted using commercial column based isolation kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Acquired DNA was stored at -20 °C.

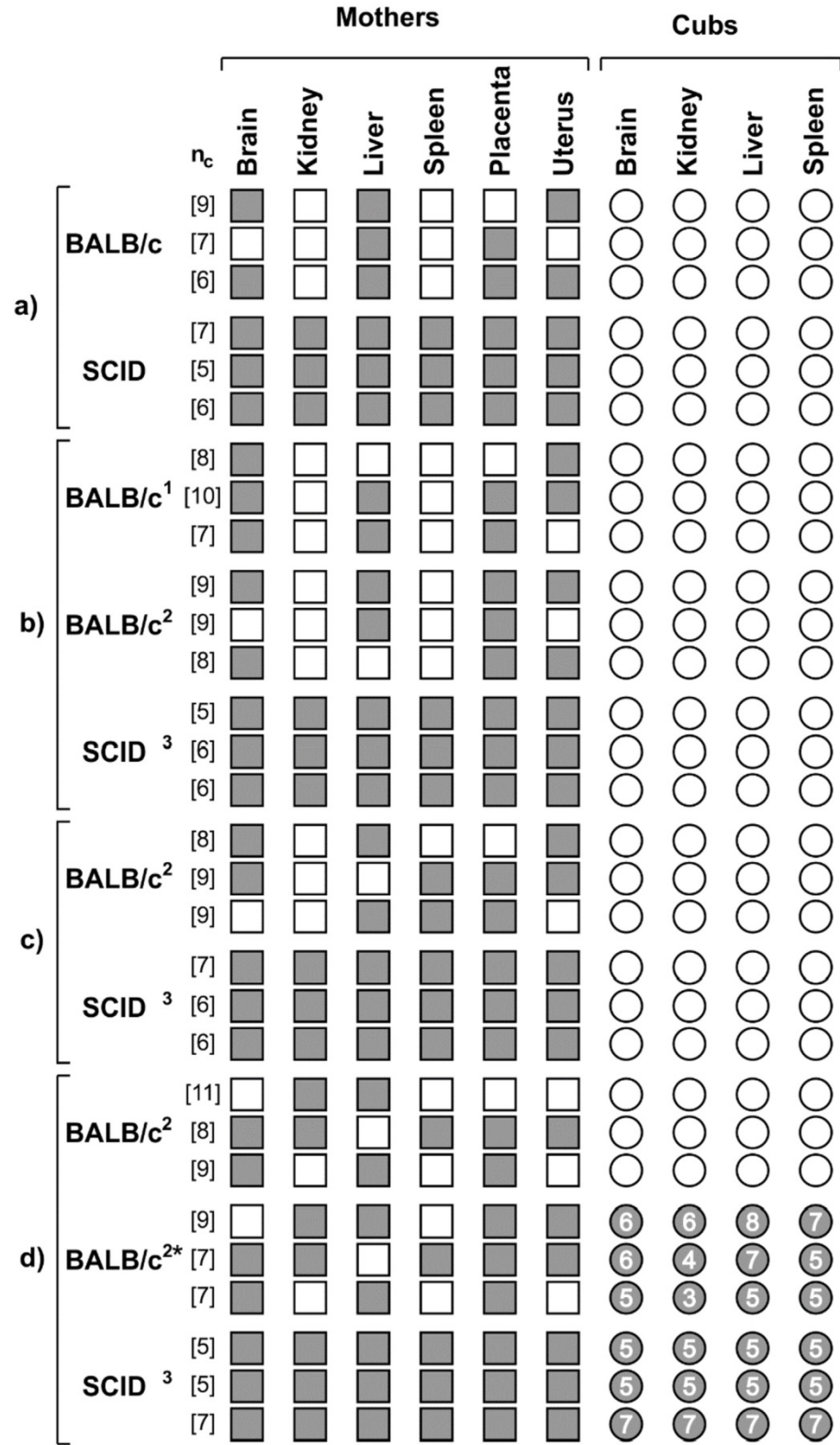
2.7. PCR amplification

Nested PCR protocol was used for amplification of a complete sequence of internal transcribed spacer (ITS) using microsporidia-specific primers described by De Bosscuere et al. (2007) and Katzwinkel-Wladarsch et al. (1996). The upstream primers M2F (CGG AGA GGA AGC CTT AGA GA) and MFNest (GAG AGA TGG CTA CTA CGT CCA AGG) were targeted to the 3' region of the small subunit rRNA gene (SSU) of *E. cuniculi*. The downstream primers M2R (ATA GTG ACG GGC GGT GTG T) and MSP1R (ACA GGG ACM CAT TCA) were targeted to the 5' region of the large-subunit rRNA gene (LSU) of *E. cuniculi*. The primary PCR mixture contained 2 µl of template DNA, 10 µl of $2 \times$ AmpONE[™] HS-Tag premix (GeneAll Biotechnology Co. Ltd), 200 nM each primer and molecular grade water up to a volume of 20 µl. The reaction conditions for secondary PCR were similar to those described above for the primary PCR, with the exception that 2 µl of the primary PCR product was used as the template. Molecular grade water (negative control) and DNA obtained from spores of *E. intestinalis* grown *in vitro* in VERO E6 (positive control) were included to each PCR run. For both PCR steps a total of 35 cycles, each consisting of 94 °C for 45 s, 58 °C for 45 s, and 72 °C for 60 s, were performed. Initial incubation at 94 °C for 3 min, final extension at 72 °C for 7 min, and final soak at 4 °C were included. PCR products were visualized on a 1% agarose gel containing 0.2 µg/ml ethidium bromide. A total 3 randomly selected positive samples from each animal were sequenced to verify the identity with the inoculum.

3. Results

Fecal and urine samples of all maternal and surrogate mice used in the experiment were negative for *E. cuniculi* prior infection with *E. cuniculi* genotype II or mating or transfer of cubs (whichever came the first). All fetuses delivered by Caesarean section of BALB/c and SCID mice, which were intraperitoneally infected three days after mating were negative for the presence of specific DNA of *E. cuniculi* genotype II. Similarly, fetuses delivered by Caesarean section from both BALB/c and SCID mice which were perorally infected and then mated 7, 24 or 50 day post infection were negative for the presence of *E. cuniculi* genotype II. *Encephalitozoon cuniculi* DNA was found in the brain, liver, placenta or uterus of maternal BALB/c mice, whereas all tested organs of SCID mice were positive (Fig. 2 a,b).

Although *E. cuniculi* genotype II DNA was found in most organs of BALB/c and all of organs of SCID mothers infected per orally at 24 day, respectively 7 day prior mating, cubs born to these mothers were negative for presence of *E. cuniculi* genotype II DNA (Fig. 2c).



(caption on next page)

Fig. 2. Presence of specific *Encephalitozoon cuniculi* genotype II DNA in organs of the mice and their cubs. a) intraperitoneal infection of mothers 3 days post mating and presence of *E. cuniculi* in fetuses after Caesarean section at 19 day post mating, b) peroral infection of mothers and presence of *E. cuniculi* in fetuses after Caesarean section at 19 day post mating, c) peroral infection of mothers and presence of *E. cuniculi* in cubs after birth, d) peroral infection of mothers, transfer of cubs to the uninfected surrogate mothers and presence of *E. cuniculi* in cubs 3 weeks of age (SCID) and 6 weeks of age (BALB/c). n_c – number of cubs in the litter; ¹ peroral infection 50 days prior mating; ² peroral infection 24 days prior mating; ³ peroral infection 7 days prior mating; * immunosuppression by depo-medrol; grey color represents PCR positivity of particular organ; number in circle represents number of positive cubs in the litter.

While BALB/c cubs, which were immediately after birth replaced to an uninfected mouse mothers and kept there until 6 weeks of their age, were negative for presence of *E. cuniculi* genotype II DNA, the microsporidial DNA was detected in each examined organ in the similar groups of cubs which were immunosuppressed with depo-medrol (Fig. 2d). Surprisingly, parasite was also detected in spleen and/or in brain of foster-mothers whose cubs were treated with depo-medrol. Other BALB/c foster-mothers were negative (Fig. 2d). All 21 day old cubs of SCID mice infected 7 day before mating were *E. cuniculi* genotype II positive in all organs (Fig. 2d). Positive organs of foster-mothers of SCID mice were liver, kidney, lungs and in one case also a brain. However, no animal suffered clinical microsporidiosis during the experiments.

4. Discussion

Encephalitozoon cuniculi is the best studied species of microsporidia, and the majority what is known about the pathogenesis of microsporidial disease is derived from studies of this organism. Infectious spores get into the environment with excrements of infectious individuals - urine and feces. Therefore they become ubiquitous and due to lack of host specificity they can be transmitted between different animal species. The transmission of parasite occurs most probably through ingestion or inhalation of spores (Bryan and Schwartz, 1999; Deplazes et al., 2000; Mota et al., 2000). Primary infection develops in small intestine epithelial cells or of the respiratory tract. Besides horizontal transmission, transplacental (vertical) transmission has also been reported in various mammalian species (Baneux and Pognan, 2003; Hunt et al., 1972; Juan-Sallés et al., 2006; Mohn et al., 1974; Mohn and Nordstoga, 1982; Owen and Gannon, 1980; Patterson-Kane et al., 2003; Plowright, 1952; Reetz et al., 2004; Szabo and Shaddock, 1987; Szeredi et al., 2007; Zeman and Baskin, 1985; Webster et al., 2008; Wilson, 1986).

Transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* was described in many animal species. But the consequences of the transfer were different. Placentitis, premature birth and perinatal death were associated with *Encephalitozoon cuniculi* infection in an alpaca (Webster et al., 2008). Abortion was a frequent consequence of microsporidiosis in horses. Interestingly, the parasite was detected in the chorionic epithelial layer, but no *Encephalitozoon* organisms were detected in any of fetal organs (Patterson-Kane et al., 2003; Szeredi et al., 2007). In carnivores, encephalitozoonosis is a sporadic disease, seen typically in neonates, that affects the brain, kidney, liver and lungs (Akerstedt et al., 2002; Mohn and Nordstoga, 1982; Szabo and Shaddock, 1987). In dog, the transplacental transmission of microsporidia from infected, but asymptomatic bitches to puppies has also been shown experimentally and is probably a common route of transmission to puppies in natural infections (Plowright, 1952; Snowden et al., 2009). The situation is similar in the case of foxes. Vixens rarely suffer from clinical disease, but they are a major source of infection that may be passed transplacentally to offspring (Mohn et al., 1974; Mohn and Nordstoga, 1982; Nordstoga et al., 1978).

An expanding collection of case reports indicates that vertical transmissions of infection also in small primates is not rare. Disseminated encephalitozoonosis was diagnosed in 2 sibling juvenile cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*), 3 sibling neonatal emperor tamarins (*S. imperator*) and in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) less than 24 h old (Anver et al., 1972; Juan-Sallés et al., 2006) so far.

Central nervous system lesions were the most prominent findings in cotton-top tamarins and squirrel monkey.

Vertical transmission of *Encephalitozoon cuniculi* in mice is not often published (Innes et al., 1962; Perrin, 1943). Moreover, the results of existing experiments on whether the *E. cuniculi* can pass through a mouse placenta, are diverging (Innes et al., 1962; Wilson, 1986). Some of them have documented the failure to confirm transplacental infection in mice and rabbits (Owen and Gannon, 1980; Wilson, 1986) and they concluded that infections are due to horizontal contamination. On the other hand, there are another studies which provide the congenital transmission of the *E. cuniculi* in rabbits (Baneux and Pognan, 2003; Cox et al., 1977; Hunt et al., 1972). But most of these earlier studies have been focused only on detecting the antibody titer or histological findings, eventually they emulsified and inoculated affected tissue into susceptible mice. We used the molecular methods to find out microsporidial DNA and to reveal the truth about vertical transmission in mice.

We used susceptible and encephalitozoon-free mice, which were intraperitoneally infected at early stages of gestation to determine whether the vertical transmission of microsporidia actually occurs. SCID mice were used for this purpose, because they do not have a functional immune system, so microsporidia can rapidly expand into the host organs, including placenta. These experiments were paralleled by study, where the mice were first perorally infected and then mated in various stages of infection. Molecular analysis of fetuses showed no presence of pathogen in any of these cases. Nevertheless, the findings of parasite in organs of the mother mice corresponded to the course of the infection, which was described previously (Kotková et al., 2013).

Although the nested-PCR is sensitive method, it did not reveal the presence of a parasite in offsprings of immunocompetent mice. It is stated that the PCR detection threshold for microsporidia is 10² spores/g fecal matters (Franzen and Müller, 1999; Rinder et al., 1998). The specific number for detecting the minimum number of spores in the tissue is not reported, but certainly it will be quite similar to the number of spores in the faeces. Evidence that the transmission actually occurred we obtained after repeated applications of depo-medrol administered to neonatal mice. This chemotherapeutics reduced the function of the immune system of the youngster and enabled microsporidia to multiply. Similarly, the parasite was detected in juvenile SCID mice up to several weeks after birth. It seems that very small undetectable amount of microsporidia passes through the placenta and need time for their multiplication. There is also the possibility that the young are protected for some time by maternal antibodies (Owen and Gannon, 1980). But they gradually disappear and then the parasite has a chance to enforce. It was also interesting that pregnant infected SCID mice were still alive 33 day after infection, which is about five days longer than was demonstrated in the experiments focused on course of infection caused by *E. cuniculi* (Kotková et al., 2013). The fact, that we found the pathogens in spleen and/or in brain of mouse substitute mothers suggests the contamination of the environment via cubs excretion and the horizontal transmission.

There is possibility, that different manifestations of congenital encephalitozoonosis may be related to the different of placental morphology of individual mammalian species. These vary according to the number of tissue layers separating fetal and maternal circulation. Also the extent of transfer of antibodies from mother to fetus is related to the number of placental barrier layers (Chucuri et al., 2010). The largest number of layers, namely six, has a horse. This type of placenta

(epitheliochorial placentation) forms a barrier between maternal and fetal circulation systems and impedes the transfer of antibodies and immune cells to the fetus during gestation (Grandcollot, 1976). On the contrary, the smallest number of placental barriers is typical for the hemochorial placenta, where the maternal tissue is completely absent and the maternal blood directly washed the trophoblast. The transfer of substances including antibodies, via the placenta in this species is facilitated, when compared to other types of placentation. This type of placentation includes mice, rabbits, monkeys and humans (Chucrí et al., 2010; Leiser and Kaufmann, 1994). On the basis of this information, it can be assumed that the experiments in which the antibody titer was monitored in the offspring of mice or rabbits were distorted by the fact that the antibody originated in mothers (Liu et al., 1988; Owen and Gannon, 1980; Wilson, 1986). Therefore it cannot be as an evidence of transplacental transmission of microsporidia.

Another theory could be that the number of tissue layers of placenta could have an influence on the transfer of *Encephalitozoon* organism. As mentioned above, no microsporidia were found equine foetus, but chorionic epithelial layer were positive for the parasite (Patterson-Kane et al., 2003; Szeredi et al., 2007). It could be due to the large number of placental layers that the parasite isn't able to get to foetus. Our experiments provided the evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* in mice, but the mechanism of transfer is subject to further investigation.

5. Conclusion

No microsporidial DNA were found in fetuses obtained by Caesarean section of mice which were intraperitoneally infected after mating.

All fetuses and cubs from mice which were mated either in acute or chronic phase of infection were negative.

However, cubs immunosuppressed after birth, and cubs of immunodeficient SCID mice in age of 21 days were positive on microsporidia.

Acknowledgements

This work was supported by the Agency of the Czech Republic (17-12871S) and the Grant Agency of the University of South Bohemia (002/2016/Z).

References

- Akerstedt, J., Nordstoga, K., Mathis, A., Smeds, E., Deplazes, P., 2002. Fox encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic lesions. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 49, 400–405.
- Anver, M.R., King, N.W., Hunt, R.D., 1972. Congenital encephalitozoonosis in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet. Pathol.* 9, 475–480.
- Baneux, P.J.R., Pognan, F., 2003. In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Lab. Anim.* 37, 132–138.
- Boot, R., van Knapen, F., Kruijt, B.C., Walvoort, H.C., 1988. Serological evidence for *Encephalitozoon cuniculi* infection (nosemiasis) in gnotobiotic guinea pigs. *Lab. Anim.* 22, 337–342.
- Bryan, R.T., Schwartz, D.A., 1999. Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM, Washington DC, pp. 502–516.
- Canning, E.U., Lom, J., Dyková, I., 1986. *The Microsporidia of Vertebrates*. Academic Press, London, pp. 289.
- Chucrí, T.M., Monteiro, J.M., Lima, A.R., Salvadori, M.L., Kfoury Jr., J.R., Migliano, M.A., 2010. A review of immune transfer by the placenta. *J. Reprod. Immunol.* 87, 14–20.
- Cotte, L., Rabodonirina, M., Chapuis, F., Bailly, F., Bissuel, F., Raynal, C., Gelas, P., Persat, F., Piens, M.A., Trepo, C., 1999. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 180, 2003–2008.
- Cox, J.V., Gallichio, H.A., Pye, D., Walden, N.B., 1977. Application of immunofluorescence to the establishment of an *Encephalitozoon cuniculi*-free rabbit colony. *Lab. Anim. Sci.* 27, 204–209.
- 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.
- De Groot, M.A., Visvesvara, G., Wilson, M.L., Pieniazek, N.J., Slemenda, S.B., daSilva,

- A.J., Leitch, G.J., Bryan, R.T., Reves, R., 1995. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J. Infect. Dis.* 171, 1375–1378.
- Deplazes, P., Mathis, A., Weber, R., 2000. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib. Microbiol.* 6, 236–260.
- Didier, E.S., Snowden, K.F., Shadduck, J.A., 1998. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv. Parasitol.* 40, 283–320.
- Dowd, S.E., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 1998. Confirmation of the human pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3332–3335.
- Fournier, S., Liguory, O., Santillana-Hayat, M., Guillot, E., Sarfati, C., Dumoutier, N., Molina, J., Derouin, F., 2000. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 95–100.
- Franzen, C., Müller, A., 1999. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 243–285.
- ReviewGannon, J., 1980. The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab. Anim.* 14, 189–192.
- Grandcollot, J.F., 1976. L'ictère hémolytique chez Le pois nouveau-né. (Tese e doctorado). École Nationale Vétérinaire D'Alfort. Franc. a 45–51.
- Hunt, R.D., King, N.W., Foster, H.L., 1972. Encephalitozoonosis: evidence for vertical transmission. *J. Infect. Dis.* 126, 212–214.
- Innes, J.R., Zeman, W., Frenkel, J.K., Borner, G., 1962. Occult Endemic Encephalitozoonosis of the central nervous system of mice (Swiss-Bagg-O'Grady strain). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 21, 519–533.
- Juan-Sallés, C., Garner, M.M., Didier, E.S., Serrato, S., Acevedo, L.D., Ramos-Vara, J.A., Nordhausen, R.W., Bowers, L.C., Parás, A., 2006. Disseminated encephalitozoonosis in captive, juvenile, cotton-top (*Saguinus oedipus*) and neonatal emperor (*Saguinus imperator*) tamarins in North America. *Vet. Pathol.* 43, 438–446.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Löscher, T., Rinder, H., 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1, 373–378.
- Kotková, M., Sak, B., Kvetonova, D., Kvac, 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.
- Koudela, B., Lom, J., Vitovec, J., Kučerová, Z., Ditrich, O., Trávníček, J., 1994. In vivo efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41, 49–50.
- Leiser, R., Kaufmann, P., 1994. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 122–134.
- Levaditi, C., Nicolau, S., Schoen, R., 1923. Etiology of epizootic rabbit encephalitis in reports with experimental studies of encephalitis lethargica. *Encephalitozoon cuniculi* (nov spec). *Ann. Inst. Pasteur.* 38, 675–711.
- Liu, J.J., Greeley, E.H., Shadduck, J.A., 1988. Murine encephalitozoonosis: the effect of age and mode of transmission on occurrence of infection. *Lab. Anim. Sci.* 38, 675–679.
- Mertens, R.B., Didier, E.S., Fishbein, M.C., Bertucci, D.C., Rogers, L.B., Orenstein, J.M., 1997. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. *Mod. Pathol.* 10, 68–77.
- Mohn, S.F., Nordstoga, K., 1982. Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Neonatal exposure to the parasite. *Acta Vet. Scand.* 23, 344–360.
- Mohn, S.F., Nordstoga, K., Krogsrud, J., Helgebostad, A., 1974. Transplacental transmission of *Nosema cuniculi* in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B Microbiol. Immunol.* 82, 299–300.
- Mota, P., Rauch, C.A., Edberg, S.C., 2000. Microsporidia and Cyclospora: epidemiology and assessment of risk from the environment. *Crit. Rev. Microbiol.* 26, 69–90.
- Nordstoga, K., Mohn, S.F., Aamdal, J., Helgebostad, A., 1978. Nosematosis (encephalitozoonosis) in a litter of blue foxes after intrauterine injection of *Nosema* spores. *Acta Vet. Scand.* 19, 150–152.
- Owen, D.G., Gannon, J., 1980. Investigation into the transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab. Anim.* 14, 35–38.
- Patterson-Kane, J.C., Caplazi, P., Rurangirwa, F., Tramontin, R.R., Wolfsdorf, K., 2003. *Encephalitozoon cuniculi* placentitis and abortion in a quarterhorse mare. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 57–59.
- Perrin, T.L., 1943. Spontaneous and experimental *Encephalitozoon* infection in laboratory animals. *Arch. Pathol.* 36, 559–567.
- Plowright, W., 1952. An encephalitis-nephritis syndrome in the dog probably due to congenital encephalitozoon infection. *J. Comp. Pathol.* 62, 83–92.
- Reetz, J., Wiedemann, M., Aue, A., Wittstatt, U., Ochs, A., Thomschke, A., Manke, H., Schwebs, M., Rinder, H., 2004. Disseminated lethal *Encephalitozoon cuniculi* (genotype III) infections in cotton-top tamarins (*Oedipomidas oedipus*) - a case report. *Parasitol. Int.* 53, 29–34.
- Rinder, H., Janitschke, K., Aspöck, H., da Silva, A.J., Deplazes, P., Fedorko, D.P., Franzen, C., Futh, U., Hüniger, F., Lehman, A., Meyer, C.G., Molina, J.M., Sandford, J., Weber, R., Löscher, T., 1998. The diagnostic multicenter study group on microsporidia. Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of microsporidia in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1814–1818.
- Siński, E., 2003. Environmental contamination with protozoan parasite infective stages: biology and risk assessment. *Acta Microbiol. Pol.* 52 (Suppl. 1), 97–107.
- Snowden, K.F., Didier, E.S., Orenstein, J.M., Shadduck, J.A., 1998. Animal models of human microsporidian infections. *Lab. Anim. Sci.* 48, 589–592.
- Snowden, K.F., Lewis, B.C., Hoffman, J., Mansell, J., 2009. *Encephalitozoon cuniculi* infections in dogs: a case series. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 45, 225–231.
- Snowden, K.F., Shadduck, J.A., 1999. Microsporidia of higher vertebrates. In: Wittner, M.,

- Weiss, L. (Eds.), The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM, Washington DC, pp. 393–419.
- Szabo, J.R., Shaddock, J.A., 1987. Experimental Encephalitozoonosis in neonatal dogs. *Vet. Pathol.* 24, 99–108.
- Szeredi, L., Pospischil, A., Dencsö, L., Mathis, A., Dobos-Kovács, M., 2007. A case of equine abortion caused by *Encephalitozoon* sp. *Acta Vet. Hung.* 55, 525–532.
- van Rensburg, I.B., Volkmann, D.H., Soley, J.T., Stewart, C.G., 1991. *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 62, 130–132.
- Weber, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A., Owen, R.L., 1994. Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 426–461.
- Webster, J.D., Miller, M.A., Vemulapalli, R., 2008. *Encephalitozoon cuniculi*-associated placentitis and perinatal death in an Alpaca (*Lama pacos*). *Vet. Pathol.* 45, 255–258.
- Wilson, J.M., 1986. Can *Encephalitozoon cuniculi* cross the placenta? *Res. Vet. Sci.* 40, 138.
- Wright, J.H., Craighead, E.M., 1922. Infectious motor paralysis in young rabbits. *J. Exp. Med.* 36, 135–140.
- Zeman, D.H., Baskin, G., 1985. Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Vet. Pathol.* 22, 24–31.

5.2. Differences in the intensity of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III - Comparison using quantitative real-time PCR.

Kotková, M., Sak, B., Kváč, M., 2018.

Exp Parasitol 192: 93–97.



Differences in the intensity of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III - Comparison using quantitative real-time PCR

Michaela Kotková^{a,b}, Bohumil Sak^{a,*}, Martin Kváč^{a,b}

^a Institute of Parasitology, Biology Centre, Czech Academy of Science, České Budějovice, Czech Republic

^b Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Encephalitozoon cuniculi genotypes II and III
Microsporidiosis
SCID
BALB/C
qRT-PCR

ABSTRACT

Microsporidia are a group of obligate intracellular eukaryotic parasites, which are able to infect a wide range of animals, including humans. Four genotypes of *Encephalitozoon cuniculi* have been found to date. The different courses of microsporidiosis described in humans, which are dependent on immunological status of the host and genotype of *E. cuniculi*, have been successfully imitated in murine models. In the present study, we quantified the microsporidial burden in individual organs of a murine experimental model, using qPCR and we compared the parasitic load of two genotypes of *E. cuniculi*, namely genotype II and III (EC II and EC III).

While the extent of microsporidiosis caused by EC II gradually increased over 35 days post infection (DPI) in both immunocompetent and immunodeficient mice and caused death in the latter at 28 DPI, EC III had spread into all host organs by seven DPI and was not lethal for either mouse strain during the experimental time period. Moreover, EC III persisted in many organs until termination of the experiment. The number of microsporidial spores in individual organs was ten times higher in EC III-infected animals compared to those infected with EC II. EC II infection also progressively shifted towards organs outside the gastrointestinal tract (GIT) in both monitored mouse strains; whereas, EC III infection equally remained in both the GIT and organs outside the GIT.

With the increasing use of molecular methods in diagnostics, it is important to better understand the pathophysiology of microsporidia, including its ability to escape from the immune system and persist in host organisms. Our results indicate that pathogenicity is not directly connected to spore burden, as infection caused by *E. cuniculi* genotype II is less extensive and spreads more slowly within the host organism than infection caused by *E. cuniculi* genotype III, but which caused the earlier death of immunodeficient mice.

1. Introduction

Microsporidia are heterotrophic, unicellular microorganisms classified as a single phylum (Redhead et al., 2009) that are ubiquitous in the environment and capable of infecting all groups of animals, including humans. As the first microsporidian identified in mammals and the first microsporidian successfully isolated for long-term culture, *Encephalitozoon cuniculi* is among the best-studied microsporidian species (Levaditi et al., 1923; Shaddock, 1969; Wright and Craighead, 1922). This microsporidian is not host-specific and has been reported to induce multi-organ pathogenesis including encephalitis, keratoconjunctivitis, nephritis, and hepatitis in immunocompromised patients (Abu-Akkada et al., 2015; Hocevar et al., 2014; Kicia et al., 2016) and animals (Desoubreaux et al., 2017a; b).

Based on molecular data of ITS rRNA sequences, four *E. cuniculi* genotypes have been identified so far: genotype I (“rabbit”), genotype II

(“mouse”), genotype III (“dog”), and genotype IV (“human”) (Didier et al., 1995; Talabani et al., 2010; Xiao et al., 2001). To date, the course of infection for genotypes II and III have been described in detail using nested PCR. Infections caused by either *E. cuniculi* genotype resulted in death of immunodeficient SCID mice. During the course of infection caused by *E. cuniculi* genotype II in immunocompetent BALB/c mice, the number of infected organs increased until 35 days post infection (DPI). After this peak of infection, the parasite gradually disappeared from most host organs, except the spleen. In contrast, infection caused by *E. cuniculi* genotype III had an acute phase by 7 DPI and, during the chronic stage of infection, many organs were still positive for microsporidia. Common for both genotypes is the pattern of spreading infection – after oral application, the parasite first infected the gastrointestinal tract, then spread to the abdominal organs, followed by organs of the thoracic cavity, and finally the brain was infected. Microsporidia were only found in the blood in SCID mice just prior to their

* Corresponding author BC CAS, Institute of Parasitology, Branišovská 31, 37005, České Budějovice, Czech Republic
E-mail address: casio@paru.cas.cz (B. Sak).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.07.019>

Received 19 April 2018; Received in revised form 20 July 2018; Accepted 30 July 2018

Available online 31 July 2018

0014-4894/ © 2018 Published by Elsevier Inc.

Table 1

Maximal spore burden in individual tissue samples of *E. cuniculi* genotype II and *E. cuniculi* genotype III-infected immunocompetent BALB/c and immunodeficient SCID mice.

Organ	7. DPI		14. DPI		21. DPI		28. DPI		35. DPI							
number of spores per 1 g of tissue × 10 ⁷ (BALB/c vs SCID)																
Gastrointestinal tract																
stomach	<i>E. cuniculi</i> II	< 0.1	/	0	< 0.1	/	0	0.4	/	49.1	0.8	/	95.8	1.4	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	401.3	/	44.2	220.1	/	49.1	275.1	/	767.6	240.7	/	2029.1	180.2	/	8518.3
duodenum	<i>E. cuniculi</i> II	0	/	1.9	0	/	8.9	0.3	/	26.0	0.7	/	50.2	2.0	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	392.88	/	29.3	249.93	/	70.8	292.7	/	529.3	104.45	/	1389.2	181.12	/	9808.7
jejunum	<i>E. cuniculi</i> II	0	/	0	< 0.1	/	22.6	< 0.1	/	39.4	0.2	/	76.8	0.5	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	70.3	/	61.5	110.7	/	64.7	181.6	/	162.3	222.7	/	854.2	161.7	/	4007.1
ileum	<i>E. cuniculi</i> II	0	/	0	0	/	8.2	0.1	/	27.3	0.2	/	39.3	0.9	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	91.0	/	79.1	144.4	/	717.4	216.0	/	1631.1	180.4	/	5152.8	116.9	/	7335.7
caecum	<i>E. cuniculi</i> II	0.4	/	228.3	0.7	/	868.6	4.7	/	906.0	7.1	/	2478.2	9.6	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	381.1	/	119.2	173.8	/	398.4	210.7	/	1805.8	319.9	/	11831.8	352.2	/	46655.3
colon	<i>E. cuniculi</i> II	< 0.1	/	12.2	< 0.1	/	83.5	0.2	/	763.7	0.9	/	1325.9	1.8	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	189.6	/	18.2	225.5	/	361.2	175.9	/	1130.8	177.4	/	5949.5	205.3	/	11173.2
MEAN	<i>E. cuniculi</i> II	< 0.1	/	40.4	0.1	/	165.3	0.9	/	301.9	1.7	/	677.7	2.7	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	254.4	/	58.6	187.4	/	276.9	225.3	/	1004.5	207.6	/	4534.4	201.4	/	14583.1
Organs outside gastrointestinal tract																
spleen	<i>E. cuniculi</i> II	< 0.1	/	0	0.4	/	51.0	2.6	/	336.6	15.7	/	2318.8	38.0	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	382.3	/	12.4	206.7	/	618.3	179.3	/	1274.5	210.9	/	2258.4	361.1	/	47242.1
liver	<i>E. cuniculi</i> II	0	/	0	0.1	/	76.4	3.7	/	1469.4	18.3	/	2900.4	22.3	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	75.6	/	162.2	159.4	/	258.5	179.9	/	1814.3	200.3	/	2312.8	355.8	/	25039.1
kidney	<i>E. cuniculi</i> II	0	/	5.9	< 0.1	/	73.1	0.1	/	165.7	3.5	/	1127.5	7.4	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	94.5	/	31.3	170.1	/	341.2	241.5	/	913.8	202.1	/	2350.9	306.3	/	48606.2
bladder	<i>E. cuniculi</i> II	0	/	2.3	0	/	89.8	0.1	/	126.7	0.2	/	240.8	0.4	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	102.3	/	5.9	116.6	/	24.5	85.4	/	329.1	106.2	/	831.3	178.1	/	2862.7
heart	<i>E. cuniculi</i> II	0	/	12.9	< 0.1	/	329.9	0.1	/	610.4	0.2	/	2726.6	3.6	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	77.1	/	639.0	158.3	/	884.2	123.3	/	1055.7	156.4	/	10311.3	164.1	/	48798.2
lung	<i>E. cuniculi</i> II	0	/	3.0	< 0.1	/	10.4	< 0.1	/	824.6	0.1	/	1687.9	3.4	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	104.6	/	16.4	173.5	/	99.3	224.1	/	558.3	106.7	/	1977.1	238.2	/	13480.2
brain	<i>E. cuniculi</i> II	< 0.1	/	15.4	0.7	/	46.7	6.2	/	78.7	10.9	/	167.9	24.8	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	48.5	/	17.1	106.6	/	25.3	307.1	/	174.9	209.2	/	1115.3	212.2	/	3220.7
MEAN	<i>E. cuniculi</i> II	< 0.1	/	5.7	0.2	/	96.8	1.8	/	516.0	6.9	/	1595.7	14.3	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	126.4	/	126.3	155.9	/	321.6	191.5	/	874.4	178.8	/	3022.4	259.4	/	27035.6
TOTAL MEAN	<i>E. cuniculi</i> II	< 0.1	/	23.1	0.2	/	131.1	1.4	/	409.0	4.3	/	1136.7	8.5	/	NA
	<i>E. cuniculi</i> III	190.4	/	92.5	171.7	/	299.3	208.4	/	939.5	193.2	/	3778.4	230.4	/	20809.4

death and in BALB/c mice during the acute phase of *E. cuniculi* genotype III infection (at 7 DPI) (Kotková et al., 2013, 2017).

Although the traditional polymerase chain reaction (PCR) is a sensitive method, false negative results can occur when the minimum organism concentration is below the lower limit of detection. In addition, this method does not provide any information about the number of spores in a sample and, therefore, says nothing about the total burden of the parasite on the host organism.

In this study, we quantified the spore load of individual organs in a murine host using qPCR, comparing both genotypes of *E. cuniculi*. We describe, in detail, the different courses of microsporidiosis depending on *E. cuniculi* genotype and immunological status of the host.

2. Materials and methods

2.1. Parasite

Spores of *Encephalitozoon cuniculi* genotype EC II were originally isolated from a dexamethasone-treated laboratory mouse (Koudela et al., 1994) and spores of *E. cuniculi* genotype EC III were originally isolated from pet rodents, Steppe lemmings (*Lagurus lagurus*) (Hofmannová et al., 2014). Both genotypes were grown *in vitro* in Green monkey kidney cells (VERO, line E6) maintained in RPMI-1640 medium (SIGMA) supplemented with 2.5% heat-inactivated fetal

bovine serum. Spores were harvested and purified from cells by centrifugation over 50% Percoll (SIGMA) at 1100 × g for 30 min and washed three times in deionized water before storing in deionized water supplemented with antibiotics (SIGMA; 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2.5 µg/ml amphotericin B) at 4 °C. Spores were washed with deionized water before use.

2.2. Specimens studied

To quantify *E. cuniculi* spores by qPCR in organs of the gastrointestinal tract (stomach, duodenum, jejunum, ileum, caecum, and colon) and organs outside of the gastrointestinal tract (spleen, liver, kidney, bladder, heart, lung, and brain), samples obtained from previous experiments were used (Kotková et al., 2013, 2017). Briefly, eight-week-old immunocompetent BALB/c mice and immunodeficient SCID mice were perorally (p.o.) infected with a dose of 10⁷ spores either of *E. cuniculi* genotype II or III in 0.2 ml of deionized water by intragastric gavage. Three mice from each group were euthanized by cervical dislocation every seventh day post infection and sterile samples of the above mentioned tissues were collected. Each organ was removed using a different pair of sterile dissection tools.

2.3. Molecular study

All DNA samples, obtained within previous studies (Kotková et al., 2013, 2017), were processed using a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) protocol amplifying a 268-bp region of the 16S rRNA gene of *E. cuniculi* (Wolk et al., 2002) and a 137-bp region of murine β -actin as a housekeeping gene (Dai et al., 2009). Primers and hybridization probe labeled with fluorescein reporter and FastStart Universal Probe Master were purchased from Geni Biotech (Hradec Králové, Czech Republic) and Roche (Praha, Czech Republic). Each run included negative controls consisting of unspiked tissue specimens of a known β -actin concentration, diluent blanks, and a positive control with a known concentration of *E. cuniculi* DNA. Positive results were determined using mathematical algorithms included with the Light-Cycler system. Results were determined to be positive when the fluorescence signal crossed the baseline at ≤ 43 cycles. Total amount of spores in 1 g of individual tissue samples was calculated based on a standard curve derived from serial dilutions of spores in water and recalculated based on the number of β -actin copies in the tissue sample according to Sak et al. (2017).

For the purpose of qPCR analyses, DNA of *E. cuniculi* genotype II isolated from serial dilutions of spores containing 10^3 to 10^9 spores per ml in distilled water was used to create a standard curve.

3. Results

3.1. BALB/c mice

qPCR revealed a continuous shift in tissue tropism during the course of infection with *E. cuniculi* genotype II. In the first week post infection, the highest number of microsporidial spores were detected in the gastrointestinal tract (6.7×10^5 spores per 1 g of tissue); whereas, organs outside the gastrointestinal tract were gradually more affected, reaching a maximum of 14.3×10^7 spores per 1 g of tissue at 35 DPI (Table 1). The most highly infected organs were liver, brain, and spleen. Infection in immunocompetent mice increased gradually until the end of the experiment at 35 DPI.

In contrast, a significantly elevated amount of spores per 1 g of tissue was found as early as seven DPI in hosts infected by EC III, reaching a maximum of 4.0×10^9 (Table 1). Moreover, compared to EC II, the infection remained predominantly in the gastrointestinal tract until 28 DPI (2.1×10^9 spores per 1 g of tissue), with stomach, jejunum and caecum being the most affected organs (Fig. 1). The infection burden did not shift towards organs outside the gastrointestinal tract until 35 DPI, with a mean spore burden reaching 2.6×10^9 spores per 1 g of tissue. Outside the gastrointestinal tract, spleen and liver were the most affected organs.

3.2. SCID mice

The amount of EC II spores in immunodeficient SCID mice increased gradually until host death at 28 DPI. Similar to immunocompetent BALB/c mice, the infection was located mainly in the gastrointestinal tract during the first two weeks, predominantly in the caecum (8.7×10^9 spores per 1 g of tissue). With ongoing infection, spore burden was observed to increase in organs outside of the gastrointestinal tract, namely in spleen and liver (Fig. 1, Table 1).

Contrary to EC II infection in SCID mice as well as EC III infection in BALB/c mice, the infection with *E. cuniculi* genotype III in SCID mice was predominantly in organs outside the gastrointestinal tract from the beginning of the experiment (Fig. 1). Surprisingly, the infection intensity in all organs increased dramatically after the third week of infection. However, despite an enormous burden in almost all organs, reaching up to 4.9×10^{11} spores per 1 g of tissue, the immunodeficient mice survived the infection without any clinical signs of infection until the end of the experiment at 35 DPI.

4. Discussion

Nested PCR is considered to be a sensitive and reliable method for the diagnosis of microsporidiosis (Liguory et al., 1997). However, this method has a considerable risk of contamination and does not allow quantification of parasitic burden. In this study, we used qPCR for quantitative identification of *E. cuniculi* in a murine experimental host, because it is largely more advantageous in many other aspects: it removes the requirement for separate amplification and analysis of amplicons, it also decreases the possibility of contamination, as well as it deletes the need for the teratogenic substance, ethidium bromide, used in gel electrophoresis for visualizing DNA. Using qPCR allowed us to determine the level of infection in individual organs. Our results, in accordance with results of previous studies, confirm that *E. cuniculi* infections mainly involve the spleen, heart, kidney, and brain (Kotková et al., 2013, 2017). Moreover, using the qPCR technique revealed the presence of microsporidial DNA in organs that were previously indicated as negative using nested PCR (e.g. brain in EC II-infected BALB/c mice at 7 DPI; Kotková et al., 2013).

It is well known that the pathology of encephalitozoonosis depends on the mode of infection, microsporidium genotype, and immune response of the host (Salát et al., 2001; Valenčáková and Halanová, 2012). Pathogenesis has not been evaluated in immunocompetent and other healthy people, although observations in animal models demonstrate that the presence of clinical signs in the acute stage of infection disappear despite persistent infection (Didier and Weiss, 2011). Most of the previous experimental studies examined only the prolongation of host survival time; therefore, the persistence of microsporidia in asymptomatic model hosts has generally not been investigated (Khan et al., 1999; Moretto et al., 2000; Salát et al., 2001). In this case, using qPCR, we were able to detect parasitic DNA at amounts as low as 8×10^4 . Using traditional PCR could have resulted in a false negative result for such low amounts of the parasite and, because there are no clinical signs, the animal could have been considered healthy. Results of our previous study, which was focused on experimental infection of immunocompetent BALB/c mice with *E. cuniculi* genotype II, revealed a pattern of infection that in early acute stages involved massive dissemination to multiple organs followed by late stage chronic infection, characterized by latent survival of microsporidia only in the spleen (Kotková et al., 2013). qPCR results of this study demonstrate that the spleen, of all examined organs, contained the highest amount of microsporidial spores. It is obvious that even otherwise healthy individuals cannot fully cope with microsporidial infection, despite a functional immune system. Therefore, this latent infection could serve as a reservoir for further spread of infection if the immune system is later suppressed for any reason.

For immunocompetent mouse hosts, the course of infection caused by *E. cuniculi* genotype III had a massive onset, which was characterized by the presence of this parasite in all organs within one week post infection. Although there was a disappearance of microsporidia from many organs over the next several weeks, the number of positive organs in the chronic stage of infection was much higher than during chronic infection caused by *E. cuniculi* genotype II (Kotková et al., 2017). Moreover, we found that, in comparison to EC II, the amount of microsporidial DNA in the organs is about one order of magnitude higher. A reduction in the amount of microsporidia in the organs over the following weeks suggests a partially successful host immune response to the parasite. But, as our results have shown, the success rate is much smaller than in the case of EC II, which may be due to the faster multiplication of EC III.

For immunocompetent mice infected with *E. cuniculi*, latent infection likely remains asymptomatic as long as parasite multiplication and host immune response are balanced (Gannon, 1980; Niederkorn et al., 1981); however, for immunocompromised hosts such as SCID or athymic mice, acute and potentially fatal disease develops after infection (Koudela et al., 1993; Schmidt and Shaddock, 1984). We found

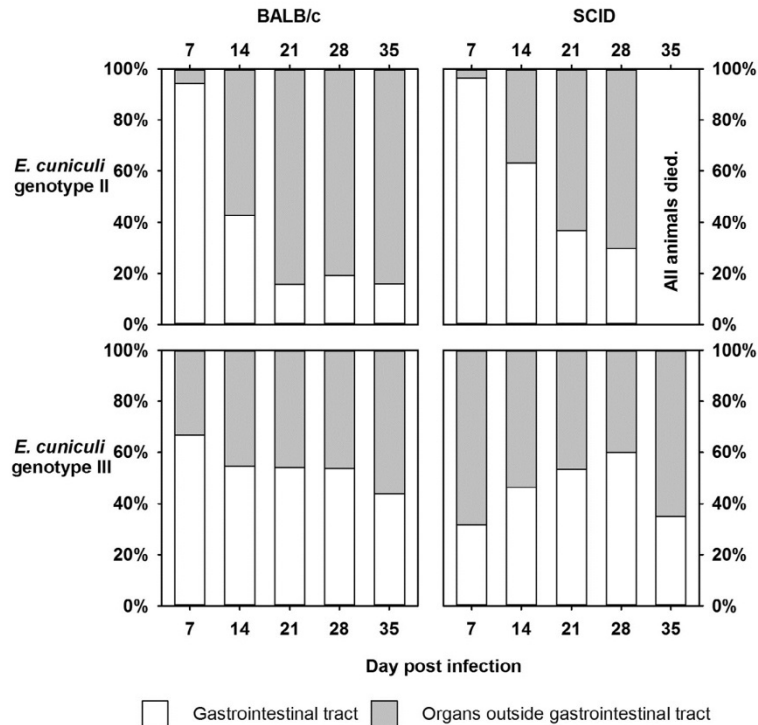


Fig. 1.

that immunodeficient mice infected with *E. cuniculi* genotype III survived surprisingly longer than mice infected with *E. cuniculi* genotype II despite having a higher parasitic burden. Although the infection caused by *E. cuniculi* genotype III had more extensive spreading (into all organs) within the first week post inoculation and the amount of microsporidial spores in individual organs was ten times higher than in the case of EC II infection, the median survival time for hosts with EC III infection was significantly longer. This may reflect differences based on *E. cuniculi* genotype in the activation of various parts of the immune system. In the case of immunodeficient SCID mice, lacking either T or B lymphocytes, NK cells and cells of the mononuclear phagocytic system seem to be front line fighters against microsporidia. NK cells produce IFN- γ , which stimulates macrophage activity. It has been shown that mice with a defective gene for the synthesis of IFN- γ succumb to infection caused by *E. cuniculi* genotype II earlier than SCID mice (Salát et al., 2004). It is therefore likely that IFN- γ produced by NK cells in SCID mice is responsible for their prolonged survival associated with activation of macrophages. This mechanism apparently applies in the early stages of infection in immunocompetent mice and thus contributes to their protection. On the other hand, it should be noted that IFN- γ derived from NK cells alone cannot protect the immunodeficient host from the development of lethal microsporidiosis. NK cells are not the only defense mechanism in immunocompetent hosts. For example, CD8⁺ T lymphocytes and antibodies help reduce the number of parasites (Valenčáková and Halanová, 2012) to help the host cope with the infection. However, exactly how EC III evades the host's immune system to spread its infection more rapidly than EC II remains an unanswered question.

Another surprising finding is a disappearance of the parasite from the gastrointestinal tract after reaching the acute phase of infection. In past studies, this was observed for both genotypes of *E. cuniculi*, with

the only exception being intermittent presence of microsporidia in the caecum of EC III infected mice (Kotková et al., 2013, 2017). Present qPCR results, however, revealed that microsporidia did not completely disappear from the gastrointestinal tract in the chronic stage of infection; rather, it was present in such a small amount that it was not detectable by common nested PCR. Together with this decreased load in the gastrointestinal system, the number of microsporidial spores increased in organs outside the gastrointestinal tract. It has been observed that the application of anti-microsporidial drugs or potentially effective selected plant extracts leads to a considerable shift of the infection towards organs outside the gastrointestinal tract and to a significant reduction in the infection intensity (Kotková et al., 2013, 2017; Lallo et al., 2013; Sak et al., 2017). Furthermore, immune reconstitution with antiretroviral therapies has greatly reduced the occurrence of microsporidiosis-associated clinical symptoms in persons with HIV infection (Didier et al., 2004; Seddon and Bhagani, 2011), but there has been no reports about the shifting of microsporidia burden between the gastrointestinal tract and visceral organs.

Based on our results, we can conclude that the spore burden does not reliably reflect pathogenicity and that survival of infected immunodeficient hosts is more likely dependent on the microsporidian genotype present. Whereas *E. cuniculi* genotype III more rapidly spreads within the host organism, *E. cuniculi* genotype II causes earlier death of immunodeficient mice. This study provides important information sorely lacking in the literature concerning latent microsporidiosis and helps to better understand the course of infection of these pathogens. We believe that evaluation and comparison of microsporidia infections in immunocompetent and immunodeficient individuals will reveal the actual extent of microsporidiosis during various phases of infection and could help address the actual role of previously considered protective parts of immune response against microsporidiosis.

Acknowledgment

This study was supported by grants from the Grant Agency of the Czech Republic (17-12871S) and the Grant Agency of the University of South Bohemia (002/2016/Z).

References

- Abu-Akkada, S.S., El Kerdany, E.D., Mady, R.F., Diab, R.G., Khedr, G.A., Ashmawy, K.I., Lotfy, W.M., 2015. *Encephalitozoon cuniculi* infection among immunocompromised and immunocompetent humans in Egypt. *Iran. J. Parasitol.* 10, 561–570.
- 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.
- Desoubreux, G., Pantin, A., Peschke, R., Joachim, A., Cray, C., 2017a. Application of Western blot analysis for the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits: example of a quantitative approach. *Parasitol. Res.* 116, 743–750.
- Desoubreux, G., Piqueras, M.D.C., Pantin, A., Bhattacharya, S.K., Peschke, R., Joachim, A., Cray, C., 2017b. Application of mass spectrometry to elucidate the pathophysiology of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *PLoS One* 12 (7), e0177961.
- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2011. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 490–495.
- 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* genotypes. *Parasitology* 111, 411–421.
- Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K., Didier, P.J., 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.* 126, 145–166.
- Gannon, J., 1980. The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab. Anim.* 14, 189–192.
- Hocevar, S.N., Paddock, C.D., Spak, C.W., Rosenblatt, R., Diaz-Luna, H., Castillo, I., Luna, S., Friedman, G.C., Antony, S., Stoddard, R.A., Tiller, R.V., Peterson, T., Blau, D.M., Sriram, R.R., da Silva, A., de Almeida, M., Benedict, T., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Visvesvara, G.S., Kuehnert, M.J., Microsporidia Transplant Transmission Investigation Team, 2014. Microsporidiosis acquired through solid organ transplantation: a public health investigation. *Ann. Intern. Med.* 160, 213–220.
- Hofmannová, L., Sak, B., Jekl, V., Mináriková, A., Skorič, M., Kváč, M., 2014. Lethal *Encephalitozoon cuniculi* genotype III infection in Steppe lemmings (*Lagurus lagurus*). *Vet. Parasitol.* 205, 357–360.
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Kasper, L.H., Moretto, M., 1999. CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J. Immunol.* 162, 6086–6091.
- Kicia, M., Wesolowska, M., Kopacz, Z., Jakuszko, K., Sak, B., Květonová, D., Krajewska, M., Kváč, M., 2016. Prevalence and molecular characteristics of urinary and intestinal microsporidia infections in renal transplant recipients. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 462 e5–9.
- Kotková, M., Sak, B., Květonová, 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.
- Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Kváč, M., 2017. The course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice. *Exp. Parasitol.* 182, 16–21.
- Koudela, B., Vítovec, J., Kucerová, Z., Ditrich, O., Trávníček, J., 1993. The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol. (Praha)* 40, 279–286.
- Koudela, B., Lom, J., Vítovec, J., Kučerová, Z., Ditrich, O., Trávníček, J., 1994. In vivo efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41, 49–50.
- Lallo, M.A., da Costa, L.F., de Castro, J.M., 2013. Effect of three drugs against *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3067–3071.
- Levaditi, C., Nicolau, S., Schoen, R., 1923. L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *C. R. Soc. Biol. Paris* 89, 984–986.
- Liguory, O., David, F., Sarfati, C., Schuitema, A.R., Hartskeerl, R.A., Derouin, F., Modai, J., Molina, J.M., 1997. Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* using polymerase chain reaction in stool specimens. *AIDS* 11, 723–726.
- Moretto, M., Casciotti, L., Durell, B., Khan, I.A., 2000. Lack of CD4(+) T cells does not affect induction of CD8(+) T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect. Immun.* 68, 6223–6232.
- Niederhorn, J.Y., Shaddock, J.A., Schmidt, E.C., 1981. Susceptibility of selected inbred genotypes of mice to *Encephalitozoon cuniculi*. *J. Infect. Dis.* 144, 249–253.
- Redhead, S.A., Kirk, P.M., Keeling, P.J., Weiss, L.M., 2009. Proposals to exclude the phylum microsporidia from the code. *Taxon* 58, 669.
- Sak, B., Jandová, A., Doležal, K., Kváč, M., Květonová, D., Hlásková, L., Rost, M., Olšanský, M., Nurcahyo, W., Foitová, I., 2017. Effects of selected Indonesian plant extracts on *E. cuniculi* infection. *Exp. Parasitol.* 181, 94–101.
- Salát, J., Braunfuchsová, P., Kopecký, J., 2001. Experimental infection of immunocompetent and immunodeficient mice with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol. (Praha)* 48, 249–254.
- Salát, J., Sak, B., Le, T., Kopecký, J., 2004. Susceptibility of IFN- γ or IL-12 knock-out and SCID mice to infection with two microsporidian species, *Encephalitozoon cuniculi* and *E. intestinalis*. *Folia Parasitol.* 51, 275–282.
- Schmidt, E.C., Shaddock, J.A., 1984. Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J. Immunol.* 133, 2712–2719.
- Seddon, J., Bhagani, S., 2011. Antimicrobial therapy for the treatment of opportunistic infections in HIV/AIDS patients: a critical appraisal. *HIV AIDS* 3, 19–33.
- Shaddock, J.A., 1969. *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. *Science* 166, 516–517.
- Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., Menotti, J., 2010. Disseminated infection with a new genotype of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2651–2653.
- Valenčáková, A., Halanová, M., 2012. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1–7.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3922–3928.
- Wright, J.H., Craighead, E.M., 1922. Infectious motor paralysis in young rabbits. *J. Exp. Med.* 36, 135–140.
- Xiao, L., Li, L., Visvesvara, G.S., Moura, H., Didier, E.S., Lal, A.A., 2001. Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2248–2253.

5.3. Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis.

Sak, B., **Kotková, M.**, Hlásková, L., Kváč, M., 2018.

Parasite Immunol 39: e12496.

Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis

B. Sak¹  | M. Kotková² | L. Hlásková¹ | M. Kváč^{1,2}¹Institute of Parasitology, BC CAS, v.v.i., České Budějovice, Czech Republic²Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic**Correspondence**Bohumil Sak, Institute of Parasitology, BC CAS, v.v.i., České Budějovice, Czech Republic.
Email: casio@paru.cas.cz**Funding information**

Grantová Agentura České Republiky, Grant/Award Number: 17-12871S and P302-14-20684S

Summary

This study revises our understanding of the effectiveness of cell-mediated adaptive immunity and treatment against microsporidia using molecular detection and quantification of microsporidia in immunocompetent C57Bl/6 and immunodeficient CD4^{-/-} and CD8^{-/-} mice for the first time. We demonstrate an intense dissemination of microsporidia into most organs within the first weeks post-infection in all strains of mice, followed by a chronic infection characterized by microsporidia persistence in CD4^{-/-} and C57Bl/6 mice and a lethal outcome for CD8^{-/-} mice. Albendazole application reduces microsporidia burden in C57Bl/6 and CD4^{-/-} mice, whereas CD8^{-/-} mice experience only a temporary effect of the treatment. Surprisingly, treated CD8^{-/-} mice survived the entire experimental duration despite enormous microsporidia burden. On the basis of our results, we conclude that microsporidia survive despite the presence of immune mechanisms and treatments that are currently considered to be effective and therefore that CD8 T lymphocytes represent a major, but not sole effector mechanism controlling microsporidiosis. Furthermore, the survival of mice does not correspond to spore burden, which provides new insight into latent microsporidiosis from an epidemiological point of view.

KEYWORDS

CD4 T lymphocytes, Cell, CD8+ T lymphocytes, Cell, Encephalitozoon cuniculi, Parasite

1 | INTRODUCTION

Microsporidia are intracellular spore-forming unicellular parasites that infect a wide range of vertebrate and invertebrate hosts, including humans.¹ The natural route of entry for the parasite into the host is by ingestion or inhalation of infectious spores.² Microsporidia have been recognized as the causative agents of opportunistic infections in individuals with deficient immunity, particularly in patients with AIDS.³

Most of what is known about microsporidia is based on *Encephalitozoon cuniculi*,⁴ which infects a variety of host cells causing various pathologies affecting the nervous system, respiratory and digestive tracts, liver, peritoneum, lung, bladder and kidney.^{5,6}

Studies of the immune response against microsporidia are based on experimental infections of various strains of mice. Initial studies showed that the course of infection is dependent on the immune status of the host—for immunocompetent mice, latent infection

remained asymptomatic,^{7,8} whereas, in immunocompromised hosts acute, potentially fatal disease developed after experimental infection.^{9,10} In subsequent studies, host immunity against microsporidia has been examined intensively and the potential protective role of both humoral and cellular immunity was established. The central role of cell-mediated immunity, IFN- γ and IL-12 in the defence against microsporidial infection has been demonstrated in adoptive transfer experiments using SCID or athymic mice.¹¹⁻¹⁴ Furthermore, the significance of individual T-cell subsets in immunity against *E. cuniculi* has been shown using gene knock-out mice, highlighting the role of CD8 cytotoxic T lymphocytes.¹⁵⁻¹⁷

However, all of the above-mentioned studies were focused only on extending the hosts' survival time regardless of the possible persistence of microsporidia and the development of latent infection. With the recent introduction of a method for molecular detection of microsporidia in hosts, it appears that microsporidia successfully

TABLE 1 Design of experiments

Groups	n1	n2	Day post-infection												Figure					
			0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77		84	91			
Control ^a	C57Bl/6	42	42	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NS	
	CD4 ^{-/-}	42	42	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NS
	CD8 ^{-/-}	42	42	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NS
Experimental ^b	C57Bl/6	39	69	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1A
	Infection+treatment (28.-42. DPI)	30																		1B
	CD4 ^{-/-}	39	69	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1C
	Infection+treatment (28.-42. DPI)	30																		1D
	CD8 ^{-/-}	39	54	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1E
Infection+treatment (28.-42. DPI)	30																			1F

n1, number of infected animals; n2, number of dissected animals NS, not shown; x, not observed due to animals' death; DPI, day post-infection; light-grey field, albendazole treatment.

^aInoculation with 0.2 mL of sterilized deionised water.

^bInfection with 10⁷ *Encephalitozoon cuniculi* spores in 0.2 mL of sterilized deionised water.

survive in immunocompetent hosts or in albendazole-treated individuals and, moreover, that they are able to reactivate from undetectable levels and spread within these hosts after the induction of immunosuppression or albendazole treatment termination.¹⁸

Thus, this study was designed to determine the effectiveness of individual components of cell-mediated immunity against infection caused by *E. cuniculi* using CD4^{-/-} and CD8^{-/-} knock-out mice with molecular detection and quantification of microsporidia infection.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethics statement

All experimental procedures complied with the law of Czech Republic (Act No. 246/1992 Coll., on the protection of animals against cruelty). The study design was approved by ethical committees at the Biology Centre of CAS, the State Veterinary Administration, and the Central Commission for Animal Welfare under Protocol No. 085/2013.

2.2 | Mice

Eight-week-old immunodeficient (CD4^{-/-} and CD8^{-/-}) and immunocompetent (C57Bl/6) mice (Charles River, Sulzfeld, Germany) were housed in plastic cages with sterilized wood-chip bedding situated in flexible film isolators (BEM Znojmo, Czech Republic) with HEPA filters. All mice were supplied a sterilized diet (TOP-VELAZ Praha, Czech Republic) and sterilized water *ad libitum*.

2.3 | Parasites

The spores of *E. cuniculi* strain EC2¹⁹ were grown in vitro in Green monkey kidney cells (VERO E6) maintained in RPMI-1640 medium (SIGMA) supplemented with 2.5% foetal bovine serum. Spores were purified by centrifugation over 50% Percoll (SIGMA) and stored in sterilized deionised water supplemented with antibiotics (SIGMA).

2.4 | Experimental protocol

Groups of mice were per orally (p.o.) infected with 10⁷ *E. cuniculi* spores in 0.2 mL of deionised water by intragastric gavage. Design of experiments is shown in Table 1. Selected groups were daily p.o. treated by intragastric gavage with albendazole (Aldifal, MEVAK NITRA, SR; 0.2 mg/animal) for a period of 14 days starting on the 28th day post-infection (DPI). Noninfected mice of each strain were used as negative controls. Faecal samples were obtained daily from each mouse separately and stored at -20°C for further molecular analyses. The animals' health, mortality and morbidity were recorded at twelve-hour intervals.

Three mice from each group were euthanized by cervical dislocation every seventh DPI, and sterile specimens were obtained using a different pair of sterile dissection tools.

2.5 | DNA isolation

Faecal, organ and body fluid samples were homogenized by bead disruption using a FastPrep[®]-24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) and 0.5 mm glass beads (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) at a speed of 5.5 m/s for 1 min. Total DNA was extracted using the commercial column-based isolation kits QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit and DNeasy Blood & Tissue Kit (both from Qiagen, Hilden, Germany). Acquired DNA was stored at -20°C.

2.6 | PCR amplification

Nested PCR protocols were used for the amplification of a partial sequence of 16S rRNA, using microsporidia-specific primers.^{20,21} DNA obtained from spores of *E. intestinalis* was used as a positive control. Ultrapure water was used as a negative control. A total of 3 randomly selected positive samples from each animal were sequenced to verify the identity with the inoculum. If one of the samples originating from triplicate mice was found positive, the organ was considered positive.

2.7 | qRT-PCR

Selected DNA samples from the peak of infection were processed using a quantitative RT-PCR protocol amplifying a 268 bp region of the 16S rRNA gene of *E. cuniculi*²² and a 137 bp region of murine β -actin as a housekeeping gene.²³ Each run included negative controls consisting of unspiked specimens and diluent blanks. The total amount of spores in 1 g of individual faecal or tissue samples was calculated based on the standard curve derived from serial dilutions of spores in water and faeces and the known weight of faecal samples or recalculated based on the number of β -actin copies in the tissue sample, respectively.

2.8 | Statistical analysis

Differences in survival time between groups of mice and differences in the numbers of affected organs within individual groups of mice were analysed by nonparametric Mann-Whitney *U* tests using Statistica 6.0 software (StatSoft CR, Praha, Czech Republic).

3 | RESULTS

The course of microsporidiosis in control C57Bl/6 mice was characterized by the progressive dissemination of spores into multiple organs within 21 DPI (Figure 1A). After this acute stage, microsporidia disappeared from half of the positive organs; however, spleen, lung, jejunum and peritoneum were repeatedly positive during the chronic stage of infection until experiment termination at the 91st DPI. Other examined organ and body fluid specimens were positive at irregular intervals. The maximum spore burden of 6.59×10^7 per gram of tissue was reported on the 28th DPI. Microsporidial DNA was detected in faecal samples from the 4th DPI, but shedding was intermittent over

the course of infection and became less frequent towards the end of the sampling period (Figure 1A).

Application of albendazole in C57Bl/6 mice led to a noticeable reduction in the number of affected organs. Starting from the 49th DPI (1 week after treatment termination), no microsporidia were detected in any tested organ or body fluid (Figure 1B). Additionally, faecal samples examined during and after treatment were negative for the presence of parasite's DNA except on the 31st and 37th DPI (Figure 1B).

A comparable onset of infection was recorded for CD4^{-/-} mice, reaching a maximum of 1.19×10^8 spores per gram of tissue on the 28th DPI; however, during the chronic infection period microsporidia remained extensively spread throughout the mouse body, predominantly in organs outside the gastrointestinal tract (Figure 1C). Shedding of microsporidia in faeces began on the 5th DPI, and a detectable amount was reported on numerous days until the end of the experiment. Compared with control C57Bl/6 mice, CD4^{-/-} mice shed spores more frequently (Figure 1C).

Albendazole treatment in CD4^{-/-} mice had the same effect as in the control group, except that the period until total disappearance of microsporidia lasted longer, namely 63 DPI (3 weeks post-treatment termination). Also, faecal samples were more frequently positive for microsporidial DNA than in the case of control albendazole-treated C57Bl/6 mice and a positive reaction was reported as late as 41 DPI (Figure 1D).

In contrast, inoculation of *E. cuniculi* caused a severe, fatal disease in CD8^{-/-} mice, which was characterized by aggressive dissemination of microsporidia throughout the host within 5 weeks post-infection, with a maximum spore burden of 5.27×10^9 per gram of tissue on the 35th DPI. In the following weeks, a temporary disappearance of the parasite from several organs, including the liver and bladder, was observed; however, these mice succumbed to the infection on the 58th DPI. Faecal samples were positive for microsporidia almost every day beginning on the 5th DPI (Figure 1E).

Treatment of infected CD8^{-/-} mice with albendazole from the 28th to 42nd DPI resulted in survival prolongation and the disappearance of microsporidia from several organs 1 week after treatment termination. Subsequently, however, the parasite re-disseminated to almost all organs. Microsporidial DNA was detected in faecal samples almost every day from the 4th DPI until albendazole treatment began. A reduced frequency of spore shedding was recorded during and after treatment between the 28th and 65th DPI; however, spores were again detected in faeces almost every day from the 65th DPI through to experiment termination (Figure 1F). The mice survived until the end of the experiment on the 91st DPI without any signs indicating possible oncoming death.

4 | DISCUSSION

Microsporidiosis is an emerging infectious disease with a rapidly broadening clinical spectrum including gastrointestinal, pulmonary, nasal, ocular, muscular, cerebral and systemic infections. Microsporidiosis should be considered not only in the differential

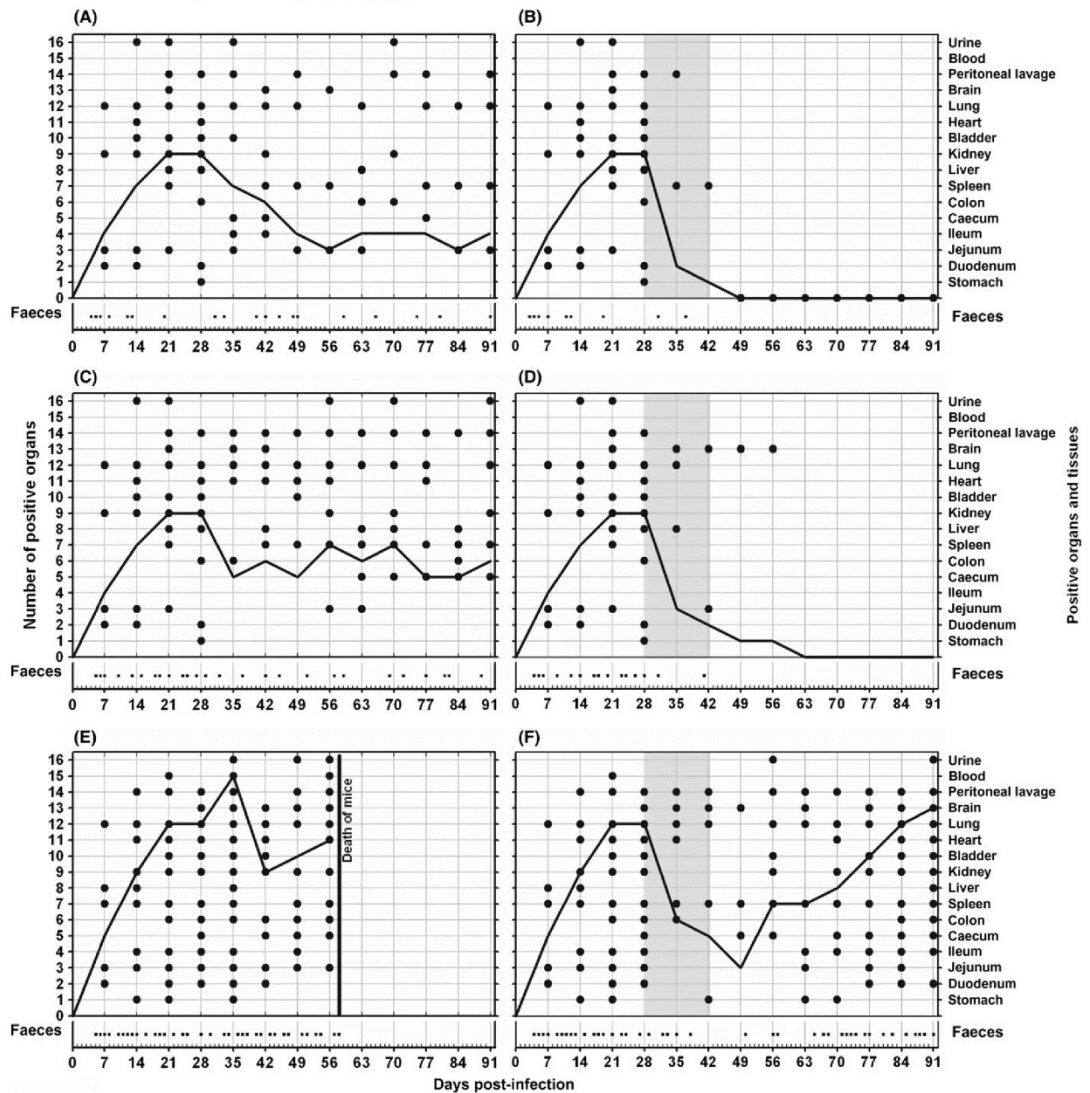


FIGURE 1 Course of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II infection, including pattern of spore shedding and dissemination of infection to selected organs and tissues. (A) C57Bl/6 mice, (B) C57Bl/6 mice treated with albendazole, (C) CD4^{-/-} mice, (D) CD4^{-/-} mice treated with Albendazole, (E) CD8^{-/-} mice, (F) CD8^{-/-} treated with albendazole. Grey field—albendazole treatment; black line—course of *E. cuniculi* infection; dot—*E. cuniculi* positive organ; black square—shedding of spores

diagnosis of HIV-related symptomatic disease of virtually all organ systems affected,²⁴ but also in immunocompetent individuals as causative agents of diseases with unknown aetiology.^{25,26}

In recent decades, intense study of host immunity against microsporidia has been enabled by the establishment of murine models that successfully reproduce the different courses of infection observed in hosts of varying immunological status. Although the roles of both humoral and cellular immunity were previously demonstrated, the central role of

cell-mediated immunity, especially that of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes, in the defence against microsporidial infection has been recently confirmed with adoptive transfer experiments.^{9,11,15,27,28} Furthermore, the partial role of CD4⁺ T lymphocytes and the significance of both interferon gamma (IFN- γ) and interleukin 12 among studied cytokines have been reported.^{12,17,29} More recently, partial roles for professional or nonprofessional phagocytes, natural killer and dendritic cells, and antimicrobial molecules have also been proposed.^{30,31}

Similarly, studies in humans have demonstrated that the recovery of T-cell levels via protease inhibitor (antiretroviral) therapy leads to the resolution of microsporidiosis in patients infected with HIV.^{32,33} However, with the establishment of molecular methods for routine diagnostics, microsporidia have become more frequently reported, including in immunocompetent individuals without any manifestation of the infection.^{34–38} This implies that even the otherwise healthy individuals cannot fully cope with microsporidial infection despite having a functional immune system.

This hypothesis was first supported experimentally by Kotková et al,¹⁸ who demonstrated that spores of *E. cuniculi* remain in some organs of immunocompetent BALB/c mice and can serve as constant sources of infection. Likewise, results of the present study showed a massive onset of infection in immunocompetent C57Bl/6 mice with a disappearance of microsporidia from many organs during the next several weeks. However, the extent of chronic infection was much higher than that previously reported in BALB/c mice.¹⁸

On the other hand, a variety of outcomes have been reported for different strains of severely immunodeficient mice. While encephalitozoonosis in SCID mice was characterized by a gradual dispersal leading to death within 5 weeks post-infection,¹⁸ CD8^{-/-} mice survived significantly longer (8 weeks post-infection) in the present study, supporting a role for other immune mechanisms such as CD4 + T lymphocytes, B lymphocytes and cytokines, as previously suggested in survival experiments.^{12,17,29} Surprisingly, CD8^{-/-} mice reached a comparable level of spore dissemination during the acute phase of infection to that reported in SCID mice¹⁸ and the spore burden reached a maximum of 5.27×10^9 per gram of tissue on the 35th DPI, indicating that the observed survival prolongation is not solely dependent on spore quantity reduction. Moreover, the CD4^{-/-} mice that successfully survived the 3 month-long experiment were intensively parasitized by microsporidia reaching a maximum of 1.19×10^8 per gram of tissue on the 28th DPI. This result strongly opposes the generally accepted conception of the essential role and effectiveness of cell-mediated immunity (mostly CD8 + T lymphocytes) in protection against microsporidiosis as originally proposed.^{15,27,28}

Chemotherapy of microsporidiosis is limited to a few drugs including albendazole, Fumagillin and protease inhibitors used in antiretroviral therapy. The efficacy of a treatment in the elimination of microsporidia was originally evaluated by extension of hosts' survival time using in vivo experimental infections. However, recently published studies showed that treatment with albendazole caused ostensible disappearance of *E. cuniculi* from all organs and tissues in immunocompetent murine hosts and that microsporidia can spread again from hidden foci after treatment termination or immunosuppression of the host.^{18,39} In the present study, immunocompetent C57Bl/6 mice and CD4^{-/-} mice were both successfully treated with albendazole; however, only a temporary remission was observed in CD8^{-/-} mice, with the number of affected organs by the end of the experiment being comparable to that of untreated mice during the acute phase of infection. Our results highlight the importance of determining the mechanisms by which hosts survive an extensive spore load (as in CD4^{-/-} mice) and how microsporidia escape from both the immune

response and current treatments. We propose that host survival is prolonged despite considerable spreading of microsporidia due to the activation of different immune system effectors. For example, natural killer (NK) cells seem to be an important factor in cases of microsporidiosis in immunodeficient hosts, but this remains a question for future research. Understanding both how microsporidia survive in their hosts despite a competent immune system and how infected hosts survive despite an enormous spore burden in their tissues without any clinical signs of infection could significantly contribute to research related to the epidemiology of microsporidiosis.

ACKNOWLEDGEMENT

The study was supported by grants from the Grant Agency of the Czech Republic (Nos. P302-14-20684S and 17-12871S).

CONFLICT OF INTEREST

None.

ORCID

B. Sak  <http://orcid.org/0000-0002-1789-8545>

REFERENCES

1. Canning EU, Lom J, Dykova I. *The Microsporidia of Vertebrates*. London: Academic Press; 1986:289.
2. Bryan RT, Schwartz DA. Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner M, Weiss LM, eds. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC: ASM Press; 1999:502-516.
3. Canning EU, Hollister WS. Human infections with microsporidia. *Rev Med Microbiol*. 1992;2:35-42.
4. Levaditi C, Nicolau S, Schoen R. L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *C R Soc Biol Paris*. 1923;89:984-986.
5. Didier ES, Snowden KF, Shaddock JA. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv Parasitol*. 1998;40:283-320.
6. Mertens RB, Didier ES, Fishbein MC, Bertucci DC, Rogers LB, Orenstein JM. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. *Mod Pathol*. 1997;10:68-77.
7. Gannon J. The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab Anim*. 1980;14:189-192.
8. Niederkorn JY, Shaddock JA, Schmidt EC. Susceptibility of selected inbred strains of mice to *Encephalitozoon cuniculi*. *J Infect Dis*. 1981;144:246-253.
9. Schmidt EC, Shaddock JA. Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of the chronic infection. *Infect Immun*. 1983;40:936-942.
10. Koudela B, Vítovec J, Kučerová Z, Ditrich O, Trávníček J. The severe combined immunodeficient mouse as model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol*. 1993;40:279-286.
11. Heřmánek J, Koudela B, Kučerová Z, Ditrich O, Trávníček J. Prophylactic and therapeutic immune reconstitution of SCID mice infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol*. 1993;40:287-291.
12. Braunfuchsová P, Kopecký J, Ditrich O, Koudela S. The cytokine response to the infection with the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol*. 1999;46:91-95.

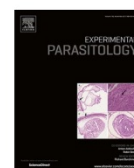
13. Salát J, Sak B, Le T, Kopecký J. Susceptibility of IFN- γ or IL-12 knock-out and SCID mice to infection with two microsporidian species, *Encephalitozoon cuniculi* and *E. intestinalis*. *Folia Parasitol.* 2004;51:275-282.
14. Sak B, Ditrich O. Humoral intestinal immunity against *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) infection in mice. *Folia Parasitol.* 2005;52:158-162.
15. Khan IA, Schwartzman JD, Kasper LH, Moretto M. CD8 + CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol.* 1999;162:6086-6091.
16. Moretto M, Casciotti L, Durell B, Khan IA. Lack of CD4(+) T cells does not affect induction of CD8(+) T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun.* 2000;68:6223-6232.
17. Sak B, Salát J, Horká H, Saková K, Ditrich O. Antibodies enhance the protective effect of CD4 + T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasite Immunol.* 2006;28:95-99.
18. Kotková M, Sak B, Květoňová D, Kváč M. Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with Albendazole. *PlosOne.* 2013;8:e60941.
19. Koudela B, Lom J, Vitovec J, Kučerová Z, Ditrich O, Trávníček J. *In vivo* efficacy of Albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *J Eukaryot Microbiol.* 1994;41:49-50.
20. De Bosscuere H, Wang Z, Orlandi PA. First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. hellem* in a European brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. *Zoonoses Public Health.* 2007;54:131-134.
21. Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Helse W, Löscher T, Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop Med Int Health.* 1996;1:373-378.
22. Wolk DM, Schneider SK, Wengenack NL, Sloan LM, Rosenblatt JE. Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3922-3928.
23. Dai J, Wang P, Adusumilli S, et al. Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell Host Microbe.* 2009;6:482-492.
24. Orenstein JM, Gaetz HP, Yachnis AT, Frankel SS, Mertens RB, Didier ES. Disseminated microsporidiosis in AIDS: are any organs spared. *AIDS.* 1997;11:385-386.
25. Ditrich O, Chrdle A, Sak B, et al. *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2769-2771.
26. Kicia M, Wesolowska M, Jakuszko K, et al. Concurrent infection of the urinary tract with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bienewisi* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1780-1782.
27. Braunfuchsová P, Salát J, Kopecký J. Comparison of the significance of CD4 and CD8 T lymphocytes in the protection of mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Parasitol.* 2002;88:797-799.
28. Moretto M, Weiss LM, Khan IM. Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol.* 2004;172:4402-4409.
29. Khan IA, Moretto M. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun.* 1999;67:1887-1893.
30. Franzen C, Hartmann P, Salzberger B. Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. *Exp Parasitol.* 2005;109:1-6.
31. Moretto MM, Weiss LM, Combe CL, Khan IA. IFN-gamma-producing dendritic cells are important for priming of gut intraepithelial lymphocyte response against intracellular parasitic infection. *J Immunol.* 2007;179:2485-2492.
32. Goguel J, Katlama C, Sarfati C, Maslo C, Lepout C, Molina JM. Remission of AIDS-associated intestinal microsporidiosis with highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 1997;11:1658-1659.
33. Pozio E, Morales MA. The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitol.* 2005;21:58-63.
34. Sak B, Kváč M, Kučerová Z, Květoňová D, Saková K. Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals - a longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1162.
35. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S. *Enterocytozoon bienewisi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67:299-303.
36. Nkinin SW, Asonganyi T, Didier ES, Kaneshiro ES. Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2841-2846.
37. Samie A, Obi CL, Tzipori S, Weiss LM, Guerrant RL. 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.* 2007;101:547-554.
38. Sak B, Brady D, Pelikánová M, et al. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1064-1070.
39. Lallo MA, da Costa LF, de Castro JM. Effect of three drugs against *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:3067-3071.

How to cite this article: Sak B, Kotková M, Hlásková L, Kváč M. Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis. *Parasite Immunol.* 2017;39:e12496. <https://doi.org/10.1111/pim.12496>

5.4. The course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice.

Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Kváč, M., 2017.

Exp Parasitol 182: 16–21.



The course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice



Michaela Kotková^{a,b}, Bohumil Sak^{a,*}, Lenka Hlásková^a, Martin Kváč^{a,b}

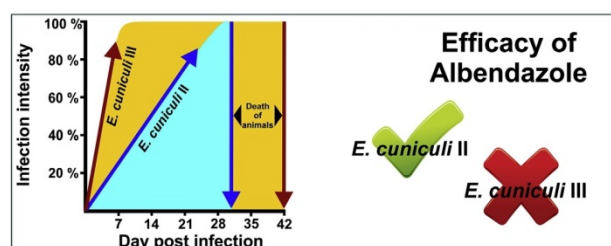
^a Institute of Parasitology, Biology Centre, Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic

^b Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

HIGHLIGHTS

- *Encephalitozoon cuniculi* III had much more progressive course of infection than *E. cuniculi* II.
- *Encephalitozoon cuniculi* III-infected mice survived longer compared to *E. cuniculi* II-infected ones.
- Albendazole treatment had a minimal effect on *Encephalitozoon cuniculi* III infection.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2017

Received in revised form

1 September 2017

Accepted 17 September 2017

Available online 21 September 2017

Keywords:

Encephalitozoon cuniculi genotypes II and III

Microsporidiosis

SCID

BALB/C

Albendazole

ABSTRACT

Encephalitozoon cuniculi is probably the most common microsporidia which infects a wide range of vertebrates, including human. So far, four genotypes of this parasite have been identified based on the rRNA internal transcribed spacer variations.

The course of infection caused by *E. cuniculi* III had very massive onset in immunocompetent host characterized by the presence of this parasite in all organs and tissues within one week after peroral infection. Encephalitozoonosis caused by *E. cuniculi* III had very progressive spreading into all organs within first week post inoculation in immunocompromised SCID mice and led to the death of the host. The experimental treatment with albendazole of immunocompetent BALB/c mice infected with *E. cuniculi* III have shown very weak effect.

Our findings clearly showed that the different course of infection and response to treatment depends not only on the immunological status of the host, but also on the genotype of microsporidia. It could be very important especially for individuals under chemotherapy and transplant recipients of organs originating from infected donors.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Microsporidia are unicellular intracellular spore-forming

parasites belonging to the phylum Microsporidia. The best described microsporidian is *Encephalitozoon cuniculi*, which infect a wide range of vertebrates and invertebrates (Canning et al., 1986). This species was first recognized by Wright and Craighead (1922) in rabbit with motor paralysis, and subsequently described by Levaditi et al., in 1923. Currently, four genotypes of *E. cuniculi* have been determined according to the number of 5'-GTTT-3' repeats in the

* Corresponding author. BC CAS, Institute of Parasitology, Branišovská 31, 37005 České Budějovice, Czech Republic.

E-mail address: casio@paru.cas.cz (B. Sak).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.022>
0014-4894/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA gene; “rabbit” genotype I with three repeats, “mouse” genotype II with two repeats, “dog” genotype III with four repeats and “human” genotype IV with five repeats (Didier et al., 1995; Talabani et al., 2010; Xiao et al., 2001).

While *E. cuniculi* genotype II has been found in many different species of hosts, *E. cuniculi* genotype III has been identified only in lemmings, rabbits, birds, swine, dogs, blue foxes, snow leopard, tamarins and squirrel monkeys, and also in humans so far (Asakura et al., 2006; Cutlip and Beall, 1989; Hocevar et al., 2014; Hofmannová et al., 2014; Juan-Sallés et al., 2006; Kašicková et al., 2009; Meng et al. 2014; Reetz et al., 2004, 2009; Scurrell et al., 2015; Snowden et al., 2009; Valencakova et al., 2011). While birds and swine didn't suffer from any symptoms of the disease, clinical signs in canine hosts included blindness, nephritis and neurological disorders (Botha et al., 1986; Mathis et al., 2005; Snowden et al., 2009). Also in tamarin colonies in zoos in Europe was observed high mortality in infants due to infection of *E. cuniculi* strain III (Guscetti et al., 2003; Reetz et al., 2004). Likewise, the fatal encephalitozoonosis was described in a group of pet rodents, Steppe lemmings, where not only juveniles were affected, but also adults (Hofmannová et al., 2014). On the other hand, experimental infections of monkeys with dog- or rabbit-derived isolates of *E. cuniculi* resulted in asymptomatic chronic infections (Didier et al., 1994; van Dellen et al., 1989). This implies that the different course of infection depends not only on the immunological status of the host, which has been successfully imitated in murine model hosts (Gannon, 1980; Kotková et al., 2013). Many other factors as microsporidia genotype, host age and mode of infection may influence the outcome of infection.

Thus, this study is aimed to describe the course of acute and latent microsporidiosis using *Encephalitozoon cuniculi* strain III – murine model and to determine the effect of treatment with albendazole. The results of this study could help to compare the course of infection between two genotypes of *Encephalitozoon cuniculi*.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement

All of the experimental procedures were conducted in accordance with the law of the Czech Republic on the use of experimental animals, safety and use of pathogenic agents (Act No 246/1992 Coll., on the protection of animals against cruelty). The study design including number of used animals and the possibility of animal death without euthanasia due to experimental intervention, was approved by the Ethical committee at Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, State Veterinary Administration and Central Commission for Animal Welfare under protocol no. 085/2013.

2.2. Mice

Both adult immunodeficient SCID mice (strain C.B-17) of the BALB/c background and immunocompetent BALB/c mice were originally obtained from Charles River, Sulzfeld, Germany and bred in plastic cages with sterilized wood-chip bedding situated in IVC Air Handling Solutions (Techniplast, Italy) with high-efficiency particulate air (HEPA) filters. The experimental 8-week-old animals were housed in plastic cages with sterilized wood-chip bedding situated in flexible film isolators (BEM Znojmo, Czech Republic) with HEPA filters. All mice were supplied sterilized diet (TOP-VELAZ Praha, Czech Republic) and sterilized water *ad libitum*.

2.3. Parasite

The spores of *E. cuniculi* strain EC III were originally isolated from pet rodents Steppe lemmings (*Lagurus lagurus*) (Hofmannová et al., 2014) and were grown *in vitro* in Green monkey kidney cells (VERO, line E6) maintained in RPMI-1640 medium (SIGMA) supplemented with 2.5% heat-inactivated foetal bovine serum. Spores were isolated and purified from cells by centrifugation over 50% Percoll (SIGMA) at 1100×g for 30 min and washed three times in deionised water before storing in deionised water supplemented with antibiotics (SIGMA, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2.5 µg/ml amphotericin B) at 4 °C. The spores were washed in deionised water before use.

2.4. Drugs

Alfidal (MEVAK NITRA, SR) containing 100 g of albendazole in 1000 ml, was dosed for treatment of microsporidiosis as follows: a total 0.2 mg of albendazole dissolved in 200 µl deionised water was p.o. (per orally) administered by intragastric gavage per mouse. To avoid distortion of results we did not use any pain relievers or anesthesia during whole experiment.

2.5. Experimental protocol

Four groups of SCID mice and three groups of BALB/c mice were p.o. infected with a dose of 10^7 *E. cuniculi* strain III spores in 0.2 ml of deionised water by intragastric gavage. One group of BALB/c mice and one group of SCID mice were treated daily with albendazole within a period of 14 days starting 28. day post infection (DPI). The second group of SCID and BALB/c mice served for monitoring the course of infection in untreated hosts. The third group of BALB/c and SCID mice were used for precise recording of dissemination of infection in the first seven days after inoculation. The fourth group of SCID mice was p.o. treated with albendazole within 14.–28. DPI. Moreover, mice of both noninfected SCID and BALB/c were used as negative controls (Table 1). The fecal samples were obtained daily from each mouse separately and stored at –20 °C for further molecular analyses and microscopical screening. The animals' health, mortality and morbidity were recorded twice a day. Since the mean survival time (MST) of individual experimental groups of animals was determined, the animals were allowed to die without euthanasia to minimize the result distortion due to variability of survival time of mice in the last phase of the infection.

Three mice from each group were euthanized by cervical dislocation every seventh day post infection (or every day in case of the third group of BALB/c and SCID mice) and sterile samples were obtained as follows: urine by bladder catheterization, blood from retro-orbital sinus, peritoneal lavage with cold sterile PBS, and organ samples (stomach, duodenum, ileum, jejunum, caecum, colon, liver, spleen, kidney, bladder, lung, heart and brain). Each organ was removed using a different pair of sterile dissection tools.

2.6. DNA isolation

Fecal and organ samples were homogenized by bead disruption using a FastPrep®–24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) and 0.5 mm glass beads (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) at the speed of 5.5 m/s for 1 min. Total DNA was extracted using commercial column based isolation kits QIAamp® DNA Stool Mini Kit and DNeasy Blood & Tissue Kit, respectively (both QIAGEN, Hilden, Germany). Acquired DNA was stored at –20 °C.

Table 1
Design of experiments.

Groups	n1	n2	Day post infection																	Figure			
			0	1	2	3	4	5	6	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70		77	84	91
(number of sacrificed mice per appropriate day post infection)																							
Control ^a	SCID	60	60	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NS	
	BALB/c	60	60	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NS	
Experimental ^b	SCID	Infection (daily period screening)	21	75	0	3	3	3	3	3	3											1A	
		Infection (weekly period screening)	39	0						3	3	3	3	×	×	×	×	×	×	×	×	×	1A
		Infection + treatment (28.–42. DPI)	30											3	3	3	3	×	×	×	×	×	NS
		Infection + treatment (14.–28. DPI)	36											3	3	3	3	3	3	3	×	×	1B
	BALB/c	Infection (daily period screening)	21	90	0	3	3	3	3	3	3												1C
		Infection (weekly period screening)	39	0						3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1C
		Infection + treatment (28.–42. DPI)	30																				1D

^a Inoculation with 200 ml sterilized deionised water.

^b Infection with 10^7 *E. cuniculi* spores in 0.2 ml of sterilized deionised water; **n1** – number of infected animals; **n2** – number of dissected animals **NS** – not shown; × – not observed due to animals' death; **DPI** – day post infection; **light-gray field** – albendazole treatment.

2.7. PCR amplification

Nested PCR protocols were used for amplification of partial sequence of SSU rRNA using microsporidia-specific primers described by De Bosscuere et al. (2007) and Katzwinkel-Wladarsch et al. (1996). The upstream primers M2F (CGG AGA GGA AGC CTT AGA GA) and MFNest (GAG AGA TGG CTA CTA CGT CCA AGG) were targeted to the 3' region of the SSU coding segment of *E. cuniculi*. The downstream primers M2R (ATA GTG ACG GGC GTG T) and MSP1R (ACA GGG ACM CAT TCA) were targeted to the 5' region of the coding segment of *E. cuniculi*. DNA obtained from spores of *E. cuniculi* strain III grown *in vitro* in VERO E6, as mentioned above, was used as a positive control. Ultrapure water was used as a negative control. For both PCR steps a total of 35 cycles, each consisting of 94 °C for 45 s, 58 °C for 45 s, and 72 °C for 60 s, were performed. Initial incubation at 94 °C for 3 min, final extension at 72 °C for 7 min, and final soak at 4 °C were included. PCR products were visualized on a 1% agarose gel containing 0.2 µg/ml ethidium bromide. A total 1–3 randomly selected positive samples from each animal were sequenced to verify the identity with the inoculum. If one of the samples originating from triplicate mice was found positive, the organ was considered positive.

2.8. Microscopical examination

Standard Calcofluor M2R staining (Vávra and Chalupský, 1982) was used for the detection of microsporidian spores in selected fecal smears. Stained slides were examined by fluorescence microscopy using UV light with a wavelength of 490 nm and at a magnification of 1000 ×.

2.9. Statistical analysis

The statistically significant differences in survival time of albendazole-treated and non-treated SCID mice, and the differences between the numbers of affected organs in individual groups of mice were analyzed by non-parametric Mann-Whitney *U* test using Statistica 6.0 software (StatSoft CR, Praha, Czech Republic).

3. Results

The experimental p.o. inoculation of *E. cuniculi* strain III caused a severe, fatal disease in SCID mice, which was characterized by the aggressive dissemination of microsporidia into all organs and tissues within the first week post infection. During this short period,

the microsporidian spores, which were initially localized only in cells of the intestine, spread into the abdominal and thoracic organs and brain, respectively. Following weeks, temporary disappearance of the parasite from the blood was observed, but DNA of EC III was revealed again in blood in the last week of examination (35 DPI). Coprological examination of mice revealed microsporidia almost every day from 3. DPI (Fig. 1A, Fig. 2). The mean survival time (MST) of infected SCID mice was 39 ± 0.5 days.

The treatment of infected SCID mice with albendazole from 14. to 28. DPI led to survival prolongation and significant disappearance of microsporidia from several organs two weeks after treatment introduction ($p < 0.05$). However, the parasite re-disseminated after termination of treatment and SCID mice died 6 weeks later (MST = 76 ± 1.4 days). While parasite was detected in fecal samples every day from the 4. DPI, intermittent shedding of spores in feces was recorded between 17.–36. DPI. The spores were detected again every day (except 45. DPI) in feces up to the death of mice (Fig. 1B).

The course of microsporidiosis in BALB/c mice was characterized by the progressive dissemination of spores into almost all organs within 7 DPI. As shown in Fig. 1C, the number of infected organs by *E. cuniculi* III increased rapidly during first week and all organs and tissues except jejunum and ileum were positive for this parasite 7. DPI. After this acute stage, microsporidia disappeared from multiple organs except the spleen, liver, kidney, lungs, heart and brain. Spleen and brain were continuously positive up to the end of experiment. The other examined specimens including peritoneal lavage were positive at irregular intervals. Microsporidian DNA was detected in fecal samples from 5. DPI up to the 91. DPI, but the shedding was intermittent and less frequent than in case of immunodeficient SCID mice.

The effect of albendazole treatment in BALB/c mice, which was per orally administrated from 28. DPI to 42. DPI, had been already noticeable after the first week of application ($p < 0.05$). The disappearance of the parasite from almost all organs is shown in Fig. 1D. But the termination of application of albendazole caused significant re-expansion of parasite into many host's organs after few weeks ($p < 0.05$). Fecal samples examined during and after treatment were negative for the presence of parasite except 41., 76. and 84. days post infection.

In the contrary, the application of the drug to infected SCID mice from 28. DPI had a negligible effect; there was a temporary disappearance of the parasite from the stomach and blood and the prolongation of life of mice for about 17 days (S1 Table).

All mice infected with EC III appeared only slight sings of illness

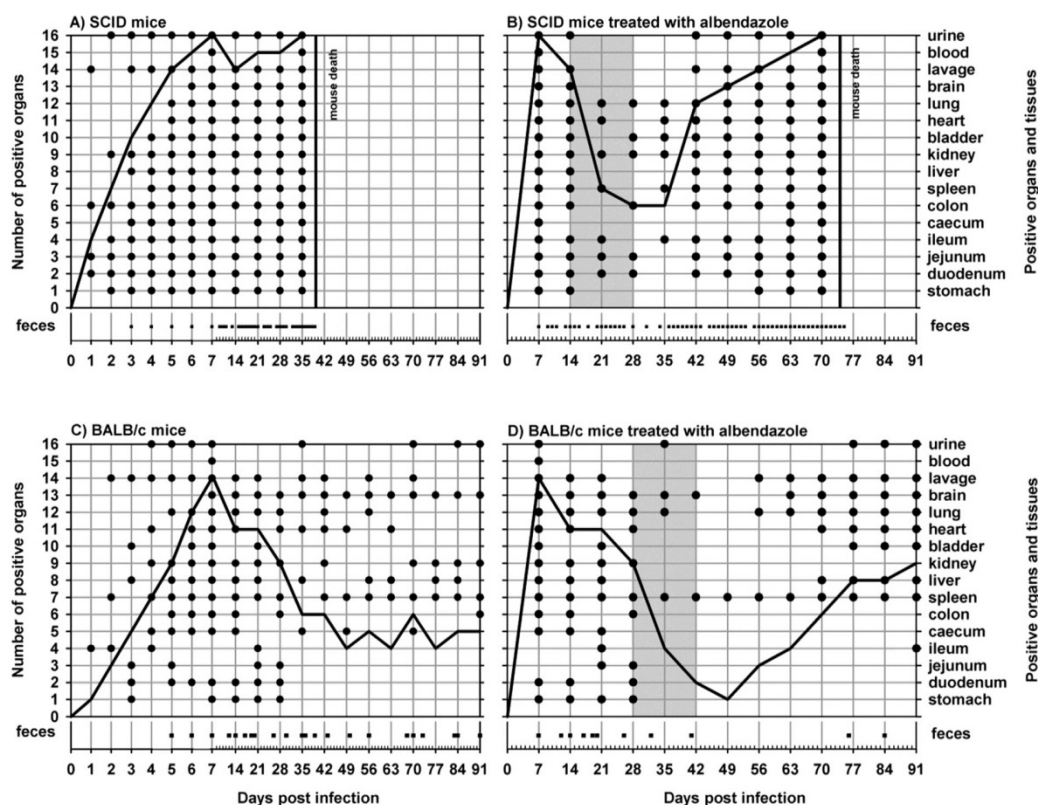


Fig. 1. Course of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III infection, including pattern of spore shedding and dissemination of infection to selected organs and tissues. A) SCID mice, B) SCID mice treated with albendazole, C) BALB/c mice, D) BALB/c mice treated with albendazole. Gray field – albendazole treatment; black line – course of *E. cuniculi* infection; dot – *E. cuniculi* positive organ; black square – spores shedding.

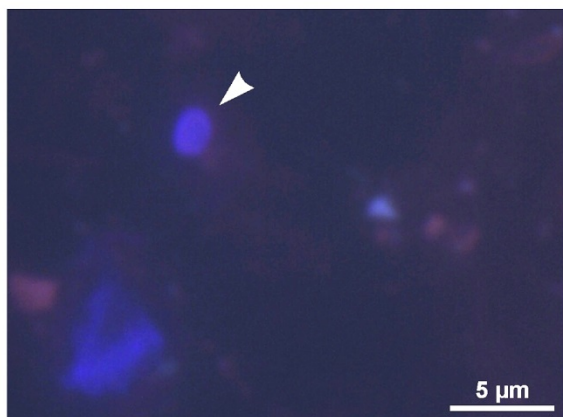


Fig. 2. *Encephalitozoon cuniculi* genotype III spore (arrowhead) in feces of infected SCID mouse stained with Calcofluor White M2R.

just presented with softened feces. No macroscopical changes were observed at necropsy. During our experiments, a total of 51 SCID mice succumb to the infection (S1 Table).

4. Discussion

Encephalitozoon cuniculi is probably the most common microsporidia which infects a wide range of vertebrates, including human. So far, four genotypes of this parasite have been identified based on variable repeats in the rRNA internal transcribed spacer (ITS).

While *E. cuniculi* strain II is considered to be a parasite occurring in many host species in latent asymptomatic form (Kašičková et al., 2009; Neumayerová et al., 2014), *E. cuniculi* III seems to be more aggressive and infections caused by this strain can lead to the death of immunocompetent host (Hofmannová et al., 2014; Juan-Sallés et al., 2006; Meng et al., 2014). However, as the results of present study showed, the course of infection caused by *E. cuniculi* III had a massive onset in immunocompetent host, which was characterized by the presence of this parasite in all organs and tissues within one week after peroral infection, but the hosts survived. Although there has been a disappearance of microsporidia from many organs during the next several weeks, the number of positive organs in chronic stage of infection was much higher than in case of chronic infection caused by EC II (Kotková et al., 2013). Despite this fact, the mice infected with EC III appeared only slight signs of illness just presented with softened feces.

On the other hand, although encephalitozoonosis caused by both EC II and EC III led to the death of immunocompromised SCID mice, significant differences between these two strains were

observed. While infection caused by EC II was characterized by a gradual increase of number of positive organs within four weeks post infection and SCID mice succumb the infection when microsporidia invaded all organs and tissues, i.e. 33. DPI (Kotková et al., 2013), the infection caused by EC III had more progressive spreading into all organs within first week post inoculation and this state lasted till the death of the host which was, however, as late as 39. DPI. Surprisingly, despite the enormously rapid rate of the expansion of the EC III and involvement of a higher number of struck organs at an early stage of infection, the median survival time was significantly longer than in case of EC II infection ($p < 0.05$). Moreover, these mice showed clinical signs including weakness and lethargy from 33. DPI and 29. DPI, respectively.

The first case of infection caused by *E. cuniculi* genotype III in rodents was determined in Steppe lemmings (*Lagurus lagurus*) (Hofmannová et al., 2014). Although they were adult immunocompetent animals, they suffered from severe symptoms, such as progressive weight loss, purulent conjunctivitis and hind limb paresis and finally infection resulted in death. These symptoms are similar to course of *E. cuniculi* genotype III infections observed in other hosts. Natural infections in dogs varied from asymptomatic to serious canine microsporidiosis with renal and neurological disorders (Botha et al., 1979, 1986; Snowden et al., 2009). Disseminated spontaneous infections resulting in high morbidity and mortality in stillborn and young squirrel monkeys have been also reported (Asakura et al., 2006; Juan-Sallés et al., 2006; Reetz et al., 2004). On the contrary, asymptomatic infections with *E. cuniculi* strain III were found in swine and birds (Kasičková et al., 2009; Reetz et al., 2009). Nevertheless, information about distribution and genotype diversity of microsporidia in wild rodents is still rare and in case of infection was detected *Encephalitozoon cuniculi* strain I or II (Müller-Doblies et al., 2002; Sak et al., 2011a,b; Xiao et al., 2001). Several species of microsporidia including *Encephalitozoon cuniculi* can cause disease in humans, which are mostly affected with strain I and II (Didier and Weiss, 2011; Ditrich et al., 2011; Sak et al., 2011a). Most cases have been described to occur in HIV-infected patients (Tosoni et al., 2002; Torres et al., 2013; Zender et al., 1989), and microsporidia is being considered an emerging pathogen in transplant recipients (Hocevar et al., 2014; Kicia et al., 2014; Ladapo et al., 2014; Talabani et al., 2010). A recent case of acquired microsporidiosis through solid organ transplantation shows the severity of infection caused by EC III. Two of the three recipients died of microsporidiosis, one of them in spite of treatment with albendazole (Hocevar et al., 2014).

Therapy for microsporidiosis is species-dependent. Albendazole is suitable for treatment of *Encephalitozoon* species, including *Encephalitozoon cuniculi*. It inhibits microtubule assembly in parasite which leads to disruption of metabolism and subsequently to the death of the parasite. However, this agent is not effective against *Enterocytozoon bieneusi*. Another possible treatment of microsporidiosis is the use of fumagillin. It is an antibiotic and antiangiogenic compound produced by *Aspergillus fumigatus* and its mechanism involves the inhibition of methioninaminopeptidases, proteases that remove N-terminal methionine from newly synthesized proteins. Fumagillin is more broadly effective against *Encephalitozoon* spp. and *E. bieneusi*, however, is toxic when administered systemically to mammals.

The appropriate duration of therapy required to eradicate infection with *E. cuniculi* not only in immunodeficient host is unknown. The relapse of infection can be as long as 1 year after termination of albendazole therapy and positive urine samples after more than 5 months of therapy have been described (Hocevar et al., 2014). Moreover, albendazole cannot be used in a long term because of its adverse effects including gastrointestinal upset or variable degrees of bone marrow suppression.

Recently published study showed that the treatment by albendazole caused the disappearance of *Encephalitozoon cuniculi* II from all organs and tissues in immunocompetent murine host. But this healing was only ostensibly because the microsporidia re-appeared after immunosuppression of the host (Kotková et al., 2013). Using albendazole for the treatment of microsporidiosis caused by EC III didn't lead to elimination of parasite from all organs and moreover, the amount of positive organs grew up again immediately after interruption of treatment.

Many studies have described latent disease among otherwise-healthy non-treated individuals with intermittent spore shedding from fecal and urine samples. Detection of microsporidial DNA in feces and urine propose that this parasite is able to disseminate despite the protective effect of an immune system (Sak et al., 2011b). Latent and asymptomatic infection depends on the activity of parasite and the host immune system are in balance. However, microsporidia were, and still are often overlooked and under-diagnosed, because they are not specifically searched for in most diagnostic laboratories, they are rather small, and their staining with routine techniques is not sufficient. Many specific detection methods including light microscopy, electron microscopy and PCR based methods have been established with the latter considered as the most specific, sensitive and feasible (Garcia, 2002; Green et al., 2000; Vávra and Chalupský, 1982; Weber et al., 1992). The qPCR method seems to be the most valuable for microsporidia burden quantification (Menotti et al., 2003; Polley et al., 2011; Procop, 2007; Verweij et al., 2007; Wolk et al., 2002; Xu et al., 2006).

As our results showed, the administration of medication to immunodeficient hosts at the time when the microsporidiosis is already fully developed had no effect and the mice died during the treatment (data not shown). In the case where albendazole was administered from the second week after inoculation caused the partial elimination of microsporidial spores from host's organs and tissues, but the number of positive organs two weeks after interruption of the therapy increased with the same power as in the onset of infection, and the host died within a couple of weeks. These results are comparable with those obtained in study of the course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* strain II (Kotková et al., 2013). The main difference is the longer survival of the host with EC III infection despite a faster spreading of parasite after termination of treatment.

Our results demonstrated that although the infection caused by *E. cuniculi* III had much more progressive course than infection caused by *E. cuniculi* II, these mice survived significantly longer, implying that the survival of mice does not correspond to spore burden but more likely depends on strain of microsporidia employed. On the basis of our results, we presuppose the activation of different parts of immune system during infection with various genotypes. This could be due to parasite adaptation, which could transform host immune response towards a less effective pathway, and subsequently could prolong host survival. Natural killer (NK) cells seems to be the most important in the case of microsporidiosis in immunodeficient host, but this is a question for further research. Determining which part of immune system is responsible for suppressing microsporidial infection and what is *Encephalitozoon cuniculi*'s effect on the immune response is essential for clarification of different virulence of *E. cuniculi* genotypes. Answers to these questions could significantly contribute in research related to human health.

Acknowledgement

The study was supported by the grants of Grant Agency of the Czech Republic (No. P302-14-20684S and 17-12871S).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.022>.

References

- Asakura, T., Nakamura, S., Ohta, M., Une, Y., Furuya, K., 2006. Genetically unique microsporidian *Encephalitozoon cuculii* strain type III isolated from squirrel monkeys. *Parasitol. Int.* 55, 159–162.
- Botha, W.S., Dormehl, I.C., Goosen, D.J., 1986. Evaluation of kidney function in dogs suffering from canine encephalitozoonosis by standard clinical pathological and radiopharmaceutical techniques. *J. S Afr. Vet. Assoc.* 57, 79–86.
- Botha, W.S., Van Dellen, A.F., Stewart, C.G., 1979. Canine encephalitozoonosis in South Africa. *J. S Afr. Vet. Assoc.* 50, 135–144.
- Canning, E.U., Lom, J., Dykova, I., 1986. The Microsporidia of Vertebrates. Academic Press, London, 289 pp.
- Cutlip, R.C., Beall, C.W., 1989. Encephalitozoonosis in arctic lemmings. *Lab. Anim. Sci.* 39, 331–333.
- 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., Varner, P.W., Didier, P.J., Aldras, A.M., Millichamp, N.J., Murphey-Corb, M., Bohm, R., Shaddock, J.A., 1994. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol.* 41, 1–11.
- 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 cuculii* strains. *Parasitology* 111, 411–421.
- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2011. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 490–495.
- Ditrich, O., Chrdle, A., Sak, B., Chmelík, V., Kubále, J., Dyková, I., Kváč, M., 2011. *Encephalitozoon cuculii* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* 7, 2769–2771.
- Gannon, J., 1980. A survey of *Encephalitozoon cuculii* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. *Lab. Anim* 14, 91–94.
- Garcia, L.S., 2002. Laboratory identification of microsporidian. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1892–1901.
- Green, L.C., LeBlanc, P.J., Didier, E.S., 2000. Discrimination between viable and dead *Encephalitozoon cuculii* (microsporidian) spores by dual staining with sytox green and calcofluor white M2R. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3811–3814.
- Guscetti, F., Mathis, A., Hatt, J.M., Deplazes, P., 2003. Overt fatal and chronic sub-clinical *Encephalitozoon cuculii* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*Saguinus imperator*). *J. Med. Primatol.* 32, 111–119.
- Hocevar, S.N., Paddock, C.D., Spak, C.W., Rosenblatt, R., Diaz-Luna, H., Castillo, I., Luna, S., Friedman, G.C., Antony, S., Stoddard, R.A., Tiller, R.V., Peterson, T., Blau, D.M., Sriram, R.R., da Silva, A., de Almeida, M., Benedict, T., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Visvesvara, G.S., Kuehnert, M.J., Microsporidia Transplant Transmission Investigation Team, 2014. Microsporidiosis acquired through solid organ transplantation: a public health investigation. *Ann. Intern. Med.* 160, 213–220.
- Hofmannová, L., Sak, B., Jekl, V., Mináriková, A., Skorič, M., Kváč, M., 2014. Lethal *Encephalitozoon cuculii* genotype III infection in Steppe lemmings (*Lagurus lagurus*). *Vet. Parasitol.* 205, 357–360.
- Juan-Sallés, C., Garner, M.M., Didier, E.S., Serrato, S., Acevedo, L.D., Ramos-Vara, J.A., Nordhausen, R.W., Bowers, L.C., Parás, A., 2006. Disseminated encephalitozoonosis in captive, juvenile, cotton-top (*Saguinus oedipus*) and neonatal emperor (*Saguinus imperator*) tamarins in North America. *Vet. Pathol.* 43, 438–446.
- Kašicková, D., Sak, B., Kváč, M., Ditrich, O., 2009. 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 microsporidian infections. *Vet. Parasitol.* 165, 125–130.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Löscher, T., Rinder, H., 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1, 373–378.
- Kicia, M., Wesolowska, M., Jakuszko, K., Kopczyk, Z., Sak, B., Květonová, D., Krajewska, M., Kváč, M., 2014. Concurrent infection of the urinary tract with *Encephalitozoon cuculii* and *Enterocytozoon bieneusi* in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1780–1782.
- Kotková, M., Sak, B., Květonová, D., Kváč, M., 2013. Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuculii* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS One* 8, e60941.
- Ladapo, T.A., Nourse, P., Pillay, K., Frean, J., Birkhead, M., Poonsamy, B., Gajjar, P., 2014. Microsporidiosis in pediatric renal transplant patients in Cape Town, South Africa: two case reports. *Pediatr. Transpl.* 18, E220–E226.
- Levaditi, C., Nicolau, S., Schoen, R., 1932. Etiology of epizootic rabbit encephalitis in reports with experimental studies of encephalitis lethargica. *Encephalitozoon cuculii* (nov spec). *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 38, 675–711.
- Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P., 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 423–445.
- Meng, X., Zheng, J., He, X., Jia, H., Zhang, Y., 2014. First characterization in China of *Encephalitozoon cuculii* in the blue fox (*Alopex lagopus*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 61, 580–585.
- Menotti, J., Cassinat, B., Porcher, R., Sarfati, C., Derouin, F., Molina, J.M., 2003. 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.
- Müller-Dobies, U.U., Herzog, K., Tanner, I., Mathis, A., Deplazes, P., 2002. First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuculii* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Vet. Parasitol.* 107, 279–285.
- Neumayerová, H., Juránková, J., Jeklová, E., Kudláčková, H., Faldyna, M., Kovářčík, K., Jánová, E., Koudela, B., 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuculii* in rabbits from different farming systems. *Vet. Parasitol.* 204, 184–190.
- Polley, S.D., Boadi, S., Watson, J., Curry, A., Chiodini, P.L., 2011. Detection and species identification of microsporidian infections using SYBR Green real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* 60, 459–466.
- Procop, G.W., 2007. Molecular diagnostic for the detection and characterization of of microbial pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 45, 99–111.
- Reetz, J., Nöckler, K., Reckinger, S., Vargas, M.M., Weiske, W., Broglia, A., 2009. Identification of *Encephalitozoon cuculii* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitol. Int.* 58, 285–292.
- Reetz, J., Wiedemann, M., Aue, A., Wittstatt, U., Ochs, A., Thomschke, A., Manke, H., Schwes, M., Rinder, H., 2004. Disseminated lethal *Encephalitozoon cuculii* (genotype III) infections in cotton-top tamarins (*Oedipomidas oedipus*)-a case report. *Parasitol. Int.* 53, 29–34.
- Sak, B., Kváč, M., Květonová, D., Albrecht, T., Piálek, J., 2011a. 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.
- Sak, B., Kváč, M., Kucerová, Z., Květonová, D., Saková, K., 2011b. Latent microsporidian infection in immunocompetent individuals – a longitudinal study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1162.
- Scurrell, E.J., Holding, E., Hopper, J., Denk, D., Fuchs-Baumgartinger, A., Silbermayr, K., Nell, B., 2015. Bilateral lenticular *Encephalitozoon cuculii* infection in a snow leopard (*Panthera uncia*). *Vet. Ophthalmol.* 1, 143–147.
- Snowden, K.F., Lewis, B.C., Hoffman, J., Mansell, J., 2009. *Encephalitozoon cuculii* infections in dogs: a case series. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 45, 225–231.
- Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., Menotti, J., 2010. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuculii* in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2651–2653.
- Torres, G., Izquierdo, F., Capó, V., López, L.X., López, M.C., Limonta, D., Fenoy, S., Del Águila, C., Borna-Llinares, F.J., 2013. Genital microsporidiosis in women with AIDS: a post-mortem study. *Rev. Iberoam. Micol.* 30, 47–50.
- Tosoni, A., Nebuloni, M., Ferri, A., Bonetto, S., Antinori, S., Scaglia, M., Xiao, L., Moura, H., Visvesvara, G.S., Vago, L., Costanzi, G., 2002. Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuculii* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. *Mod. Pathol.* 15, 577–583.
- Valencakova, A., Balent, P., Ravaszova, P., Horak, A., Obornik, M., Halanova, M., Malcekova, B., Novotny, F., Goldova, M., 2011. Molecular identification and genotyping of Microsporidia in selected hosts. *Parasitol. Res.* 110, 689–693.
- van Dellen, A.F., Stewart, C.G., Botha, W.S., 1989. Studies of encephalitozoonosis in vervet monkeys (*Cercopithecus pygerythrus*) orally inoculated with spores of *Encephalitozoon cuculii* isolated from dogs (*Canis familiaris*). *Onderstepoort J. Vet. Res.* 56, 1–22.
- Vávra, J., Chalupský, J., 1982. Fluorescence staining of microsporidian spores with the brightener “Calcofluor White M2R”. *J. Protozool.* 29, 503.
- Verweij, J.J., Ten Hove, R., Brienen, E.A., van Lieshout, L., 2007. Multiplex detection of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 163–167.
- Weber, R., Bryan, R.T., Owen, R.L., Wilcox, C.M., Gorelkin, L., Visvesvara, G.S., 1992. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.* 326, 161–166.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3922–3928.
- Wright, J.H., Craighead, E.M., 1922. Infectious motor paralysis in young rabbits. *J. Exp. Med.* 36, 135–140.
- Xiao, L., Li, L., Visvesvara, G.S., Moura, H., Didier, E.S., Lal, A.A., 2001. Genotyping *Encephalitozoon cuculii* by multicolor analyses of genes with repetitive sequences. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2248–2253.
- Xu, Y., Takvorian, P., Cali, A., Wang, F., Zhang, H., Orr, G., Weiss, L.M., 2006. Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuculii*. *Infect. Immun.* 74, 239–247.
- Zender, H.O., Arrighoni, E., Eckert, J., Kapanci, Y., 1989. A case of *Encephalitozoon cuculii* peritonitis in a patient with AIDS. *Am. J. Clin. Pathol.* 92, 352–356.

5.5. Dodatek: Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole.

Kotková, M., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M., 2013.

PLoS One 8: e60941.

Latent Microsporidiosis Caused by *Encephalitozoon cuniculi* in Immunocompetent Hosts: A Murine Model Demonstrating the Ineffectiveness of the Immune System and Treatment with Albendazole

Michaela Kotkova¹, Bohumil Sak^{1*}, Dana Kvetonova¹, Martin Kvac^{1,2}

¹ Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., České Budejovice, Czech Republic, ² Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Ceske Budejovice, Czech Republic

Abstract

Background: Microsporidia are obligate intracellular parasites causing severe infections with lethal outcome in immunocompromised hosts. However, these pathogens are more frequently reported as latent infections in immunocompetent individuals and raises questions about the potential risk of reactivation following induced immunosuppression.

Aims: To evaluate the possibility latent microsporidiosis, efficacy of albendazole, and reactivation, the authors monitored the course of *E. cuniculi* infection in immunocompetent BALB/c mice and immunodeficient SCID mice using molecular methods.

Methods: Mice were per orally infected with 10^7 spores of *E. cuniculi*. Selected groups were treated with albendazole, re-infected or chemically immunosuppressed by dexamethasone. The presence of microsporidia in the host's organs and feces were determined using PCR methods. Changes in numbers of lymphocytes in blood and in spleen after induction of immunosuppression were confirmed using flow cytometry analysis.

Results: Whereas *E. cuniculi* caused lethal microsporidiosis in SCID mice, the infection in BALB/c mice remained asymptomatic despite parasite dissemination into many organs during the acute infection phase. Albendazole treatment led to microsporidia elimination from organs in BALB/c mice. In SCID mice, however, only a temporary reduction in number of affected organs was observed and infection re-established post-treatment. Dexamethasone treatment resulted in a chronic microsporidia infection disseminating into most organs in BALB/c mice. Although the presence of *E. cuniculi* in organs of albendazole-treated mice was undetectable by PCR, it was striking that infection was reactivated by immunosuppression treatment.

Conclusion: Our results demonstrated that microsporidia can successfully survive in organs of immunocompetent hosts and are able to reactivate from undetectable levels and spread within these hosts after induction of immunosuppression. These findings stress the danger of latent microsporidiosis as a life-threatening risk factor especially for individuals undergoing chemotherapy and in transplant recipients of organs originating from infected donors.

Citation: Kotkova M, Sak B, Kvetonova D, Kvac 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(4): e60941. doi:10.1371/journal.pone.0060941

Editor: Elizabeth Didier, Tulane University School of Public Health and Tropical Medicine, United States of America

Received: December 18, 2012; **Accepted:** March 5, 2013; **Published:** April 11, 2013

Copyright: © 2013 Kotkova et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by projects from Grant Agency of Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice (SGA2010/005), Grant Agency of University of South Bohemia (022/2010/Z), the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LH11061), and Grant Agency of the Czech Republic (P505/11/1163). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: casio@paru.cas.cz

Introduction

Microsporidia are obligate intracellular parasites that infect a wide range of vertebrate and invertebrate hosts, including humans [1]. Microscopic resistant microsporidian spores are released into the environment by infected hosts and are ubiquitous, being found in surface waters, sediments, soil, and foods [2–5]. The natural route of entry of the parasite into the host

is by ingestion or inhalation of infectious spores, or via wounds and transplacentally [6,7].

Although microsporidia have been known as pathogenic agents in a wide range of wild, laboratory, and domestic animals for several decades, the first case of human microsporidiosis induced by an *Encephalitozoon* spp. was recorded in 1959 [8]. Since then another 13 human-pathogenic species have been described. Among them, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis*, and *E. hellem*, are the most common human pathogenic

microsporidia most frequently reported among immunocompromised individuals including those with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and transplant recipients [9].

Most of what is known about microsporidia is based on *E. cuculii*, which commonly infects rodents in addition to humans [10]. This species was first observed in brain, spinal cord, and kidney of a rabbit with motor paralysis in 1922 [11], and subsequently described by Levaditi in 1923 [12]. *Encephalitozoon cuculii* was also the first mammalian microsporidium that was isolated and cultured *in vitro* [13] and was reported to infect a wide range of host cells including epithelial cells, vascular endothelial cells and renal tubule cells. Spores can survive in macrophages and spread throughout the host [14] where they cause various lesions affecting the nervous system, respiratory and digestive tract, liver, peritoneum, lung, bladder, and kidney [15–17]. Chemotherapy of microsporidiosis is limited to only a few drugs. Albendazole inhibits microtubule assembly and is effective against several microsporidia including the *Encephalitozoon* species. Fumagilin, which is produced by *Aspergillus fumigatus*, is more broadly effective against *Encephalitozoon* spp. and *E. bienersi* [18]. Similarly, protease inhibitor (antiretroviral) therapy indirectly leads to resolution of microsporidiosis in HIV patients through restoration of immune competence [19].

Immunobiology of microsporidial infections is primarily studied in immunocompetent BALB/c mice and immunodeficient SCID mice [20–22]. In immunocompetent BALB/c mice, the *E. cuculii* infection remains asymptomatic as long as parasite multiplication and the host immune response are balanced [20]. On the contrary, in athymic or SCID mice, microsporidia infect various internal organs with probable lethal outcome [21,22]. In immunocompetent humans, a short acute diarrheal phase is probably followed by asymptomatic infection. However, chronic malabsorptive diarrhea and systemic disease can develop in immunocompromised individuals [23].

Chronic microsporidia infections caused by *E. cuculii* in immunocompetent individuals are generally asymptomatic, probably reflecting a balanced parasite-host relationship. It appears that elimination of microsporidia requires chemotherapeutic intervention. The efficacy of albendazole in eliminating microsporidia from immunocompetent hosts has not been addressed using *in vivo* experimental infections. All previous studies were focused only on extending the survival time of hosts [24–26]. This approach ignored the possible survival of microsporidia in albendazole-treated individuals and the development of latent infection. Latent microsporidiosis in immunocompetent hosts could lead to infection relapse following immunosuppression. Thus, the present study was designed to determine the effectiveness of treatment against the infection caused by *E. cuculii* and the potential re-activation and re-dissemination of infection after artificial immunosuppression. Our findings bring a new perspective to neglected, latent microsporidiosis and enhance our understanding of the epidemiology and natural history of microsporidiosis.

Materials and Methods

Ethics Statement

All of the experimental procedures were conducted in accordance with the law of the Czech Republic on the use of experimental animals, safety and use of pathogenic agents. The study was approved by the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic and Institutional and National Committees (protocols no. 070/2010).

Experimental Animals

Adult SCID mice (strain C.B-17) of the BALB/c background and BALB/c mice were originally obtained from Charles River, Sulzfeld, Germany and bred in plastic cages with sterilized wood-chip bedding situated in IVC Air Handling Solutions (Techniplast, Italy) with high-efficiency particulate air (HEPA) filters. The experimental 8-week-old animals were housed in plastic cages with sterilized wood-chip bedding situated in flexible film isolators (BEM Znojmo, Czech Republic) with HEPA filters. All mice were supplied with a sterilized diet (TOP-VELAZ Praha, Czech Republic) and sterilized water *ad libitum*.

Parasite

The spores of *E. cuculii* strain EC2 were originally isolated from a dexamethasone-treated laboratory mouse [26] and were grown *in vitro* in Green monkey kidney cells (VERO, line E6) maintained in RPMI-1640 medium (SIGMA) supplemented with 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum. Spores were isolated and purified from cells by centrifugation over 50% Percoll (SIGMA) at 1,100×g for 30 min and washed three times in sterilized deionised water before storing in sterilized deionised water supplemented with antibiotics (SIGMA, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2.5 µg/ml amphotericin B) at 4°C. The spores were washed in sterilized deionised water before use.

Drugs Application

Aldifal (MEVAK NITRA, SR) containing 100 g of albendazole in 1000 ml, was dosed for treatment of microsporidiosis as follows: a total 0.2 mg of albendazole dissolved in 200 µl deionised sterilized water was applied daily per orally (p.o.) by intragastric gavage per animal. Dexamethasone (0.85 mg/ml) (Intervet) was used for immunosuppression. Dexamethasone (35 µg dissolved in 160 µl PBS) was applied daily i.p. (intraperitoneally) per animal.

Experimental Protocols

Experiment no. 1. Course of infection caused by *E. cuculii* in BALB/c and SCID mice. Groups of 69 BALB/c and 69 SCID mice were infected p.o. with 10^7 *E. cuculii* spores in 0.2 ml of sterilized deionised water by intragastric gavage. Thirty BALB/c mice and 30 SCID mice were treated daily p.o. with albendazole from 28 to 42 days post infection. Moreover, 42 mice of both non-infected SCID and BALB/c were used as negative controls.

Experiment no. 2. Simulation of re-infection and determination of the albendazole efficacy after dexamethasone-induced immunosuppression;

Groups of 141 BALB/c and 75 SCID mice were infected p.o. with 10^7 *E. cuculii* spores in 0.2 ml of deionised water by intragastric gavage. Thirty-six SCID mice were treated daily p.o. with albendazole from 14 to 28 days post infection (DPI). Thirty BALB/c mice were treated with daily with albendazole 28–42 DPI. Eighteen albendazole-treated BALB/c mice and 18 BALB/c mice in the chronic stage of infection (without albendazole treatment) were re-infected p.o. with the same dose of spores of *E. cuculii* 56 days after the first infection. Eighteen albendazole-treated BALB/c mice and 18 BALB/c mice in chronic stage of infection were immunosuppressed by daily dexamethasone treatment from 56 to 91 DPI. Thirty-nine BALB/c mice in the chronic stage of infection were used as positive controls for monitoring the course of infection. Forty-two non-infected SCID and 42 BALB/c mice served as negative controls in each type of experiment. The study design of all experiments is presented in the Fig. 1.

	Groups	n1	n2	Day post infection														Figure				
				(number of sacrificed mice per appropriate day post infection)																		
Control ^b	BALB/c	42	42	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NS		
	SCID	42	42	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NS		
Experimental ^b	INF	39														3	3	3	3	3	3	1c
	INF + REINF (56 DPI)	18					3	3	3	3						3	3	3	3	3	3	1c
	BALB/c	18	141	0	3	3	3									3	3	3	3	3	3	1e
	INF + IMSUP (56-91 DPI)	18																				
	INF + TREAT (28-42 DPI)	30																				
	INF + TREAT (28-42 DPI) + REINF (56 DPI)	18						3	3	3	3											
	INF + TREAT (28-42 DPI) + IMSUP (56-91 DPI)	18																				
SCID	INF	39						3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1a
	INF + TREAT (28-42 DPI)	30	33	0	3			3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	NS
	INF + TREAT (14-28 DPI)	36						3	3	3	3	3	3	3	x	x	x	x	x	x	x	1b

Figure 1. Design of experiments. ^ainoculation with 200 ul sterilized deionised water; ^binfection with 10⁷ *E. cuniculi* spores in 0.2 ml of sterilized deionised water; INF – infection; REINF – reinfection (black column); IMSUP – dexamethasone immunosuppression (highlighted in dark grey); TREAT – albendazole treatment (highlighted in light grey); n1 – number of used animals; n2 – number of dissected animals; NS – not shown; x – not observed due to mouse death; DPI – day post infection; doi:10.1371/journal.pone.0060941.g001

Assessment of Infections

Fecal samples were obtained daily from each mouse and stored at -20°C prior to DNA isolation. Mortality and morbidity were recorded daily. Three mice from each group were euthanized every seventh day post infection (see Fig. 1). Sterile samples were obtained as follows: urine by bladder catheterization, blood from retroorbital sinus, peritoneal lavage with cold sterile PBS, and organ samples (stomach, duodenum, ileum, jejunum, caecum, colon, liver, spleen, kidney, bladder, lung, heart, and brain). Each organ was removed using a different pair of sterile dissection tools and stored at -20°C prior to DNA isolation. In addition, half of the spleen and 75 µl of the blood from immunosuppressed BALB/c mice, BALB/c mice without infection, and BALB/c mice after albendazole treatment were used for lymphocytes enumeration by flow cytometry. All samples were used for molecular analysis (see below).

DNA Isolation

Fecal and organ samples were homogenized by bead disruption using a FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) and 0.5 mm glass beads (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) at the speed of 5.5 m/s for 1 min. Total DNA was extracted using commercial column-based isolation kits, QIAamp® DNA Stool Mini Kit and DNeasy Blood & Tissue Kit, respectively (both QIAGEN, Hilden, Germany). Acquired DNA was stored at -20°C.

PCR Amplification

We used a nested PCR protocol to amplify a partial sequence of SSU rRNA using microsporidia-specific primers previously described by De Bosscuere et al. [27] and Katzwinkel-Wladarsch et al. [28]. The upstream primers M2F (CGG AGA GGA AGC CTT AGA GA) and MFNest (GAG AGA TGG CTA CTA CGT CCA AGG) were targeted to the 3' region of the SSU coding segment of *E. cuniculi*. The downstream primers M2R (ATA GTG

ACG GGC GGT GTG T) and MSP1R (ACA GGG ACM CAT TCA) were targeted to the 5' region of the coding segment of *E. cuniculi*. For the primary PCR step, the PCR mixture contained 1 × PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP's, 1 U *Taq*, 1 µl BSA (10 mg/ml), and 200 nM each primer. For the secondary PCR step, the PCR mixture was identical except that BSA was excluded. DNA obtained from spores of *E. cuniculi* grown *in vitro* in VERO E6 was used as a positive control. Water was used instead of template as the negative control. For both PCR steps a total of 35 cycles, each consisting of 94°C for 45 s, 58°C for 45 s, and 72°C for 60 s, were performed. Initial incubation at 94°C for 3 min., final extension at 72°C for 7 min., and final soak at 4°C were included. PCR products were visualized on a 1% agarose gel containing 0.2 µg/ml ethidium bromide. One to three randomly selected positive samples from each animal were sequenced and compared to the sequence of the isolate in the inoculum. If one of the samples originating from triplicate mice was found positive, the organ was considered positive.

Flow Cytometry Analysis

Halves of each spleen and 75 µl of blood from immunosuppressed BALB/c mice after albendazole treatment and immunosuppressed BALB/c mice in chronic stage of infection were used for flow cytometry analysis. Halves of each spleen and 75 µl of blood of BALB/c mice after albendazole treatment, and BALB/c mice in chronic stages of infection were also used for flow cytometry analysis as controls.

Whole splenocyte suspensions were prepared by gentle extrusion through plastic sieves into cold RPMI 1640 medium. Cell suspensions were washed three times in RPMI 1640 medium by centrifugation at 160×g for 10 min at 4°C. The viability of spleen cells was assessed by Trypan blue exclusion immediately after their recovery [29].

A total of 75 µl of blood was collected into 1 ml PBS containing 5 µM EDTA and mixed immediately to prevent clotting. Red

blood cells were lysed using a buffered 0.84% ammonium chloride solution and incubated in a water bath at 37°C for 3 min. Cells were washed three times by centrifugation at 160×g for 10 min at 4°C with FACS buffer (PBS supplemented with 0.2% gelatine and 0.01% sodium azide). The pellet from the final wash was resuspended in 100 µl FACS buffer.

The levels of leukocytes in cell preparations from blood and spleens were analysed by flow cytometry. Samples (0.5×10^6 spleen cells and all obtained blood cells) were incubated for 30 min at 4°C with specific monoclonal antibodies (all obtained from PharMingen, San Diego, CA, USA) against surface antigens diluted in FACS buffer. The following monoclonal anti-mouse antibodies (MAbs) were used: anti-CD45 MAb, anti-CD3 MAb, anti-CD4 MAb, anti-CD8 MAb and anti-CD19 MAb. Labeled cell samples were analyzed on a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, USA) equipped with two lasers with excitation wavelengths of 488 and 633 nm. The labeled cell populations were analyzed using DIVA software.

Statistical Analysis

The statistically significant differences in survival time of albendazole-treated and non-treated SCID mice, and the differences between the decline in lymphocytes in groups of immunosuppressed mice were analyzed by non-parametric Mann-Whitney *U* test. Both tests were performed using Statistica 6.0 software (StatSoft CR, Praha, Czech Republic).

Results

The experimental p.o. inoculation of *E. cuculii* caused a severe, fatal disease in SCID mice, which was characterized by the dissemination of microsporidia into all organs and tissues within 4 weeks. Coprological examination of mice revealed microsporidia almost every day from day 4 post-infection (Fig. 2a). The mean survival time (MST) of infected SCID mice was 33 ± 0.5 days.

The treatment of infected SCID mice with albendazole from 14 to 28 DPI extended survival and resulted in the disappearance of microsporidia from numerous organs immediately after treatment introduction (Fig. 2b). While microsporidia were detected in fecal samples every day from 4 DPI, no spores were found in feces during the second week of treatment. After discontinuation of albendazole treatment, however, the parasite re-disseminated and mice died within 3 weeks (MST = 51.5 ± 1.3 days). In addition, one week after interruption of albendazole treatment spores were present again almost every day in feces.

In contrast, treatment of infected SCID mice in acute phase with albendazole from day 28 post-infection had no effect and did not prevent mortality. The mean survival time was 32.1 ± 1.0 days (data not shown).

Microsporidiosis caused by *E. cuculii* in BALB/c mice has a progressive course characterized by the dissemination of microsporidia into almost all organs within 35 days p.i. After this acute stage, microsporidia disappeared from most organs with the exception of the spleen, which was positive up to 91 DPI when the experiment was terminated (Fig. 2c). Fecal samples were positive 5 to 7 DPI and 20 DPI.

Albendazole treatment of BALB/c mice, which was carried out 28 to 42 DPI, had a noticeable effect after one week of treatment. The disappearance of the parasite from the organs is shown in Fig. 2d. All organs and tissues were negative for microsporidia two weeks after the termination of albendazole therapy. Fecal samples examined for the presence of microsporidia were positive only 5 to 7 DPI.

Re-infection of BALB/c mice in chronic stage of infection led to reappearance of the parasite in many organs including the brain, lungs, spleen, and liver. Of these, only the spleen remained positive till 91 DPI as shown in Fig. 2c. Microsporidial DNA was detected in fecal samples after re-infection at irregular intervals. In contrast to re-infected BALB/c mice, re-infection of albendazole-treated BALB/c mice did not lead to extensive dissemination of microsporidia (Fig. 2d). *E. cuculii* was detected only in peritoneal lavage one week after re-infection (63 DPI), and in the spleen 14 days after re-infection (70 DPI). No other organs or tissue were found positive for the parasite following re-infection. *E. cuculii* spores were presented in feces 3 to 5 days after re-infection.

After one week of daily dexamethasone applications to two groups of BALB/c mice, the levels of lymphocytes had decreased by as much as 96% in the blood and by 78% in spleen compared to negative controls (data not shown). The mean (\pm SD) decrease of CD8+ T-cells detected in the spleen was 69.4% ($\pm 1.25\%$), CD4+ T-cells 62.6% ($\pm 1.08\%$), CD3+ T-cells 66.1% ($\pm 1.42\%$), CD19+ T-cells 77.24% ($\pm 3.08\%$) and 75.81% ($\pm 1.55\%$) in case of CD45+ T-cells ($P < 0.05$). The mean (\pm SD) decrease of CD8+ T-cells detected in the blood was 91.88% ($\pm 1.44\%$), CD4+ T-cells 88.75% ($\pm 0.5\%$), CD3+ T-cells 90.02% ($\pm 0.83\%$), CD19+ T-cells 96.1% ($\pm 0.23\%$), and 81.36% ($\pm 1.46\%$) in the case of CD45+ T-cells ($P < 0.05$). The counts of lymphocytes after immunosuppression in BALB/c mice after albendazole treatment and BALB/c mice in chronic stage of infection were almost equal. Lymphocyte levels remained low during the remainder of the immunosuppression period.

Application of dexamethasone in BALB/c mice in the chronic stage of infection caused expansion of the parasite into many organs after one week that continued for several weeks (Fig. 2e). Microsporidia were found in all organs by week 5 post immunosuppression (91 DPI). Moreover, microsporidia were again alternately detected in feces from day 14 post immunosuppression.

Application of dexamethasone in BALB/c mice following treatment with albendazole resulted in parasite dissemination to many organs, as well (Fig. 2f). In particular, the brain and lungs were positive for microsporidia at each time point tested after immunosuppression. However, the extent of parasite dissemination in albendazole-treated, immunosuppressed BALB/c mice was lower than that observed in immunosuppressed BALB/c mice without albendazole treatment.

Discussion

Encephalitozoon cuculii is the most-studied species of microsporidia and the majority of information about the pathogenesis of microsporidiosis is derived from studies of this organism. Because *E. cuculii* has a low host specificity and its spores are resistant to adverse environmental conditions, man can easily get infected with this parasite, for example, through water and food contaminated by feces or urine of infected animals (zoonotic transmission) [6,7,30].

Microsporidia in humans are considered opportunistic pathogens, because they primarily cause disease when the host's immunity is reduced and so the parasite can easily overspread. The first case of human microsporidiosis was recorded in 1959 [8]. The number of cases increased during the 1990s coincident with the rising HIV/AIDS pandemic. Most microsporidial infections caused by *E. cuculii* are in immunocompromised patients (HIV positive individuals, patients undergoing organ transplantation or patients with idiopathic CD4+ T lymphocytopenia) [31]. When the T-cell count falls below 100/µl blood, infection manifests itself

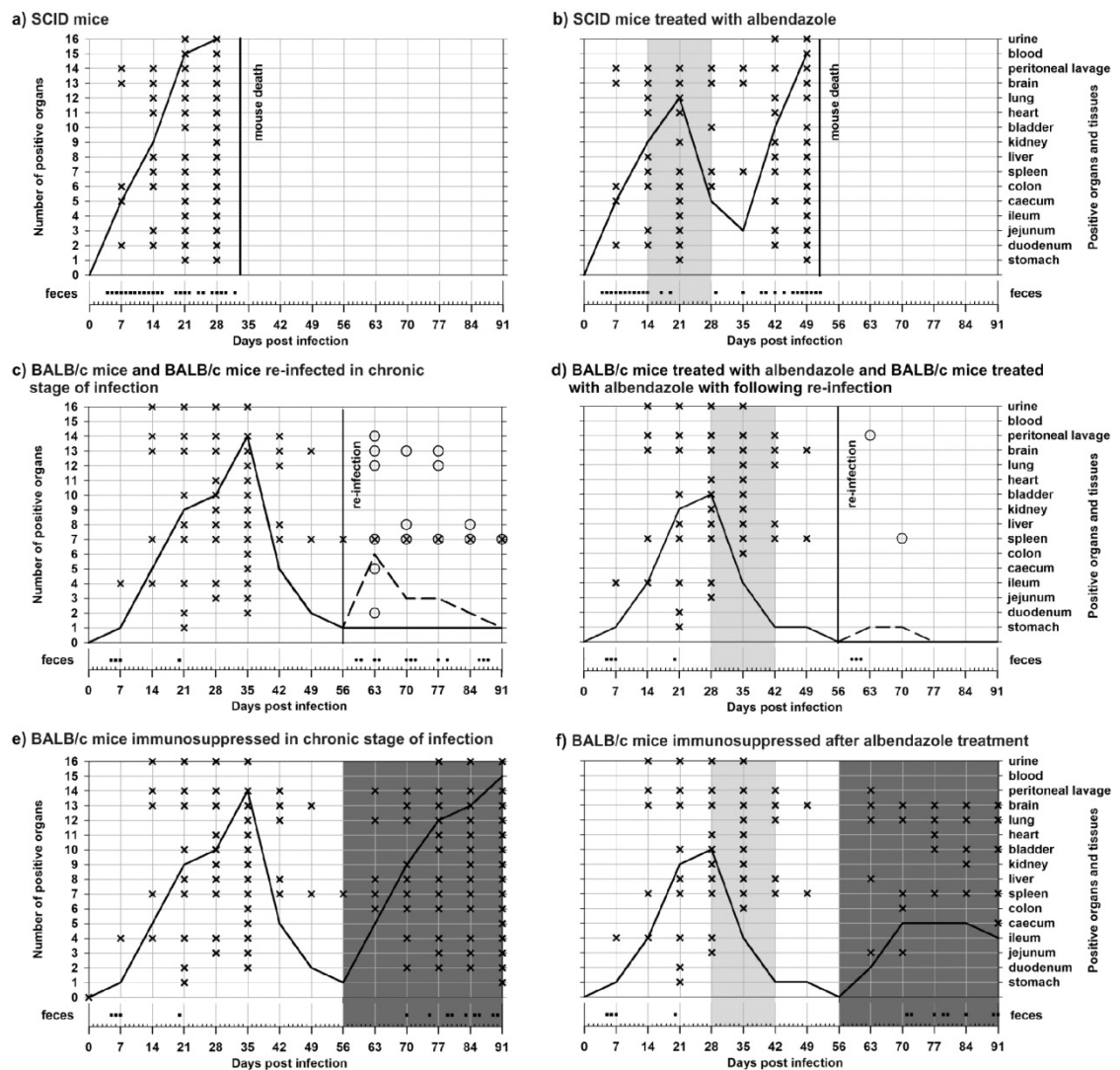


Figure 2. Course of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II infection, including pattern of spore shedding and dissemination of infection to selected organs and tissues. a) SCID mice, b) SCID mice treated with albendazole, c) BALB/c mice and BALB/c mice re-infected in chronic stage of infection, d) BALB/c mice treated with albendazole and BALB/c mice treated with albendazole with following re-infection, e) BALB/c mice immunosuppressed in chronic stage of infection, f) BALB/c mice immunosuppressed after albendazole treatment. **Light-gray field** – albendazole treatment; **dark-gray field** – dexamethasone immunosuppression; **black line** – course of *E. cuniculi* infection; **black dash line** – course of *E. cuniculi* re-infection; **cross** – *E. cuniculi* positive organ during primarily infection; **ring** – *E. cuniculi* positive organ during re-infection; **black square** – spores shedding during primarily infection; **black circle** – spores shedding during re-infection. doi:10.1371/journal.pone.0060941.g002

as acute microsporidiosis, often with systemic involvement [17,32]. Over the decades, several reviews on non-specific and adaptive immune responses involved in the fight against microsporidial infection have been published [33–35]. It is generally accepted that a protective immune response against this parasite is mediated by cytotoxic CD8+ T-lymphocytes [36] and their activation does not appear to be dependent upon CD4+ T-cells [37,38]. It was found that IFN- γ is the primary mechanism that mediates partial protection of SCID mice in the absence of CD4+ and CD8+ T-

lymphocytes [34]. This cytokine can enhance the cytotoxic activity of natural killer cells and activate macrophages to effectively kill phagocytosed microsporidial spores [39]. Moreover, activated macrophages also produce IFN- γ , which amplifies macrophage activation. Furthermore, T-cell-dependent B-cell activation for antibody production is also important in protection against microsporidia [40,41]. Recent results of Sak et al. [42] showed that *E. cuniculi* represents the vast majority of the microsporidial species found in the healthy population in the Czech Republic.

Moreover, the majority of examined individuals were without any clinical symptoms. Our results imply that a competent immune response is unable to fully eliminate the infection even if there are no clinical signs. The question remains how microsporidia are able to survive in sufficient quantities in the host for a long time despite an activated immune system.

The course of infection caused by *E. cuculii* in an immunocompetent host can be easily demonstrated in murine models such as in BALB/c mice. Furthermore, the SCID mouse is a suitable model for studying the pathogenesis and potential chemotherapeutics with anti-microsporidial effects [21]. As the present and previous reports show, microsporidiosis in hosts without a functional immune system has a rapid course with fatal consequence [36,40,41]. In contrast with general assumptions (see above), our results conclusively demonstrate that *E. cuculii* remain in some organs of immunocompetent hosts (BALB/c mouse) for a long time. In such cases, these organs can serve as constant sources of microsporidial spores.

The presented data highlight the potential dangers of latent microsporidiosis. During the last decade, microsporidia have been more frequently reported in immunocompetent individuals, producing asymptomatic infections [42,43]. As proven by our experiments, these latent infections may be reactivated during immunosuppression and the carrier can be a source of infection for at-risk groups. A recent case report described microsporidial keratoconjunctivitis that was transmitted by the donor corneal graft [44]. Latent microsporidiosis also can be dangerous for the carrier himself if undergoing chemotherapy for cancer or other immunosuppressive therapies. In addition, microsporidia can also cause serious disease in immunocompetent hosts [45].

Albendazole or its other derivatives are commonly used for treatment of microsporidiosis caused by *Encephalitozoon* spp. [18]. The efficacy of this therapy was studied here using sensitive molecular detection of parasites for the first time. Treatment extended the survival of SCID mice and appeared to eliminate *E. cuculii* from BALB/c mice. However, microsporidiosis was surprisingly re-activated in albendazole treated BALB/c mice after dexamethasone-induced immunosuppression. This implies that the population of *E. cuculii* organisms that was not detectable by PCR remained intact after albendazole treatment and this population expanded and disseminated following subsequent immunosuppression. Although the number of affected organs was not as high as that in infected SCID mice, the evidence that an undetectable infection can be reactivated is of major significance for public health. It is perhaps unsurprising that *E. cuculii* spread rapidly following immunosuppression and the number of affected organs was similar to that observed in SCID mice. Lallo et al. [46] reached similar conclusions, when cyclophosphamide-immunosuppressed mice with *E. cuculii* infection showed clinical symptoms of acute, lethal and widespread microsporidiosis

affecting the liver, lungs, intestines, kidneys and brain. In contrast cyclosporin-immunosuppressed mice inoculated with *E. cuculii* developed mild, chronic infection with a few clinical manifestations and histological lesions.

Recent data would suggest that the incidence of microsporidial infections is much higher than previously reported [47,48]. The true incidence is difficult to estimate due to the presence of asymptomatic carriers [42,43,49,50]. The results observed by Sak et al. [42,43] demonstrated the high prevalence of microsporidia in naturally infected immunocompetent humans and various species of animals suggesting that immune mechanisms of defense against microsporidia do not completely clear the organisms. Moreover, our data further support this interpretation since immunocompetent BALB/c mice infected only once or mice re-infected after albendazole treatment shed spores in feces for only a few days despite persistent microsporidia within the host that reactivated after dexamethasone treatment. In contrast, re-infection of BALB/c mice during chronic infection led to intermittent shedding of spores in feces for a long period. It follows that a single test can give false negative results in up to 70% of cases [42,43].

Consequently, results of our experiments can be implemented into practice; individuals with latent microsporidiosis may be at risk if they become immunocompromised, and should be tested for microsporidia if undergoing chemotherapy, transplantation, or other therapy requiring a suppression of the immune system. Moreover, it is necessary to repeatedly examine stool specimens for a few days in order to detect intermittent shedding of microsporidial spores. Unfortunately, microsporidia are often overlooked and underdiagnosed because of the lack of an adequately sensitive and specific method.

In conclusion, our study shows the induction of acute and subsequent chronic infection with microsporidia in immunocompetent laboratory mice, and successful re-activation and re-dissemination of the infection after artificial immunosuppression. Understanding how microsporidia survive in their hosts despite a competent immune system can help explain the emergence of latent microsporidiosis. This would also answer questions concerning the possibility of repeated re-infections, relapse after immunosuppression, efficacy of immune system and use of anti-microsporidial treatment and may lead to introduction of reliable methods for testing the presence of microsporidia infections.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: M. Kotkova BS. Performed the experiments: M. Kotkova BS DK. Analyzed the data: M. Kotkova M. Kvac BS. Contributed reagents/materials/analysis tools: M. Kotkova DK. Wrote the paper: M. Kotkova BS M. Kvac.

References

- Canning EU, Lom J, Dyková I (1986) The microsporidia of vertebrates. Academic Press, London, 289 pp.
- Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, et al. (1999) Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 180: 2003–2008.
- Dowd S, Gerba S, Pepper I (1998) Confirmation of the human pathogenic Microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vitiforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol* 64: 3332–3335.
- Fournier S, Liguory O, Santillana-Hayat M, Guillot E, Sarfati C, et al. (2000) Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29: 95–100.
- Sinski E (2003) Environmental contamination with protozoan parasite infective stages: biology and risk assessment. *Acta Microbiol Pol* 52: 97–107.
- Bryan RT, Schwartz DA (1999) Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner M, Weiss LM (eds.) The microsporidia and microsporidiosis. ASM, Washington DC, 502–516.
- Deplazes P, Mathis A, Weber R (2000) Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib Microbiol* 6: 236–260.
- Matsubayashi H, Koike I, Mikata I, Takei H, Higihara S (1959) A case of *Encephalitozoon*-like infection in man. *Arch Pathol* 67: 181–187.
- Canning EU, Hollister WS (1992) Human infections with microsporidia. *Rev Med Microbiol* 2: 35–42.
- Weber R, Deplazes P, Flepp M, Mathis A, Baumann R, et al. (1997) Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuculii* in a patient with human immunodeficient virus infection. *New Eng J Med* 336: 474–478.
- Wright JH, Craighead EM (1922) Infectious motor paralysis in young rabbits. *J Exp Med* 36: 135–140.

12. Levaditi C, Nicolau S, Schoen R (1923) Etiology of epizootic rabbit encephalitis in reports with experimental studies of encephalitis lethargica. *Encephalitozoon cuniculi* (nov spec). Ann Inst Pasteur (Paris) 38: 675–711.
13. Shadduck JA (1969) *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. Science 166: 516–517.
14. Didier ES (1995) Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* replication in murine peritoneal macrophages. Parasite Immunol 17: 405–412.
15. Didier ES, Snowden KF, Shadduck JA (1998) Biology of microsporidian species infecting mammals. Adv Parasitol 40: 283–320.
16. Mertens RB, Didier ES, Fishbein MC, Bertucci DC, Rogers LB, et al. (1997) *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. Mod Pathol 10: 68–77.
17. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL (1994) Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev 7: 426–461.
18. Didier ES (2005) Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Trop 94: 61–76.
19. Pozio E, Morales MA (2005) The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. Trends Parasitol 21: 58–63.
20. Gannon J (1980) The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. Lab Anim 14: 189–192.
21. Koudela B, Vitovec J, Kučerová Z, Ditrich O, Trávníček J (1993) The severe combined immunodeficient mouse as model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. Folia Parasitol 40: 279–286.
22. Schmidt EC, Shadduck JA (1983) Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of chronic infection. Infect Immun 40: 936–942.
23. Waywa D, Kongkriengdaj S, Chaidatch S, Tiengrim S, Kowadisaurana B, et al. (2001) Protozoan enteric infection in AIDS-related diarrhea in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 32: 151–155.
24. Canning EU, Hollister WS (1991) *In vitro* and *in vivo* investigations of human microsporidia. J Protozool 38: 631–635.
25. De Groote MA, Visvesvara G, Wilson ML, Pieniazek NJ, Slemenda SB, et al. (1995) Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. J Infect Dis 171: 1375–1378.
26. Koudela B, Lom J, Vitovec J, Kučerová Z, Ditrich O, et al. (1994) *In vivo* efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. J Eukaryot Microbiol 41: 49–50.
27. De Bosschere H, Wang Z, Orlandi PA (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.
28. Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Helse W, Löscher T, Rinder H (1996) Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. Trop Med Int Health 1: 373–378.
29. Jalovecká M, Sak B, Kváč M, Květoňová D, Kučerová Z, et al. (2010) Activation of protective cell-mediated immune response in gastric mucosa during *Cryptosporidium muris* infection and re-infection in immunocompetent mice. Parasitol Res 106: 1159–1166.
30. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, et al. (2004) Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Vet Par 126: 145–166.
31. Mathis A, Weber R, Deplazes P (2005) Zoonotic potential of the microsporidia. Clin Microbiol Rev 18: 423–445.
32. Orenstein JM (1991) Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. J Parasitol 77: 843–864.
33. Franzen C, Hartmann P, Salzberger B (2005) Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. Exp Parasitol 109: 1–6.
34. Khan IA, Moretto M, Weiss LM (2001) Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. Microbes Infect 3: 401–405.
35. Valencakova A, Halanova M (2012) Immune response to *Encephalitozoon* infection review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 35: 1–7.
36. Braunfuchsová P, Salát J, Kopecký J (2001) CD8+ T-lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. Int J Parasitol 15: 681–686.
37. Khan IA, Schwartzman JD, Kasper LH, Moretto M (1999) CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. J Immunol 162: 6086–6091.
38. Moretto M, Casciotti L, Durell B, Khan IA (2000) Lack of CD4(+) T-cells does not affect induction of CD8(+) T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. Infect Immun 68: 6223–6232.
39. Didier ES and Shadduck JA (1994) IFN- γ and LPS induce murine macrophages to kill *Encephalitozoon cuniculi* in vitro. J Eukaryot Microbiol 41: 43.
40. Sak B, Salát J, Horká H, Saková K, Ditrich O (2006) Antibodies enhance the protective effect of CD4+ T-lymphocytes in SCID mice p.o. infected with *Encephalitozoon cuniculi*. Parasite Immunol 28: 95–99.
41. Salát J, Horká H, Sak B, Kopecký J (2006) Pure CD4+ T-lymphocytes fail to protect perorally infected SCID mice from lethal microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*. Parasitol Res 99: 682–686.
42. Sak B, Brady D, Pelikánová M, Květoňová D, Rost M, et al. (2011) Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. J Clin Microbiol 49: 1064–1070.
43. Sak B, Kváč M, Kučerová Z, Květoňová D, Saková K (2011) Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals - a longitudinal study. PLoS Negl Trop Dis 5: e1162.
44. Kakrania R, Joseph J, Vaddavalli PK, Gangopadhyay N, Sharma S (2006) Microsporidia keratoconjunctivitis in a corneal graft. Eye (Lond) 20: 1314–1315.
45. Ditrich O, Chrdle A, Sak B, Chmelik V, Kubále J, et al. (2011) *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. J Clin Microbiol 49: 2769–2771.
46. Anete Lallo M, Porta Miche Hirschfeld M (2012) Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. Exp Parasitol 131: 339–343.
47. Hollister WS, Canning EU, Willcox A (1991) Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. Parasitology 102: 33–43.
48. Van Gool T, Vetter JCM, Weinmayr B, Van Dam A, Derouin F, et al. (1997) High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. J Infect Dis 175: 1020–1024.
49. Breitenmoser A, Mathis A, Bürgi E, Weber R, Deplazes P (1999) High prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. Parasitology 118: 447–453.
50. Sak B, Kašíčková D, Kváč M, Květoňová D, Ditrich O (2010) Microsporidia in exotic birds: intermittent spore excretion of *Encephalitozoon* spp. in naturally infected budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Vet Parasitol 168: 196–200.

VI. CITOVANÁ LITERATURA

- Accoceberry, I., Thellier, M., Desportes-Livage, I., Achbarou, A., Biligui, S., Danis, M., Datry, A., 1999.** Production of monoclonal antibodies directed against the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi*. *J Clin Microbiol* 37: 4107–4112.
- Achbarou, A.C., Ombrouck, T., Gneragbe, T., 1996.** Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasite Immunol* 18: 387–392.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F., 2005.** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52: 399–451.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012.** The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59: 429–493.
- Akerstedt, J., 2003.** Humoral immune response in adult blue foxes (*Alopex lagopus*) after oral infection with *Encephalitozoon cuniculi* spores. *Vet Parasitol* 113: 203–210.
- Akerstedt, J., Nordstoga, K., Mathis, A., Smeds, E., Deplazes, P., 2002.** Fox encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic lesions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49: 400–405.

- Aldras, A.M., Orenstein, J.M., Kotler, D.P., Shadduck, J.A., Didier, E.S., 1994.** Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 32: 608–612.
- Anver, M.R., King, N.W., Hunt, R.D., 1972.** Congenital encephalitozoonosis in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol* 9: 475–480.
- Arisue, N., Sanchez, L.B., Weiss, L.M., Muller, M., Hashimoto, T., 2002.** Mitochondrial-type Hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol Int* 51: 9–16.
- Arnesen, K., Nordstoga, K., 1977.** Ocular encephalitozoonosis (nosematosis) in blue foxes. *Acta Ophthalmol* 55: 641–651.
- Asakura, T., Nakamura, S., Ohta, M., Une, Y., Furuya, K., 2006.** Genetically unique microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* strain type III isolated from squirrel monkeys. *Parasitol Int* 55: 159–162.
- Balbani G., 1882.** Sur les microsporidies ou psoro spermies des articules. *CR Acad Sci* 95: 1168–1171.
- Baneux, P.J., Pognan, F., 2003.** In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Lab Anim* 37: 132–138.
- Basson, P.A., McCully, R.M., Warnes, W.E.J., 1966.** Nosematosis: report of a canine case in the Republic of South Africa. *J S Afr Vet Med Assoc* 37: 3–9.
- Beckers, P.J., Derks, G.J., Gool, T., Rietveld, F.J., Sauerwein, R.W., 1996.** *Encephalocytozoon intestinalis*-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *J Clin Microbiol* 34: 282–285.
- Bergquist, N.R., Stintzing, G., Smedman, L., Waller, T., Andersson, T., 1984.** Diagnosis of encephalitozoonosis in man by serological tests. *Br Med J* 288: 902.
- Binder, B., Kundig, T.M., 1991.** Antiviral protection by CD8⁺ versus CD4⁺ T cells. CD8⁺ T cells correlating with cytotoxic activity in vitro are more efficient

in antivaccinia virus protection than CD4-dependent IL. J Immunol 146: 4301–4307.

- Bohne, W., Böttcher, K., Groß, U., 2011.** The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. Int J Med Microbiol 301: 395–399.
- Boot, R., van Knapen, F., Kruijt, B.C., Walvoort, H.C., 1988.** Serological evidence for *Encephalitozoon cuniculi* infection (nosemiasis) in gnotobiotic guineapigs. Lab Anim 22: 337–342.
- Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J., 1983.** A severe combined immunodeficiency mutant in the mouse. Nature 301: 527–530.
- Botha, W.S., van Dellen, A.F., Stewart, C.G., 1979.** Canine encephalitozoonosis in South Africa. J S Afr Vet Assoc 50: 135–144.
- Botha, W.S., Dormehl, I.C., Goosen, D.J., 1986.** Evaluation of kidney function in dogs suffering from canine encephalitozoonosis by standard clinical pathological and radiopharmaceutical techniques. J S Afr Vet Assoc 57: 79–86.
- Braunfuchsová, P., Salát, J., Kopecký, J., 2001.** CD8⁺ T Lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. Int J Parasitol 15: 681–686.
- Brown, J.R., Doolittle, W.F., 1995.** Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. Proc Natl Acad Sci USA 92: 2441–2445.
- Brown, J.R., Doolittle, W.F., 1999.** Gene descent, duplication, and horizontal transfer in the evolution of glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases. J Mol Evol 49: 485–495.
- Brown, R.J., Hinkle, D.K., Trevethan, W.P., Kupper, J.L., McKee, A.E., 1973.** Nosematosis in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). Med Primatol 2: 114–123.
- Bryan, R.T., Schwartz, D.A., 1999.** Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (eds). The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington DC, pp. 502–516.

- Bywater, J.E., Kellett, B.S., 1979.** Humoral immune response to natural infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim* 13: 293–297.
- Calvo, M., Carazo, M., Arias, M.L., Chaves, C., Monge, R., Chinchilla, M., 2004.** Prevalence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp, microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica. *Arch Latinoam Nutr* 54: 428–432. Spanish.
- Canning, E.U., 1988.** Nuclear division and chromosome cycle in microsporidia. *BioSystems* 21: 333–340.
- Canning, E.U., Hollister, W.S., 1992.** Human infections with microsporidia. *Rev Med Microbiol* 2: 35–42.
- Canning, E.U., Lom, J., Dyková, I., 1986.** The microsporidia of vertebrates. Academic Press, London, United Kingdom, 289 s.
- Canning, E.U., 1993.** Microsporidia, In: Kreier, J.P. and Baker, J.R. (eds). *Parasitic protozoa*, 2nd edition, vol. 6. Academic Press, Inc., New York, 323 s.
- Capella-Gutierrez S, Marcet-Houben M, Gabaldon T., 2012.** Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol* 10: 47.
- Cavalier-Smith, T., 1983.** A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. In: Shenck, H.E.A., Schwemmler, W.S. (eds). *Endocytobiology. II. Intracellular Space as Oligogenetic*. Walter de Gruyter, Berlin, 1071 s.
- Cavalier-Smith, T., 1983.** Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 326: 332–333.
- Corradi, N., Keeling, P.J., 2009.** Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biol Rev* 23: 1–8.
- Cotte, L., Rabodonirina, M., Chapuis, F., Bailly, F., Bissuel, F., Raynal, C., Gelas, P., Persat, F., Piens, M.A., Trepo, C., 1999.** Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 180, 2003–2008.
- Coupe, S., Delabre, K., Pouillot, R., Houdart, S., Santillana-Hayat, M., Derouin, F., 2006.** Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in

- surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47: 351–359.
- Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R., Zimmerli, S., 2000.** Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 68: 6939–6945.
- Cox, J.C., Gallichio, H.A., Pye, D., Walden, N.B., 1977.** Application of the immunofluorescence to the establishment of an *Encephalitozoon cuniculi* free rabbit colony. *Labor Anim Sci* 27: 204–209.
- Cox, J.C., Hamilton, R.C., Attwood, H.D., 1979.** An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J Protozool* 26: 260–265.
- Cox, J.C., Pye, D. 1975.** Serodiagnosis of nosematosis by immunofluorescence using cell culture grown organism. *Lab Anim* 9: 297–304.
- Curgy, J.J., Vávra, J., Vivarès, C.P., 1980.** Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organism. *Biol Cell* 38: 49–51.
- Cutlip, R.C., Beall, C.W., 1989.** Encephalitozoonosis in arctic lemmings. *Lab Anim Sci* 39: 331–333.
- Decraene, V., Lebbad, M., Botero-Kleiven, S., Gustavsson, A.M., Löfdahl, M., 2012.** First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiol Infect* 140: 519–527.
- Desportes, I., Le Charpentier, Y., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P., Modigliani, R., 1985.** 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.
- Didier, E.S., 2005.** Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94: 61–76.
- Didier, E.S., Didier, P.J., Snowden, K.F., Shadduck, J.A., 2000.** Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection/ Institut Pasteur*, 2: 709–720.

- Didier, E.S., Orenstein, J.M., Aldras, A., Bertucci, D., Rogers, L.B., Janney, F.A., 1995a.** Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol* 33: 3138–3145.
- Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K., Didier, P.J., 2004.** Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 126: 145–166.
- Didier, E.S., Varner, P.W., Didier, P.J., Aldras, A.M., Millichamp, N.J., Murphey-Corb, M., Bohm, R., Shadduck, J.A., 1994.** Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol* 41: 1–11.
- Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., Shadduck, J.A., 1995b.** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111: 411–421.
- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2011.** Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis* 24: 490–495.
- Ditrich, O., Chrdle, A., Sak, B., Chmelík, V., Kubále, J., Dyková, I., Kváč, M., 2011.** *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol* 49: 2769–2771.
- Dowd, S.E., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 1998.** Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol* 64: 3332–3335.
- Edlind, T., 1998.** Phylogenetics of protozoan tubulin with reference to the amitochondriate eukaryotes. In: Coombs, G.H., Vickerman, K., Sleigh, M.A., Warren, A. (eds). *Evolutionary Relationships Among Protozoa*. Chapman & Hall, London, 464 s.
- Edlind, T., Katiyar, S., Visvesvara, G., Li, J., 1996.** Evolutionary origins of Microsporidia and basis for benzimidazole sensitivity: an update. *J Eukaryot Microbiol* 43: 109S.
- Fast, N.M., Logsdon, J.M., Jr., Doolittle, W.F., 1999.** Phylogenetic analysis of the TATA box binding protein (TBP) gene from *Nosema locustae*: evidence for a

microsporidia-fungi relationship and spliceosomal intron loss. *Mol Biol Evol* 16: 1415–1419.

Fayer, R., Santin-Duran, M., 2014. Epidemiology of microsporidia in human infections. In: Weiss, L.M. and Becnel, J.J. (eds). *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Willey Blackwell, Oxford, 728 s.

Findley, A.M., Weidner, E.H., Carman, K.R., Xu, Z., Godbar, J.S., 2005. Role of the posterior vacuole in *Spraguea lophii* (Microsporidia) spore hatching. *Folia Parasitol* 52: 111–117.

Flegel, T.W., Pasharawipas, T., 1995. A proposal for typical eukaryotic meiosis in microsporidians. *Can J Microbiol* 41: 1–11.

Franzen, C., 2004. Microsporidia: how can they invade other cells. *Trends Parasitol* 20: 275–279.

Franzen, C., 2008. Microsporidia: a review of 150 years of research. *Open Parasitol J* 2: 1–34.

Franzen, C., Müller, A., 1999. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 12: 243–285.

Franzen, C., Müller, A., 2001. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect* 3: 389–400.

Franzen, C., Muller, A., Hartmann, P., Salzberger, B., 2005. Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitology* 130: 285–292.

Franzen, C., Schwartz, D.A., Visvesvara, G.S., Müller, A., Schwenk, A., Salzberger, B., Fätkenheuer, G., Hartmann, P., Mahrle, G., Diehl, V., Schrappe, M., 1995. Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 21: 1480–1484.

Gannon, J., 1980a. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. *Lab Anim* 14: 91–94.

- Gannon, J., 1980b.** The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab Anim* 14: 189–192.
- Garcia, L.S., 2002.** Laboratory identification of the microsporidia. *J Clin Microbiol* 40: 1892–1901.
- Ghosh, K., Weiss, L.M., 2012.** T cell response and persistence of the microsporidia. *FEMS Microbiol Reviews* 36: 748–760.
- Guscetti, F., Mathis, A., Hatt, J.M., Deplazes, P., 2003.** Overt fatal and chronic subclinical *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*Saguinus imperator*). *J Med Primatol* 32: 111–119.
- Heřmánek, J., Koudela, B., Kučerová, A., Ditrich, O., Tránvíček, J., 1993.** Prophylactic and therapeutic immune reconstitution of SCID mice infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol* 40: 287–291.
- Hirt, R.P., Healy, B., Vossbrinck, C.R., Canning, E.U., Embley, T.M., 1997.** A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol* 7: 995–998.
- Hirt, R.P., Logsdon, J.M., Jr., Healy, B., Dorey, M.W., Doolittle, W.F., Embley, T.M., 1999.** Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 580–585.
- Hocevar, S.N., Paddock, C.D., Spak, C.W., Rosenblatt, R., Diaz-Luna, H., Castillo, I., Luna, S., Friedman, G.C., Antony, S., Stoddard, R.A., Tiller, R.V., Peterson, T., Blau, D.M., Sriram, R.R., da Silva, A., de Almeida, M., Benedict, T., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Visvesvara, G.S., Kuehnert, M.J.; Microsporidia Transplant Transmission Investigation Team, 2014.** Microsporidiosis acquired through solid organ transplantation: a public health investigation. *Ann Intern Med* 160: 213–220.
- Hofmannová, L., Sak, B., Jekl, V., Mináriková, A., Skorič, M., Kváč, M., 2014.** Lethal *Encephalitozoon cuniculi* genotype III infection in Steppe lemmings (*Lagurus lagurus*). *Vet Parasitol* 205: 357–360.
- Hořejší, V., Bartůňková, J., 2005.** Základy imunologie. TRITON, Praha, 240 s.

- Hunt, R.D., King, N.W., Foster, H.L., 1972.** Encephalitozoonosis: evidence for vertical transmission. *J Infect Dis* 126: 212–214.
- Innes, J.R., Zeman, W., Frenkel, J.K., Borner, G., 1962.** Occult Endemic Encephalitozoönosis of the central nervous system of mice (Swiss-Bagg-O'Grady strain). *J Neuropathol Exp Neurol* 21: 519–533.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G.H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schussler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lucking, R., Budel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W., Vilgalys, R., 2006.** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818–822.
- Jax Mice Database, 2018.** The Jackson laboratory; <https://www.jax.org>.
- Jedrzejewski, S., Graczyk, T.K., Slodkiewicz-Kowalska, A., Tamang, L., Majewska, A.C., 2007.** Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Appl Environ Microbiol* 73: 4071–4073.
- Juan-Sallés, C., Garner, M.M., Didier, E.S., Serrato, S., Acevedo, L.D., Ramos-Vara, J.A., Nordhausen, R.W., Bowers, L.C., Parás, A., 2006.** Disseminated encephalitozoonosis in captive, juvenile, cotton-top (*Saguinus oedipus*) and neonatal emperor (*Saguinus imperator*) tamarins in North America. *Vet Pathol* 43: 438–446.

- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., Vivarès, C.P., 2001.** Genome sequence and gene compaction of eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414: 450–453.
- Kašičková, D., Sak, B., Kváč, M., Ditrich, O., 2009.** 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.
- Keeling, P.J., Doolittle, W.F., 1996.** Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Mol Biol Evol* 13: 1297–1305.
- Keeling, P.J., Luker, M.A., Palmer, J.D., 2000.** Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol* 17: 23–31.
- Keohane, E.M., Weiss, L.M., 1998.** Characterisation and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia Parasitol* 45: 117–127.
- Khan, I.A., Moretto, M., 1999.** Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 67: 1887–1893.
- Khan, I.A., Moretto, M., Weiss, L.M., 2001.** Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect* 3: 401–405.
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Kasper, L.H., Moretto, M., 1999.** CD8⁺ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 162: 6086–6091.
- Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Květoňová, D., Kváč, M., 2018.** Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model. *Exp Parasitol* 193: 51–57.
- 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.

Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Kváč, M., 2017. The course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice. Exp Parasitol 182: 16–21.

Koudela, B., Vítovec, J., Kučerová, Z., Ditrich, O., Trávníček, J., 1993. The severe combined immunodeficient mouse as model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. Folia Parasitol 40: 279–286.

Kučerová-Pospíšilová, 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 Parasitol 45: 108–112.

Kudo, R.R., 1966. In: Thomas, Ch.C. (ed). Protozoology. 5th edition. Springfield, Illinois.

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 Pathog Dis 13: 77–79.

Ledford, D.K., Overman, M.D., Gonzalvo, A., Cali, A., Mester, S.W., Lockey, R.F., 1985. Microsporidiosis myositis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 102: 628–630.

Les, E.P., 1990. A brief history of the two substrains of Balb/c, Balb/cJ, and Balb/cByJ. Available from animal resources. Jax Notes Issue 443, The Jackson laboratory; <https://www.jax.org>.

Levaditi, C., Nicolau, S., Schoen, R., 1923. Etiology of epizootic rabbit encephalitis in reports with experimental studies of encephalitis lethargica. *Encephalitozoon cuniculi* (nov spec). Ann Inst Pasteur (Paris) 38: 675–711.

Lianson, R., Garnham, P.C.C., Killick-Kendrick, R., Bird, R.G., 1964. Nosematosis, a microsporidial infection of rodents and other animals, including man. Br Med J 2: 470–472.

- Liu, Y.J., Hodson, M.C., Hall, B.D., 2006.** Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evol Biol* 6: 74.
- Mathews, A., Hotard, A., Hale-Donze, H., 2009.** Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes Infect* 11: 905–911.
- Mathis, A., Akerstedt, J., Tharaldsen, J., Odegaard, O., Deplazes, P., 1996.** Isolates of *Encephalitozoon cuniculi* from farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) from Norway differ from isolates from Swiss domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Parasitol Res* 82: 727–730.
- Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P., 2005.** Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 18: 423–445.
- Matsubayashi, H., Koike, I., Mikata, I., Takei, H., Higihara, S., 1959.** A case of *Encephalitozoon*-like infection in man. *Arch Pathol* 67: 181–187.
- McInnes, E.F., Stewart, C.G., 1991.** The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J S Afr Vet Assoc* 62: 51–54.
- Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., Yoshiki, A., 2009.** Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim* 58: 141–149.
- Meng, X., Zheng, J., He, X., Jia, H., Zhang, Y., 2014.** First characterization in China of *Encephalitozoon cuniculi* in the blue fox (*Alopex lagopus*). *J Eukaryot Microbiol* 61: 580–585.
- Menotti, J., Cassinat, B., Porcher, R., Sarfati, C., Derouin, F., Molina, J.M., 2003a.** 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.
- Menotti, J., Cassinat, B., Sarfati, C., Liguory, O., Derouin, F., Molina, J.M., 2003b.** Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *J Clin Microbiol* 41: 1410–1413.

- Mohn, S.F., Nordstoga, K., 1982.** Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Neonatal exposure to the parasite. *Acta Vet Scand* 23: 344–360.
- Mohn, S.F., Nordstoga, K., Dishington, I.W., 1982.** Experimental encephalitozoonosis in the blue fox: clinical, serological and pathological examinations of vixens after oral and intrauterine inoculation. *Acta Vet Scand* 23: 490–502.
- Mohn, S.F., Nordstoga, K., Krogsrud, J., Helgebostad, A., 1974.** Transplacental transmission of *Nosema cuniculi* in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 82: 299–300.
- Molina, J.M., Oksenhendler, E., Beauvais, B., Sarfati, C., Jaccard, A., Derouin, F., Modai, J., 1995.** Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *J Infect Dis* 171: 245–249.
- Monis, P.T., Giglio, S., 2006.** Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infect Genet Evol* 6: 2–12.
- Montrey, R.D., Shadduck, J.A., Pakes, S.P., 1973.** *In-vitro* host range of three isolates of *Encephalitozoon (Nosema)*. *J Infect Dis* 127: 450–454.
- Moretto, M.M., Casciotti, L., Durell, B., Khan, I.A., 2000.** Lack of CD4(+) T cells does not affect induction of CD8(+) T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 68: 6223–6232.
- Moretto, M., Durell, B., Schwartzman, J.D., Khan, I.A., 2001.** Gamma delta T cell-deficient mice have a down-regulated CD8+ T cell immune response against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 166: 7389–7397.
- 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. *J Immunol* 172: 4402–4409.
- Nägeli, C., 1857.** Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismem. *Bot Zeitung* 15: 760–761.
- Neumayerová, H., Juránková, J., Jeklová, E., Kudláčková, H., Faldyna, M., Kovařík, K., Jánová, E., Koudela, B., 2014.** Seroprevalence of *Toxoplasma*

- gondii and *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits from different farming systems. *Vet Parasitol* 204: 184–190.
- Nieder Korn, J.Y., Shaddock, J.A., Schmidt, E.C., 1981.** Susceptibility of selected inbred strains of mice to *Encephalitozoon cuniculi*. *J Infect Dis* 144: 246–253.
- Nordstoga, K., Mohn, S.F., Aamdal, J., Helgebostad, A., 1978.** Nosematosis (Encephalitozoonosis) in a litter of blue foxes after intrauterine injection of *Nosema* spores. *Acta Vet Scand* 19: 150–152.
- Ombrouck, C., Romestand, B., da Costa, J.M., Desportes-Livage, I., Datry, A., Coste, F., Bouix, G., Gentilini, M., 1995.** Use of cross-reactive antigens of the microsporidian *Glugea atherinae* for the possible detection of *Enterocytozoon bieneusi* by western blot. *Am J Trop Med Hyg* 52: 89–93.
- Orenstein, J.M., Tenner, M., Cali, A., Kotler, D.P., 1992.** A microsporidian previously undescribed in humans, infecting enterocytes and macrophages, and associated with diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient. *Hum Pathol* 23: 722–728.
- Owen, D.G., Gannon, J., 1980.** Investigation into the transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim* 14: 35–38.
- Patterson-Kane, J.C., Caplaz, P., Rurangirwa, F., Tramontin, R.R., Wolfsdorf, K., 2003.** *Encephalitozoon cuniculi* placentitis and abortion in a Quarterhorse mare. *J Vet Diagn Invest* 15: 57–59.
- Pakes, S.P., Shaddock, J.A., Cali, A., 1975.** Fine structure of *Encephalitozoon cuniculi* from rabbits, mice, and hamsters. *J Protozool* 22: 481–488.
- Perrin, T.L., 1943.** Spontaneous and experimental *Encephalitozoon* infection in laboratory animals. *Arch Pathol* 36: 559–567.
- Plowright, W., 1952.** An encephalitis-nephritis syndrome in the dog probably due to congenital encephalitozoon infection. *J Comp Pathol* 62: 83–92.
- Plowright, W., Yeoman, G., 1952.** Probable *Encephalitozoon* infection of the dog. *Vet Rec* 64: 381–383.

- Rebel-Bauder, B., Leschnik, M., Maderner, A., Url, A., 2011.** Generalized encephalitozoonosis in a young kitten with cerebellar hypoplasia. *J Comp Pathol* 145: 126–131.
- Reetz, J., Nöckler, K., Reckinger, S., Vargas, M.M., Weiske, W., Broglia, A., 2009.** Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitol Int* 58: 285–292.
- Reetz, J., Wiedemann, M., Aue, A., Wittstatt, U., Ochs, A., Thomschke, A., Manke, H., Schwebs, M., Rinder, H., 2004.** Disseminated lethal *Encephalitozoon cuniculi* (genotype III) infections in cotton-top tamarins (*Oedipomidas oedipus*) - a case report. *Parasitol Int* 53: 29–34.
- Salát, J., Braunfuchsová, P., Kopecký, J., 2001.** Experimental infection of immunocompetent and immunodeficient mice with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol* 48: 249–254.
- Salát, J., Braunfuchsová, P., Kopecký, J., Ditrich, O., 2002.** Role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the protection of mice against *Encephalitozoon intestinalis* infection. *Parasitol Res* 88: 603–608.
- Salát, J., Horká, H., Sak, B., Kopecký, J., 2006.** Pure CD4⁺ T lymphocytes fail to protect perorally infected SCID mice from lethal microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol Res* 99: 682–686.
- Salát, J., Jelínek, J., Chmelar, J., Kopecky, J., 2008.** Efficacy of gamma interferon and specific antibody for treatment of microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2169–2174.
- Sak, B., Ditrich, O., 2005.** Humoral intestinal immunity against *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) infection in mice. *Folia Parasitol* 52: 158–162.
- Sak, B., Saková, K., Ditrich, O., 2004.** Effects of a novel anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial development *in vitro*. *Parasitol Res* 92: 74–80.
- Sak, B., Salat, J., Horká, H., Saková, K., Ditrich, O., 2006.** Antibodies enhance the protective effect of CD4⁺ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasite Immunol* 28: 95–99.

- Sak, B., Kotková, M., Hlásková, L., Kváč, M., 2017.** Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis. *Parasite Immunol* 39: e12496.
- Sak, B., Kučerová, Z., Kváč, M., Květoňová, D., Rost, M., Secor, E.W., 2010.** Seropositivity for *Enterocytozoon bieneusi*, Czech Republic. *Emerg Infect Dis* 16: 335–337.
- Sak, B., Kváč, M., Kučerová, Z., Květoňová, D., Saková, K., 2011.** Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals - a longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1162.
- Sak, B., Vecková, T., Brdíčková, K., Smetana, P., Hlásková, L., Kicia, M., Holubová, N., McEvoy, J., Kváč, M., 2019.** Experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection acquired from fermented meat products. *Foodborne Pathog Dis* 16: 394–398.
- Schmidt, E.C., Shadduck, J.A., 1983.** Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. *Infect Immun* 40: 936–942.
- Schmidt, E.C., Shadduck, J.A., 1984.** Mechanism of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J Immunol* 133: 2712–2719.
- Schoenborn, J.R., Wilson, C.B., 2007.** Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96: 41–101.
- Scurrall, E.J., Holding, E., Hopper, J., Denk, D., Fuchs-Baumgartinger, A., Silbermayr, K., Nell, B., 2015.** Bilateral lenticular *Encephalitozoon cuniculi* infection in a snow leopard (*Panthera uncia*). *Vet Ophthalmol* 1: 143–147.
- Shadduck, J.A., 1969.** *Nosema cuiculi*: in vitro isolation. *Science*. 166: 516–517.
- Shadduck, J.A., Bendele, R., Robinson, G.R., 1978.** Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Vet Pathol* 15: 449–460.
- Shadduck, J.A., Pakes, S.P., 1971.** Spontaneous diseases of laboratory animals which interfere with biomedical research: encephalitozoonosis and toxoplasmosis. *Am J Pathol* 64: 657–674.

- Shadduck, J.A., Watson, W.T., Pakes, S.P., Cali, A., 1979.** Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. J Parasitol 65: 123–129.
- Sheoran, A.S., Feng, X., Singh, I., Chapman-Bonofiglio, S., Kitaka, S., Hanawalt, J., Nunnari, J., Mansfield, K., Tumwine, J.K., Tzipori, S., 2005.** Monoclonal antibodies against *Enterocytozoon bieneusi* of human origin. Clin Diagn Lab Immunol 12: 1109–1113.
- Smith, K.A., 1988.** Interleukin-2: inception, impact, and implications, Science 240: 1169–1176.
- Snowden, K.F., Didier, E.S., Orenstein, J.M., Shadduck, J.A., 1998.** Animal models of human microsporidial infections. Lab Anim Sci 48: 589–592.
- Snowden, K.F., Lewis, B.C., Hoffman, J., Mansell, J., 2009.** *Encephalitozoon cuniculi* infections in dogs: a case series. J Am Anim Hosp Assoc 45: 225–231.
- Snowden, K.F., Shadduck, J.A., 1999.** Microsporidia of higher vertebrates. In: Wittner M., Weiss L.M. (eds). The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington DC, pp. 393–419.
- Sompayrac, L.M., 2015.** How the immune system works, 5th edition. John Wiley & Sons Inc, United States, 168 s.
- Sprague, V., Vernick, S.H., 1971.** The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia, Nosematidae) and its taxonomic significance. J Protozool 18: 560–569.
- Stewart, C.G., Botha, W.S., 1989.** Canine encephalitozoonosis. Zimb Vet J 20: 89–93.
- Szeredi, L., Pospischil, A., Dencsö, L., Mathis, A., Dobos-Kovács, M., 2007.** A case of equine abortion caused by *Encephalitozoon* sp. Acta Vet Hung 55: 525–532.
- Šterzl J, 1993.** Imunitn, 1993onne abortion caused by J 20, 1. vyd. Praha: Česká imunologická společnost, 480 s.

- Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., Menotti, J., 2010.** Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol* 48: 2651–2653.
- Thurston-Enriquez, J.A., Watt, P., Dowd, S.E., Enriquez, R., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2002.** Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J Food Prot* 65: 378–382.
- Torres, C.M., 1927.** Sur une nouvelle maladie de l'homme, caractérisée par la présence d'un parasite intracellulaire, très proche du *Toxoplasme* et de l'encephalitozoon dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu sous-cutané et le tissu nerveux. *C R Soc Biol* 97: 1778–1779.
- Tyznik, A.J., Sun, J.C., Bevan, M.J., 2004.** The CD8 population in CD4-deficient mice is heavily contaminated with MHC class II-restricted T cells. *J Exp Med* 199: 559–565.
- Undeen, A.H., El Gazzar, L.M., Vander Meer, R.K., Narang, S., 1987.** Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of *Nosema algerae* (Microspora: Nosematidae). *J Invertebr Pathol* 50: 230–237.
- Undeen, A.H., van der Meer, R.K., 1999.** Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *J Invertebr Pathol* 73: 294–302.
- Valenčáková, A., Balent, P., Ravaszová, P., Horák, A., Oborník, M., Halanová, M., Malčėková, B., Novotný, F., Goldova, M., 2011.** Molecular identification and genotyping of Microsporidia in selected hosts. *Parasitol Res* 110: 689–693.
- Valenčáková, A., Halanová, M., 2012.** Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35: 1–7.
- van Dellen, A.F., Stewart, C.G., Botha, W.S., 1989.** Studies of encephalitozoonosis in vervet monkeys (*Cercopithecus pygerythrus*) orally inoculated with spores of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from dogs (*Canis familiaris*). *Onderstepoort J Vet Res* 56: 1–22.
- van Rensburg, I.B.J., du Plessis, J.L., 1971.** Nosematosis in a cat: a case report. *J S Afr Vet Med Assoc* 42: 327–331.

- van Rensburg I.B., Volkmann, D.H., Soley, J.T., Stewart, C.G., 1991.** *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. J S Afr Vet Assoc 62: 130–132.
- van Gool, T., Vetter, J.C., Weinmayr, B., Van Dam, A., Derouin, F., Dankert, J., 1997.** High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. J Infect Dis 175: 1020–1024.
- Vávra, J., 1963.** Spore projection in microsporidia. Acta Protozool 1: 153–155.
- Vávra, J., 1976.** Structure of microsporidia. In: Bulla Jr., L.A., Chen, T.C. (eds). Comparative Pathobiology, vol. 1. Biology of the microsporidia. New York: Plenum Press, 517 s.
- Vávra, J., 2005.** „Polar vesicles“ of microsporidia are mitochondrial remnants („mitosomes“)? Folia Parasitol 52: 193–195
- Vávra, J., Bedrník, P., Činatl, J., 1972.** Isolation and *in vitro* cultivation of the mammalian microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. Folia Parasitol 19: 349–354.
- Vávra, J., Larsson, J.I.R., 1999.** Structure of microsporidia. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (eds). The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington DC, 579 s.
- Vávra, J., Hyliš, M., Oborník, M., Vossbrinck C.R., 2005.** Microsporidia in aquatic microcrustacea: the copepod microsporidium *Marssoniella elegans* Lemmermann, 1900 revisited. Folia Parasitol 52: 163–172.
- Vávra, J., Lukeš, J., 2013.** Microsporidia and “the art of living together”. In: Rollinson, D. (ed). Advances in Parasitology, vol. 82. Academic Press, New York, 400 s.
- Verweij, J.J., Ten Hove, R., Brienen, E.A., van Lieshout, L., 2007.** Multiplex detection of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in fecal samples using real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis 57: 163–167.
- Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B.A., Woese, C.R., 1987.** Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. Nature 326: 411–414.

- Weber, R., Bryan, R.T., Owen, R.L., Wilcox, C.M., Gorelkin, L., Visvesvara, G.S., 1992.** Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Engl J Med* 326: 161–166.
- Weber, R., Deplazes, P., Schwartz, D., 2000.** Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib Microbiol* 6: 166–192.
- Webster, J.D., Miller, M.A., Vemulapalli, R., 2008.** *Encephalitozoon cuniculi*-associated placentitis and perinatal death in an Alpaca (*Lama pacos*). *Vet Pathol* 45: 255–258.
- Weidner, E., 1976.** Some aspects of microsporidian physiology. In: Bulla Jr., L.A., Chen, T.C. (eds). *Comparative Pathobiology*, vol. 1. Biology of the microsporidia. New York: Plenum Press, 517 s.
- Weiser, J., 1964.** On the taxonomic position of the genus *Encephalitozoon Levaditi*, Nicolau and Schoen, 1923 (Protozoa: Microsporidia). *Parasitology* 54: 749–751.
- Weiser, J., 1965.** Microsporidian infections of mammals and the genus *Encephalitozoon*. *Intern Congr Parasitol* 1: 445–446.
- Weiss, L.M., Vossbrinck, C.R., 1999.** Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In: Wittner, M., Weiss, L.M., (eds). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington DC, 579 s.
- Weiss, L.M., Edlind, T.D., Vossbrinck, C.R., Hashimoto, T., 1999.** Microsporidian molecular phylogeny: the fungal connection. *J Eukaryot Microbiol* 46: 17–18.
- Williams, B.A.P., Hirt, R.P., Lucocq, J.M., Embley, T.M., 2002.** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418: 865–869.
- Wilson, J.M., 1986.** Can *Encephalitozoon cuniculi* cross the placenta? *Research in Veterinary Science* 40: 138.
- Wittner, M., Weiss, L.M. (eds) 1999.** *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington DC, 579 s.

- 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. J Clin Microbiol 40: 3922–3928.
- Wright, J.H., Craighead, E.M., 1922.** Infectious motor paralysis in young rabbits. J Exp Med 36: 135–140.
- Xiao, L., Li, L., Visvesvara, G.S., Moura, H., Didier, E.S., Lal, A.A., 2001.** Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. J Clin Microbiol 39: 2248–2253.
- Zeman, D.H., Baskin, G.B., 1985.** Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). Vet Pathol 22: 24–31.