

UNIwersytet PRZYRODniczy w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Dyscyplina naukowa Weterynaria

Anna Wilczyńska

Rozprawa doktorska

Badania nad epidemiologią kunikulozy u wybranych gatunków zwierząt towarzyszących

Epidemiological study on encephalitozoonosis in selected species of companion animals

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Epizootiologii i Klinice Chorób Zakaźnych

Promotor: prof. dr hab. Łukasz Adaszek

Lublin, 2024

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej


Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 20.06.2024 Podpis promotora 

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data 20.06.2024 Podpis autora 

*niepotrzebne skreślić

Spis treści

Streszczenie i słowa kluczowe	4
Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim	5
1. Wstęp	6
1.1. Czynniki etiologiczne	6
1.2. Patomechanizm zakażenia	8
1.3. Przegląd najważniejszych gatunków <i>Encephalitozoonidae</i>	10
1.4. Występowanie <i>Encephalitozoon</i> spp. u zwierząt	14
1.5. Występowanie <i>Encephalitozoon</i> spp. u ludzi	18
2. Problem badawczy/hipoteza i cel badań	19
3. Materiały i metody	20
3.1. Zwierzęta użyte w badaniu	20
3.2. Ludzie objęci badaniem	26
3.3. Badania molekularne	28
3.3.1. Izolacja DNA	28
3.3.2. Startery do reakcji PCR	28
3.3.3. Warunki PCR	29
3.3.4. Elektroforeza	30
3.3.5. Przygotowanie produktu PCR do sekwencjonowania	30
3.3.6. Sekwencjonowanie	30
3.4. Wykrywanie przeciwciał swoistych dla <i>Encephalitozoon cuniculi</i> metodą ELISA	31
3.5. Analiza statystyczna	32
4. Omówienie wyników badań i dyskusja	33
4.1. Wyniki	33
4.1.1. Prevalencja zakażeń <i>E. cuniculi</i> u zwierząt vs objawy kliniczne	33
4.1.1.1. Krowy	35
4.1.1.2. Szczury	37
4.1.1.3. Chomiki	38
4.1.1.4. Szynszyle	39
4.1.1.5. Koszatniczki	39
4.1.1.6. Myszy	40
4.1.2. Prevalencja zakażeń <i>E. cuniculi</i> u ludzi	40
4.1.3. Wyniki badań molekularnych	51

4.1.4. Wyniki badań serologicznych w kierunku <i>E. cuniculi</i>	66
4.1.5. Analiza statystyczna wyników uzyskanych u zwierząt.....	68
4.1.6. Analiza statystyczna wyników uzyskanych u ludzi.....	70
4.2. Dyskusja	72
5. Stwierdzenia i wnioski.....	77
Stwierdzenia	77
Wnioski	78
6. Bibliografia.....	79

Streszczenie i słowa kluczowe

Encephalitozoon spp. to chorobotwórcze patogeny zaliczane do grzybów Microsporidia. Wytwarzają one spory, których przeżywalność w środowisku zewnętrznym jest długa. Liczne badania dowodzą że spory *Encephalitozoon spp.* są obecne w pożywieniu i utrzymują swoją żywotność nawet w żywności konserwowanej. Ich obecność stwierdzono także w wydzielinach i wydalinach wielu gatunków ssaków dzikich oraz udomowionych a także ptaków, gadów, płazów i ryb. Głównymi nosicielami grzyba są króliki, które popularnie utrzymywane są w domach jako zwierzęta towarzyszące. Około 70% osobników w populacji tych zwierząt jest nosicielami *Encephalitozoon cuniculi*. Należy podkreślić że wszystkie dotąd opisane genotypy drobnoustrojów są zdolne do zakażenia ludzi zarówno z defektami immunologicznymi, jak i immunokompetentnych. Tym samym wraz z rosnącą popularnością zwłaszcza gryzoni i królików jako zwierząt towarzyszących, wzrasta również ryzyko zakażenia tym patogenem ludzi. Do zakażenia może dojść drogą pokarmową, kropelkową a także drogą wertykalną poprzez łożysko. Objawy kliniczne encefalitozoonozy zarówno u zwierząt, jak i ludzi są nieswoiste. U zwierząt w przebiegu infekcji najczęściej notowane są problemy z drogami moczowymi, objawy neurologiczne, a także uszkodzenie narządu wzroku.

Zarówno w Polsce jak i na świecie nie prowadzono dotąd badań nad zakażeniami *E. cuniculi* u gryzoni utrzymywanych jako zwierzęta domowe. W poniższej pracy zostało przebadanych 157 gryzoni (kawie domowe, szczury, chomiki, szynszyle, myszy, koszatniczki) oraz 48 ludzi. Przeprowadzono diagnostykę serologiczną oraz molekularną zwierząt u których podejrzewano wystąpienie encefalitozoonozy oraz 28 osób które miały kontakt ze zwierzętami - potencjalnym źródłem zakażenia dla człowieka.

Celem badań było określenie jak szeroko *E. cuniculi* występuje w populacjach gryzoni, oraz określenie jak duże zagrożenie drobnoustroje te stwarzają dla zdrowia ludzi.

Wyniki badań wykazały, że: gatunkiem gryzoni najbardziej narażonym na wystąpienie kunikulozy są koszatniczki; gatunki rodzimych gryzoni utrzymywane jako zwierzęta towarzyszące najczęściej ulegają infekcji genotypem I *E. cuniculi*, natomiast kontakt ludzi z gryzoniami nie stanowi statystycznie istotnego czynnika ryzyka rozwoju encefalitozoonozy u ludzi.

Słowa kluczowe: *Encephalitozoon cuniculi*, gryzonie, PCR, zoonoza

Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim

Encephalitozoon spp. are pathogenic fungi classified in the genus Microsporidia. They produce spores that have a very long survival time in the environment. Numerous studies show that *Encephalitozoon* spores are present in food and remain viable even in canned foods. Their presence has been found in the secretions and excretions of many wild and domestic mammalian species as well as birds, reptiles, amphibians and fish. The main vectors of the fungus are companion animals that are commonly kept in home, mainly rabbits. In the rabbit population, it has been reported that about 70% of animals are carriers of *Encephalitozoon cuniculi*. It should be noted that all *E. cuniculi* genotypes described so far, are able to infect both immunocompetent and immunodeficient people. Thus, with the increasing popularity of rodents and rabbits as companion animals, the risk of infection with this pathogen in human is also increasing. The clinical signs of encephalitozoonosis in both animals and humans are non-specific. The most frequently observed disorders in animals are problems with urinary tract, neurological symptoms and visual impairment.

So far, no studies on *E. cuniculi* infections in companion animals have been conducted in Poland. In own study we examined a group of 157 animals (guinea pigs, rats, hamsters, chinchillas, mice, degus) and 48 people. Serological and molecular diagnostics were performed on animals suspected of having encephalitozoonosis and on 28 people who had contact with animals identified as a potential source of infection.

The aim of the study was to determine prevalence of *E. cuniculi* infection in these animal populations, and to determine the risk of the disease caused by these pathogens for people.

The research results showed that: degus are the rodent species which are most at risk of developing of encephalitozoonosis; species of native rodents kept as companion animals are most often infected with *E. cuniculi* genotype I, contact between people and rodents is not a statistically significant risk factor for the development of encephalitozoonosis in humans.

Keywords: *Encephalitozoon cuniculi*, rodents, PCR, zoonosis, encephalitozoonosis, zoonosis

1. Wstęp

1.1. Czynniki etiologiczne

Mikrosporydia to wewnątrzkomórkowe oportunistyczne patogeny występujące powszechnie w środowisku. Niegdyś uważane były za pierwotniaki, obecnie są zaliczane do królestwa grzybów, aczkolwiek niektórzy badacze sugerują, że powinny być one uznane za grupę siostrzaną grzybów [1, 2, 3] spokrewnioną z *Cryptomycota* [4, 5]. Wielkość ich genomu waha się między 2.18 a 51.35 Mbp-u *Encephalitozoonidae* jego rozmiar wynosi poniżej 3,0 Mb. Tym samym, są one najmniejszymi spośród organizmów eukariotycznych [6, 7, 8, 9, 10, 11].

Analiza chromosomów *E. cuniculi* [12,13] oraz badania nad heterogenicznością *loci* genów u *E. cuniculi* [14] i *Nematocida parisii* [15] wskazują, że niektóre mikrosporydia są diploidalne.

Mimo że mikrosporydia są zaliczane do organizmów eukariotycznych posiadają kilka swoistych cech które odróżniają je od pozostałych przedstawicieli tej grupy. Wielkości ich rybosomów jest jak u komórek prokariotycznych którym brakuje podjednostki 5.8S. Posiadają jednak wiele organelli i cech komórek eukariotycznych tj. siateczka wewnątrzplazmatyczna, aparat Golgiego, jądro z otoczką i mitochondrialne organelle reszkowe zwane mitosomem. *Encephalitozoon* spp. charakteryzuje obecność „rurki polarnej”, za pomocą której do wnętrza komórki gospodarza wprowadzana jest ich sporoplazma wraz z jądrem komórkowym.

Zarodniki mikrosporydiów są szeroko rozpowszechnione w środowisku i są w stanie zakażać wiele gatunków zwierząt. Zakażeni gospodarze wydalają je z kałem, moczem lub płwociną. Infekcja szerzy się drogą areogenną lub alimentarną [16, 17, 18, 19, 20, 21], a także drogą pionową. Zarodniki mają charakterystyczną budowę - ich kształt i wielkość zależą od gatunku patogenu.

Zarodniki *E. cuniculi* są odporne na czynniki środowiska zewnętrznego, co determinowane jest charakterystyczną budową ich ściany komórkowej utworzonej przez dwie warstwy: wewnętrzną chitynową oraz warstwę zewnętrzną wzbogaconą w białko [22]. W środowisku zewnętrznym, w temperaturze 22°C mogą przetrwać do 6 tygodni. [23], a w środowisku wodnym jeszcze dłużej. [24].

Li i in. [24] przeprowadzili badanie eksperymentalne, w którym oceniano zakaźność zarodników *E. cuniculi* pochodzących z hodowli *in vitro*.

Przechowywano je w wodzie, w różnych temperaturach i wykazano, że zarodniki utrzymywały zakaźność przez 3 miesiące, 2 miesiące, 1 miesiąc, 3 tygodnie i tylko 1 tydzień w temperaturze odpowiednio 10°C, 15°C, 20°C, 25°C i 30°C. Świadczyło to o tym, że zarodniki *E. cuniculi* tracą zakaźność szybciej niż innych gatunków mikrosporydiów, takich jak *Encephalitozoon hellem* i jelitowe szczepy *Encephalitozoon*. Zarodniki występują zarówno w wodzie słodkiej, jak i słonej. Są w stanie przeżyć 9 dni w buforze solnym.

Do organizmu człowieka zarodniki mikrosporydiów dostają się najprawdopodobniej z żywnością. Z przeprowadzonych badań wynika, że ich źródłem mogą być produkty rolne zanieczyszczone wodą do nawadniania upraw, które często są spożywane na surowo [25, 26].

Kolejnym źródłem infekcji może być mięso królika [28]. W Polsce dozwolone jest hodowla tych zwierząt oraz ubój na użytek własny poza terenem rzeźni.

Mikrosporydia mogą być także przenoszone na ludzi poprzez żywność przetworzoną, taką jak mleko [28], fermentowane produkty mięsne [29]. Kváč i in. [28] wykazali obecność *E. cuniculi* w mleku krowim, a zarodniki tego drobnoustroju pozostawały aktywne nawet po krótkotrwałym działaniu wysokiej temperatury (HTST) w procesie pasteryzacji (72°C przez 15 s lub 85°C przez 5 s) [28]. Sak i in. [29] sugerują, że fermentowane produkty wieprzowe mogą również stanowić dodatkowe źródło infekcji, gdyż proces fermentacji nie jest skuteczny w inaktywacji spor *Encephalitozoon*.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases zaliczył mikrosporydia do kategorii B Priority Pathogens. Oznacza to, że drobnoustroje te rozprzestrzeniają się w środowisku w sposób umiarkowanie łatwy oraz cechują się średnim wskaźnikiem chorobotwórczości. Agencja Ochrony Środowiska uznała je za organizmy wywołujące niebezpieczne zanieczyszczenie wody [16], które są przyczyną zakażeń u kręgowców i bezkręgowców [30]. W hodowli pszczoł i ryb drobnoustroje te mogą przyczyniać się do istotnych strat ekonomicznych (*Nosema apis* i *Nosema ceranae* są przyczyną zakażeń pszczoły miodnej, *Nosema bombycis* jedwabników [31], natomiast *Loma salmonae*, *Thelohania* spp ryb łososiowatych) [32, 33, 34, 35, 36]

Zarodniki największą wrażliwość wykazują na działanie promieni UV. Ich bezpośrednie działanie inaktywuje je już po 48h.

1.2. Patomechanizm zakażenia

Cykl życiowy mikrosporydiów można podzielić na trzy stadia: fazę infekcyjną (pozakomórkową), fazę proliferacyjną i fazę sporogonii (tworzenia zarodników) (Ryc. 1).

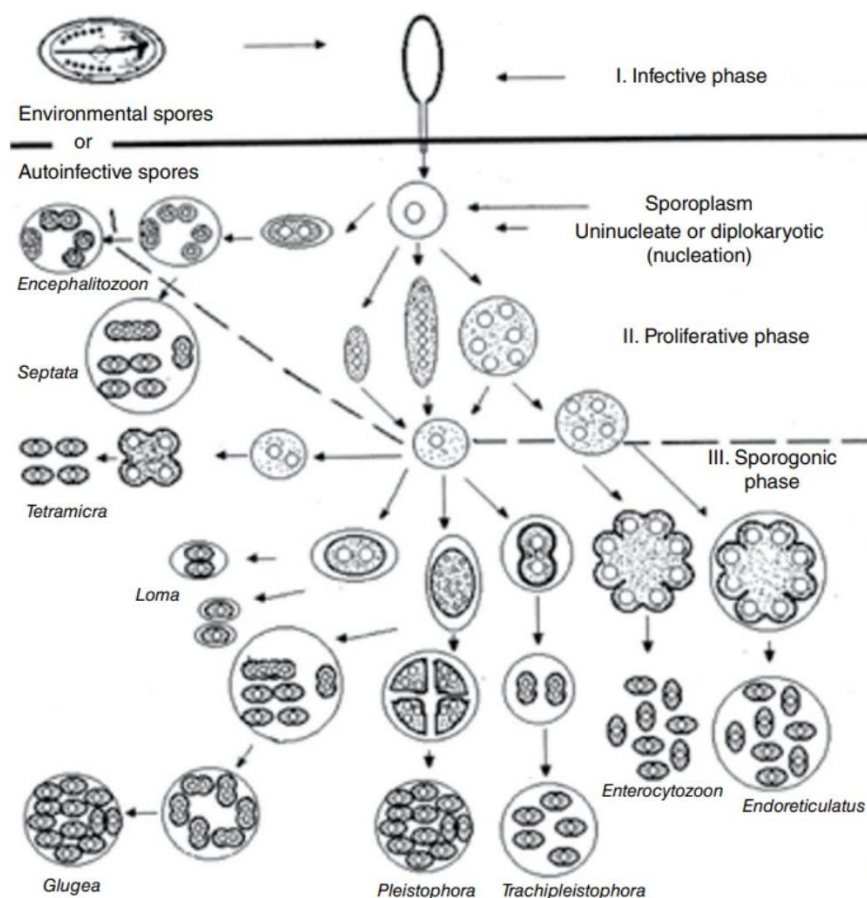
Wykazują one różne sposoby zakażenia komórek w zależności od rodzaju i gatunku [37,38]:

Typ I – kontakt bezpośredni - kontakt plazmolemmy mikrosporydium z cytoplazmą komórki gospodarza (*Enterocytozoon bieneusi*, *Anncaliia*, *Nosema*),

Typ II – kontakt pośredni przez izolację wywołaną przez żywiciela – polegającą na tym, że mikrosporydia znajdują się w pasożytniczej wakuoli - pojedynczej błonie utworzonej przez żywiciela. Wakuola pasożytnicza jest widoczna w fazie proliferacyjnej i sporogonii. (*Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Endoreticulatus* *Vittaforma*),

Typ III – kontakt pośredni poprzez izolacje (*Pleistophora*, *Vairimorpha*),

Typ IV – kontakt pośredni (*Glugea*, *Loma*, *Trachipleistophora*, *Encephalitozoon intestinalis*)



Ryc. 1 Schematyczne przedstawienie cykli życiowych różnych rodzajów mikrosporydiów.

Faza infekcyjna. Zarodniki to jedyne stadium, w którym mikrosporydia mogą przetrwać poza żywicielem. Po wnikięciu do organizmu gospodarza rozpoczyna się proces germinacji, czyli kiełkowania i sporoplazma jest transportowana do komórki gospodarza przez pustą rurkę polarną [39, 40]. Po przedostaniu się sporoplazmy do komórki, rozpoczyna się cykl namnażania, który kończy się produkcją dojrzałych zarodników. Następuje merogonia, podczas której rozwijają się meronty (stadium proliferacyjne). Większość mikrosporydiów rozwija się w cytoplazmie, niektóre w nukleoplazmie komórki gospodarza lub zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym [41, 42, 43, 44].

W fazie merogonii dochodzi do masowego namnażania się mikrosporydiów [45]. Pod koniec merogonii powstaje materiał o dużej gęstości elektronowej, tworzący się na zewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej merozoitu, co jest oznaką przejścia procesu rozwojowego z merogonii do sporogonii [46].

Faza sporogonii. Sporonty dają początek sporoblastom, które produkują dojrzałe zarodniki. U większości gatunków mikrosporydiów gęsty materiał na błonie komórkowej w fazie sporogonii staje się początkiem ścian zewnętrznych zarodników [47]. W sporoplazmie rozwinię się także rurka polarna i kompleks Golgiego sporoblastu [48, 49, 50].

Faza uwolnienia zarodników. Gdy komórka gospodarza zostanie wypełniona dojrzałymi zarodnikami - pęka, a dojrzałe zarodniki są uwalniane i kończy się cykl rozwojowy.

Uwolnione zarodniki, przedostają się do przestrzeni pozakomórkowej, wywołując zakażenie miejscowe w przebiegu którego dochodzi do zajęcia otaczających komórek. W dalszej kolejności zakażenie szerzy się za pośrednictwem układu krwionośnego [51]. Narządami docelowymi dla patogenów są te o dobrym ukrwieniu i wysokim przepływie krwi - głównie nerki, oczy i mózg, a także wątroba, płuca i serce [52]. Obecności mikrosporydiów w tkankach towarzyszy silny odczyn zapalny i powstawanie ziarniniaków.

Pomimo pobudzenia układu immunologicznego gospodarza, *Encephalitozoon* może uniknąć odpowiedzi immunologicznej na różne sposoby. Główny mechanizm obrony drobnoustrojów polega na wykorzystaniu procesu eferocytozy (ochrona przed fagocytozą). Patogen jest w stanie namnażać się wewnątrz makrofagów i modulować ich działanie, indukując produkcję przeciwwzapalnych cytokin, takich jak IL-6 i IL-10 [53, 54]. Brak białek markerowych w błonie wakuoli pasożyta pozwala mu pozostać niewykrytym wewnątrz komórek, unikając trawienia lizosomalnego [22].

1.3. Przegląd najważniejszych gatunków *Encephalitozoonidae*

Encephalitozoon cuniculi

Infekcje *Encephalitozoon cuniculi* po raz pierwszy opisano u królików laboratoryjnych w 1922 roku, natomiast u ludzi w 1959 r [55]. Obecnie choroba występuje powszechnie w populacji gryzoni i królików. Seroprewalencja *E. cuniculi* u królików domowych waha się w granicach od 7,7% [56] do 71% [57]. Spośród innych gatunków zwierząt zakażenia na ich tle stwierdzono u szczurów, myszy, piżmaków, świnek morskich, chomików, ryjówek, ptaków, koni, kóz, owiec, świń, lisów, psów, panter, kotów i naczelnych włącznie z człowiekiem [17, 51, 57, 58, 59, 60]. Na podstawie powtarzających się w genomie *E. cuniculi* regionów ITS (*internal transcribed spacer*) wyróżniono cztery ich chorobotwórcze szczepy patogenne dla różnych gatunków zwierząt:

szczep I wyizolowano od królika i myszy,

szczep II izolowany jest tylko od gryzoni,

szczep III uzyskano od psa,

szczep IV stwierdzono u ludzi, kotów i psów [60, 61, 62].

U zwierząt kunikuloza szerzy się drogą horyzontalną (fekalno-oralną, inhalacyjną) oraz drogą pionową przez łożysko. Zarodniki z chitynową otoczką są bardzo odporne na działanie czynników zewnętrznych i mogą utrzymywać się długi czas w środowisku. Króliki mogą wydalać je z moczem przez ok. 63 dni, począwszy od 21. dnia po zakażeniu. W pierwszym etapie inwazji (pierwsze 30 dni) *E. cuniculi* atakuje drogi oddechowe, płuca, wątrobę i śledzionę, następnie od 98 dnia po zakażeniu także serce, centralny układ nerwowy, nerki i oczy [63, 64, 65, 66]. Zaatakowane narządy objęte są stanem zapalnym, a na ich powierzchni mogą tworzyć się charakterystyczne ziarniniaki. Objawy neurologiczne związane z uszkodzeniem przez pasożyty aparatu przedsionkowego manifestują się kręcem szyi. Pojawiają się także ruchy maneżowe, kołowacizna, niedowłady, zez, oczopląs oraz drgawki. Niekiedy u chorych zwierząt obserwuje się nietrzymanie moczu, a także zapalenie błony naczyniowej oka i zaćmę, prowadzące do utraty wzroku [67]. Powrót do zdrowia chorych osobników uzależniony jest od stopnia uszkodzenia mózgu i nerek. Jeśli w przebiegu inwazji dochodzi do uszkodzenia nerek i rozwoju ich niewydolności, rokowanie

jest złe, co stanowi podstawę do eutanazji zwierząt [68]. Wszystkie dotąd opisane genotypy *E. cuniculi* są zdolne do zakażenia ludzi [17, 19, 20, 21, 69, 70, 71].

Rozpoznanie infekcji na podstawie morfologii zarodników ma bardzo niską czułość i swoistość oraz nie pozwala na różnicowanie *E. cuniculi* z innymi gatunkami *Encephalitozoonidae*. Obecnie diagnostyka zakażeń na tle tych drobnoustrojów opiera się na badaniach immunologicznych i/lub metodach molekularnych.

Najczęściej w przebiegu zakażenia u ludzi dochodzi do rozwoju zapalenia wątroby, zapalenia otrzewnej, zapalenia cewki moczowej, zapalenia gruczołu krokowego, zapalenia nerek, zapalenia rogówki i spojówek, zapalenia pęcherza. Należy jednak podkreślić, iż *E. cuniculi* u ludzi może powodować także zakażenia układu oddechowego oraz uogólnioną mikrosporydiozę [72]. Udokumentowane infekcje mikrosporydialne z zajęciem dróg oddechowych są rzadkie. Dotychczas wykazano je jedynie u pacjentów z obniżoną odpornością. Wśród biorców przeszczepów narządowych udokumentowano siedem takich przypadków [72, 73, 74, 75, 76, 77, 78]. Czterech z opisywanych pacjentów zmarło w wyniku niewydolności krążeniowo-oddechowej.

U 14,2% pacjentów z jatrogeną obniżoną odpornością wykazano obecność mikrosporydiów w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych, co sugeruje, że stany immunosupresji mogą predysponować do zajęcia przez omawiane patogeny układu oddechowego [51]. Bezpośrednio po wdychaniu zarodników może nastąpić infekcja dróg oddechowych lub też drobnoustroje mogą się tu przedostawać wraz z krwią po zakażeniu alimentarnym [79]. Rozpoznanie mikrosporydiozy układu oddechowego jest trudne. Objawy kliniczne są niespecyficzne i nie ma jasnego algorytmu postępowania diagnostycznego.

Zakażenia *E. cuniculi* u ludzi mogą lokalizować się także w innych obszarach ciała. Kicia i in. [18] wykryli obecność tych patogenów w okolicy protez stawu biodrowego u 39% pacjentów cierpiących na poluzowanie implantu, które wcześniej były klasyfikowane jako aseptyczne [72]. Kluczowym pytaniem było, czy infekcja zapoczątkowała osteolizę, czy też nastąpiła ona w wyniku odpowiedzi immunologicznej na aseptyczny proces destabilizacji implantu. *E. cuniculi* może przetrwać i replikować wewnątrz makrofagów i rozprzestrzeniać się w ten sposób po organizmie gospodarza [80]. Ponieważ poluzowanie implantu wiąże się z reakcją zapalną na biomateriały implantu [81] lub jony metali [82]. Takie warunki są odpowiedniego tego, by doszło do przedostania się makrofagów wraz *E. cuniculi* do tkanki okołoprotezowej [83].

Sak i in. [29] przebadali 49 osób po operacji stawów biodrowych i kolanowych z objawami zakażenia. U 5 wykryto mikrosporydia w tkance okołozabiegowej, a najczęściej wykrywanym genotypem *E. cuniculi* był szczep I.

Uogólnione infekcje *E. cuniculi* nie są zbyt często notowaną postacią encefalitozoonozy. Opisywano je u pacjentów po przeszczepach nerek oraz chorych na AIDS [76, 84, 85, 86, 87]. Niekiedy taka postać mikrosporydiozy może prowadzić do śmierci pacjenta. Mertens i in. [86] opisali przypadek pacjentki chorej na AIDS która zmarła z powodu uogólnionej infekcji *E. cuniculi*. Technika immunofluorescencji oraz PCR potwierdziło, iż czynnikiem chorobotwórczym był szczep III. Sekcją zwłok wykazano martwicę nadnerczy i nerek, a także w mniejszym stopniu mózgu, serca, tchawicy, pęcherza moczowego, śledziony oraz węzłów chłonnych. Był to pierwszy opisany przypadek mikrosporydiozy mózgu, serca i nadnerczy u pacjenta chorego na AIDS.

Kolejny ciekawy przypadek zakażenia *E. cuniculi* u człowieka opisali Ditrich i in. [58]. W następstwie zakażenia genotypem I patogenu, u pacjenta cierpiącego na cukrzycę doszło do formowania ropni w mózgu, konsekwencją czego był rozwój padaczki i porażen. W aspiracie z ropnia potwierdzono obecność mikrosporydiów, podobnie jak w kale i moczu. W tym przypadku leczenie przy pomocy albendazolu i mebendazolu, okazało się skuteczne.

Przedstawione powyżej opisy przypadków encefalitozoonozy u ludzi wskazują, wyraźnie na duży potencjał zoonotyczny *E. cuniculi*, oraz na fakt, że infekcje tymi grzybami mogą mieć bardzo zróżnicowany przebieg. W grupie ryzyka ich rozwoju znajdują się przede wszystkim pacjenci z immunosupresją. Podkreślić należy, iż badania nad odpornością w stosunku do mikrosporydiów u ludzi i zwierząt muszą być kontynuowane. Trudno jest bowiem na razie ustalić, czy w opisywanych przypadkach mieliśmy do czynienia z utajonymi zakażeniami, które uległy reaktywacji na skutek spadku odporności, czy też to stan immunosupresji był czynnikiem predylekcyjnym do nowo nabytych infekcji.

Encephalitozoon intestinalis

E. intestinalis jest drugim pod względem częstotliwości występowania gatunkiem mikrosporydiów zakażających człowieka. Według doniesień literaturowych infekcje na tle tego patogenu u pacjentów z HIV notowano na terenie obu Ameryk [88,89,90], Europy [91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100], Australii [88, 101, 102] oraz Afryki [102, 103, 104, 105]. Częstotliwość występowania *E. intestinalis* u pacjentów chorych na AIDS z objawami biegunki pochodzących ze Stanów Zjednoczonych wynosiła 7,3% [106],

2% u pacjentów z Niemiec [97], 3% z Zambii [105] i 0,9% ze Szwajcarii [19, 107]. *E. intestinalis* może przedostać się do dróg żółciowych i do pęcherzyka żółciowego, powodując ich zapalenie. W rzadkich przypadkach może również wywołać chorobę ogólnoustrojową.

E. intestinalis może atakować także zwierzęta hodowlane (świnie, bydło i kozy), towarzyszące (psy) i dzikie [91, 104, 108].

Encephalitozoon hellem

Głównym rezerwuarem *E. hellem* są ptaki. Obecność tych drobnoustrojów stwierdzono w populacji m in. gołębi, kaczek, łabędzi, gęsi, wron, żurawi, maskonurów i kolibrów [109, 110, 111, 112, 113]. U ptaków utrzymywanych w hodowlach *E. hellem* wykryto u przedstawicieli rzędu *Psittaciformes*, u strusi i zięb gouldian [1,110,114,115,116, 117, 118]. Zakażenia u zwierząt mają najczęściej przebieg bezobjawowy, z okresowym wydalaniem spor wraz z kałem [111]. W organizmie gospodarza *E. hellem* utrzymuje się głównie w wątrobie, jelitach i nerkach. Może lokalizować się także w oczach, płucach i śledzionie zakażonych ptaków [60, 111, 117, 118, 120, 121].

U ludzi, zakażenia *E. hellem* dotychczas zdiagnozowano jedynie u niewielkiej liczby osób zakażonych wirusem HIV. Większość przypadków rozpoznano w Stanach Zjednoczonych [122, 123, 124, 125, 126, 127, 128], a także u europejskich pacjentów z Włoch [129], Szwajcarii [130, 131, 132], Niemiec [131] i Wielkiej Brytanii [133] oraz w jednym przypadku w Afryce (Tanzania) [130].

Nie jest jasne, czy za stosunkowo niewiele doniesień dotyczących infekcji tymi drobnoustrojami drobnoustroju odpowiadają czynniki epidemiologiczne, czy też fakt, iż jest on rzadko rozpoznawany, co wynika ze stosunkowo trudnej jego identyfikacji. *E. hellem* powoduje zakażenia rozsiane i infekcje oczu u pacjentów zakażonych HIV. U ludzi, opisano także zakażenia dróg oddechowych [134]. *E. hellem* zidentyfikowano ponadto w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych u dwóch pacjentów seronegatywnych pod względem HIV natomiast zakażonych *Mycobacterium tuberculosis* [134] oraz w próbkach kału dwóch podróżnych z biegunką powracających z Singapuru, zakażonych *E. bienersi* [135]. We wszystkich tych przypadkach ostatecznej identyfikacji drobnoustrojów dokonano metodami biologii molekularnej (PCR i sekwencjonowanie) [19].

1.4. Występowanie *Encephalitozoon* spp. u zwierząt

Encephalitozoon cuniculi to patogen powszechnie występujący w populacji królików, aczkolwiek liczne dane literaturowe donoszą o jego chorobotwórczości także dla innych gatunków zwierząt. (Tabela 1). U królików prewalencja zakażeń tym patogenem może sięgać nawet 75%. Najczęściej dochodzi u nich do rozwoju postaci nerwowej, w przebiegu której obserwowane są objawy przedsionkowe – kręczy szyi, oczopląs, ataksja, rotacje w osi poziomej ciała, niedowład, drgawki wywołane ziarniniakowym zapaleniem mózgu. Przy infekcji zlokalizowanej w obrębie narządu wzroku na pierwszy plan wysuwa się zapalenie błony naczyniowej oka. Postać nerkowa obejmuje objawy takie jak częstomocz, polidypsja, brak apetytu, utrata masy ciała.

Wilczyńska i in. [136] opisali przypadki zakażeń *E. cuniculi* u 67 kawii domowych. Obserwowanymi objawami były zaburzenia ze strony: układu nerwowego - niezdolność ruchowa, niedowład kończyn miednicznych, oczopląs, otępienie oraz drgawki; układu moczowego - cysty w nerkach różnej wielkości oraz zatarcie budowy korowo rdzeniowej, częstomocz, krwimocz; narządu wzroku: zmętnienie rogówki, małowocze wrodzone; kostnienie heterotropowe.

Identyfikacji czynnika chorobotwórczego dokonano na podstawie wyników PCR. Przebieg choroby był ostry lub przewlekły, a objawy kliniczne różniły się w zależności od układu objętego infekcją (układ nerwowy, moczowy i narząd wzroku).

W populacji dzikich gryzoni z terenów Wielkiej Brytanii, Szwajcarii odpowiednio 4% i 9% osobników było zakażonych omawianymi drobnoustrojami. Zwierzęta te w dalszej kolejności mogą stanowić rezerwuar *E. cuniculi* dla lisów, nerek oraz kotów. Badania przeprowadzone w Polsce, Czechach i na Słowacji wskazały, że prewalencja infekcji *E. cuniculi* w populacji gryzoni kształtuje się na poziomie 15%.

Myszy są najczęściej bezobjawowymi nosicielami *E. cuniculi*. Badanie histopatologiczne narządów pozyskanych od zakażonych, bezobjawowych osobników wykazało obecność ogniskowych ziarniniaków zawierających zarodniki w tkankach tych zwierząt [137, 138, 139, 140]. Istnieje niewiele publikacji opisujących przypadki encefalitozoonozy u szczurów laboratoryjnych [141, 142], kawii domowych [143, 144] chomików [145]. Badania serologiczne przeprowadzone w latach 70 XX wieku wskazują iż prewalencja zakażeń w tych grupach zwierząt wynosi 80% u chomików, 30% u szczurów i 85% u kawii domowych [146, 147].

Na podstawie dostępnych opisów przypadków zakażeń można wysnuć wniosek że dla niektórych zwierząt infekcja *E. cucniuli* może być śmiertelna. Jednymi z nich są gatunki należące do podrodziny karczowników (*Arvicolinae*). U lemingów śnieżnych (*Dicrostonyx torquatus*) zakażeniu towarzyszą objawy neurologiczne takie jak kręczy szyi i paraliż. W badaniu histopatologicznym obserwowane jest ziarniniakowe zapalenie mózgu [148].

Hofmanova i in. [149] opisali przypadki encefalitozoonozy w domowej hodowli piestruszki stepowej *Lagurus lagurus*. Objawy kliniczne choroby pojawiały się 24 - 48h przed śmiercią. Należały do nich nagła utrata masy ciała, agresja i skłonności do kanibalizmu, ropne zapalenie spojówek i niedowład kończyn miednicznych. W ciągu 3 miesięcy w hodowli zmarło lub poddano eutanazji 15 lemingów. Badanie padłych zwierząt wykazało, iż we wszystkich przypadkach za zakażenie odpowiedzialny był genotyp III. Nie zidentyfikowano niestety źródła infekcji.

U piżmaków *Ondatra zibethicus* zakażonych omawianymi patogenami odnotowano pojedynczy przypadek obecności ziarniaków w obrębie mózgu bez towarzyszących objawów klinicznych [150].

W populacji norników zwyczajnych *Microtus arvalis* obecność *E. cuniculi* metodami molekularnymi potwierdzono u 6% zwierząt, natomiast w populacji norników wodnych *Arvicola terrestris* u 7%. W populacji dzikich myszy odsetek ten wynosił 15,05% (*Apodemus sylvaticus*), a u myszy domowych (*Mus musculus*) 8.5%.

W Niemczech przebadano myszy z 5 sklepów zoologicznych i wykazano że średnio 10,7% z nich było nosicielami *E.cuniculi* [152].

W populacji kotów swoiste przeciwciała dla *E. cuniculi* stwierdzano u 6,1% do 26,6% osobników (Tabela 1). U kotów u których wystąpiły zaćma lub urazy rogówki badaniem filmu łożowego za pomocą PCR obecność DNA tych patogenów wykazano w 19 na 22 przebadane próbki.

W populacji psów prewalencja zakażeń waha się w zakresie 18% do 37,8%. W dwóch miotach szczeniąt opisano zespół zapalenia nerek i mózgu na tle *E. cuniculi*. [153]. Badanie retrospektywne, preparatów histopatologicznych narządów wewnętrznych pozyskanych od 19 psów z podobnymi objawami wykazały, że w ich przypadkach przyczyną upadków mogła być także encefalitozoonoza, a genotypem odpowiedzialnym za rozwój choroby był genotyp III. U chorych zwierząt obserwowano objawy: apatii, braku apetytu, zaburzenia nerwowe [154, 155, 156].

Wśród zwierząt gospodarskich świń, owiec oraz bydła prewalencja zakażeń wynosi od 9% do 36%. Stanowią one potencjalne źródło mikrosporydiów dla ludzi. W związku z tym monitoring encefalitozoonozy w ich populacjach powinien być stale prowadzony. Warto podkreślić, że produkty pochodzenia zwierzęcego nawet po obróbce technologicznej żywności w dalszym ciągu mogą zawierać zarodniki drobnoustrojów.

Metoda badawcza	Ilość przebadanych próbek	Wyniki pozytywne	Prewalencja (%)	Pochodzenie zwierząt	Kraj	Publikacja
KRÓLIKI						
ELISA	500	319	63.8	zwierzęta domowe	Czechy	Jeklova et al. (2010) [157]
IFA	71	42	59.2	zwierzęta domowe	Austria	Csokai et al. (2009) [67]
IFA	224	158	70.5	zwierzęta domowe	Austria	Kunzel et al. (2008) [158]
ELISA/CIA	1500	505	31.6	farmy	Włochy	Santaniello et al. (2009) [159]
ELISA	125	49	39.2	zwierzęta domowe	Anglia	Harcourt-Brown and Holloway (2003) [160]
ELISA/CIA	171	116	67.8	zwierzęta domowe	Taiwan	Tee et al. (2011) [161]
PSY						
IFA	193	73	37.8	nieznane	Słowacja	Halanova et al. (2003) [162]
ELISA	472	103	21.8	nieznane	Japonia	Sasaki et al. (2011) [163]
DAT	113	31	27.4	bezpieński	Brazylia	Lindsay et al. (2009) [164]
DAT	254	47	18.5	bezpieński	Kolumbia	Lindsay et al. (2009) [164]
PCR	100	18	18	Klinika weterynaryjna	Iran	Jamshidi et al. (2012) [165]
KOTY						
IFA	232	15	6.4	Klinika weterynaryjna	USA	Hsu et al. 2011 [166]
ELISA	295	18	6.1	zwierzęta domowe	USA	TSUKADA 2016 [167]
ELISA	127	34	26.8	zwierzęta domowe	USA	Kourgelis 2017 [168]
ELISA	72	17	23.6	nieznane	Słowacja	Halanova et al. (2003) [162]
ŚWINIE						
PCR	34	3	9	nieznane	Niemcy	Reetz et al. (2009) [170]
BYDŁO						
IFA	55	20	36	nieznane	Słowacja	Halanova et al. (1999) [169]
OWCE						
ELISA	59	8	13.6	nieznane	Słowacja	Halanova et al. (2003) [162]

Tabela 1. Prewalencja zakażeń *Encephalitozoon cuniculi* u różnych gatunków zwierząt.

1.5. Występowanie *Encephalitozoon* spp. u ludzi

Obecnie znanych jest 17 gatunków *Encephalitozoonidae* zdolnych do zakażenia ludzi. Największa chorobotwórczość cechuje 4 gatunki - *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi* oraz *Encephalitozoon hellem* i *Enterocytozoon bieneusi* [91].

Do osób w największym stopniu narażonych na zakażenie należą pacjenci z obniżoną odpornością np. po przeszczepach narządów, cierpiących na zakażenia wirusowe (HIV) oraz poddawani terapii immunosupresyjnej [78, 171, 172, 173, 174, 175] oraz właściciele zwierząt takich jak króliki, psy, koty czy gryzonie, które mogą być nosicielami mikrosporydiów, wydalającymi ich spory wraz z kałem i moczem.

U ludzi zakażonych *Encephalitozoon* spp. we wczesnym okresie infekcja przebiega z biegunką i utratą masy ciała. W późniejszym czasie mogą rozwinąć się: zapalenie rogówki, zapalenie układu moczowego, zapalenie wątroby, zapalenie mózgu, zapalenie otrzewnej, zapalenie gruczołu krokowego, zapalenie zatok, zapalenie płuc, zapalenie błony śluzowej nosa, zapalenie cewki moczowej, zapalenie dróg żółciowych [19].

Wiadomo, że w leczeniu mikrosporydiozy u ludzi największą skuteczność wykazują albendazol i fumagilina [88, 176]. Albendazol jest lekiem z wyboru w leczeniu mikrosporydiozy jelitowej, oddechowej i rozsianej wywołanej przez *Encephalitozoon* spp. [88]. Fumagillina jest wysoce skuteczna w zwalczaniu mikrosporydiów, ale wykazuje toksyczność i może powodować trombocytopenię, neutropenię i hiperlipidemię, gdy jest podawana ogólnoustrojowo [179]. Opisywano także aseptyczne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu po leczeniu fumagilliną u pacjenta, u którego leczenie albendazolem okazało się nieskuteczne [177]. Ponadto zarówno albendazol, jak i fumagillina mogą nie być w pełni skuteczne i nie eliminować patogenów, zwłaszcza u pacjentów z silną immunosupresją, co skutkuje utrzymywaniem się patogenu w ich organizmie i może prowadzić do nawrotu objawów po zakończeniu leczenia [88, 178, 179].

Ponieważ kliniczna manifestacja zakażenia w wielu przypadkach jest związana ze stanem odporności gospodarza, przywrócenie prawidłowej czynności układu immunologicznego może skutkować ustąpieniem objawów mikrosporydiozy i eliminacją patogenu bez konieczności wdrażania bardziej specyficznego leczenia. Taką „odnowę immunologiczną” można osiągnąć w wyniku stosowania wysoce aktywnej terapii przeciwretrowirusowej (HAART) u pacjentów z AIDS [180] lub zmniejszenia dawki, lub czasowego odstawienia leku immunosupresyjnego w przypadku pacjentów z obniżoną odpornością polekową [181, 182].

2. Problem badawczy/hipoteza i cel badań

Problemowi encefalitozoonozy poświęca się stosunkowo niewiele uwagi zarówno w medycynie weterynaryjnej, jak i medycynie człowieka. Natomiast doniesienia literaturowe wskazują, iż choroba ma szeroki potencjał epizootyczny i jest zoonozą. Celami badań były:

1. Przeprowadzenie oceny sytuacji epizootycznej oraz seroprewalencji choroby w populacji wybranych gryzoni oraz określenie czy mogą one stanowić rezerwuuar patogenu dla ludzi
2. Przeprowadzenie analizy molekularnej genu ITS *E. cuniculi*, pozwalającej na dokładną identyfikację szczepów pasożytów izolowanych od gryzoni i ludzi z terenów Polski

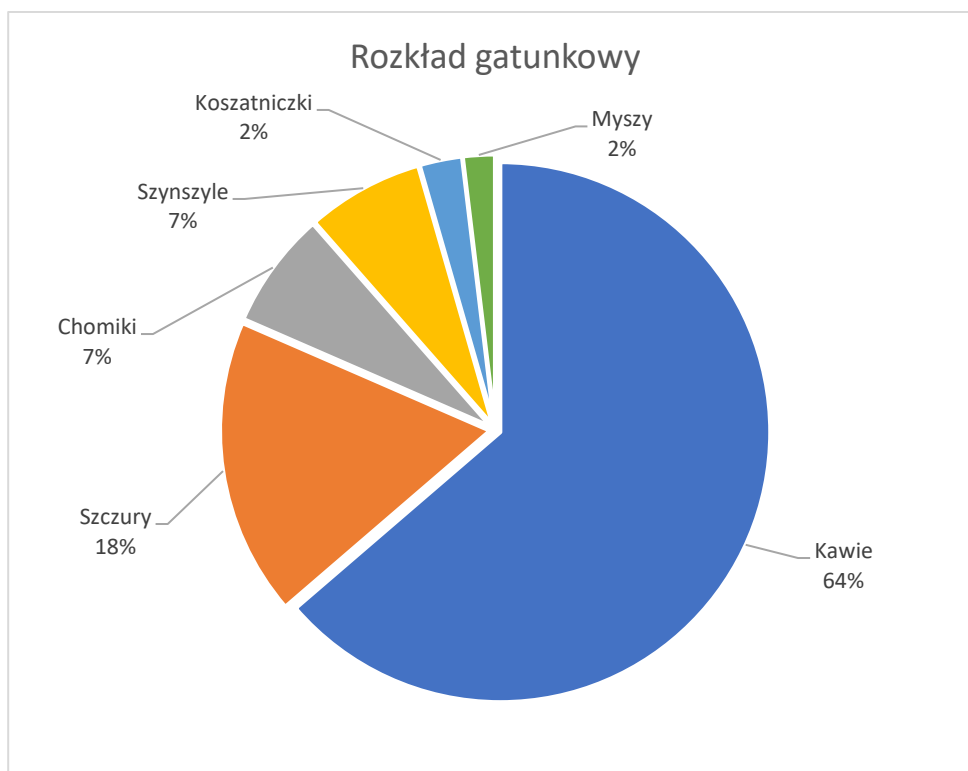
Hipotezy badawcze:

1. *Encephalitozoon cuniculi* może wywoływać zakażenia u gryzoni. Z łatwością przenosi się na inne gatunki zwierząt towarzyszących oraz na człowieka. Badania mają na celu określenie przebiegu klinicznego encefalitozoonozy u gryzoni domowych oraz ustalenie, czy posiadanie gryzoni stanowi ryzyko rozwoju choroby u ludzi.
2. Domniemuje się, że czynnikiem etiologicznym choroby u gryzoni domowych jest inny szczep *Encephalitozoon cuniculi*, aniżeli izolowany od królików. Aby to potwierdzić konieczne jest przeprowadzenie analizy molekularnej szczepów *E. cuniculi* izolowanych od tej grupy zwierząt, w tym kawii domowych

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta użyte w badaniu

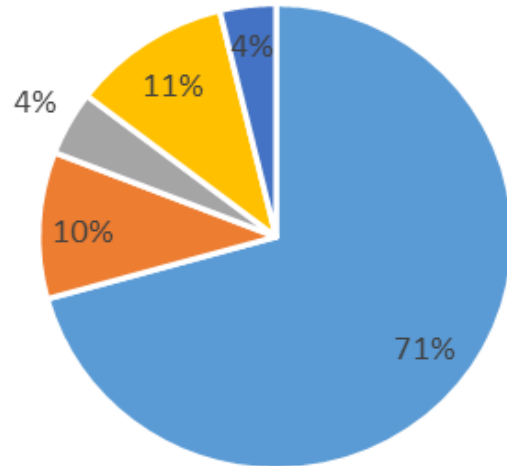
Badania przeprowadzono na 157 gryzoniach (kawiach domowych (n=100), szynszylach (n=11), szczurach (n=28), koszatniczkach (n=4), chomikach (n=11) i myszach (n=3)) (wykres 1), w wieku od 6 tygodni do 10 lat, spośród których samce stanowiły 70 osobników, zaś samice 87. Zwierzęta były pacjentami Oddziału Drobnych Ssaków przy Klinice Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie. Zgłaszano je do Kliniki z różnymi problemami, a także w celach profilaktycznych (Tabela 2). Pochodziły z różnych źródeł: sklepy zoologiczne (n=111), hodowle (n=6), adopcje (n=16), interwencje (n=7) oraz bliżej nieokreślone (n=17) (Wykres 2, Tabela 2). Od wszystkich zwierząt pobierano krew do badań molekularnych oraz serologicznych. Proces diagnostyczny, któremu poddawano zwierzęta wykorzystanie w badaniach przedstawiono na Rycinie 2.



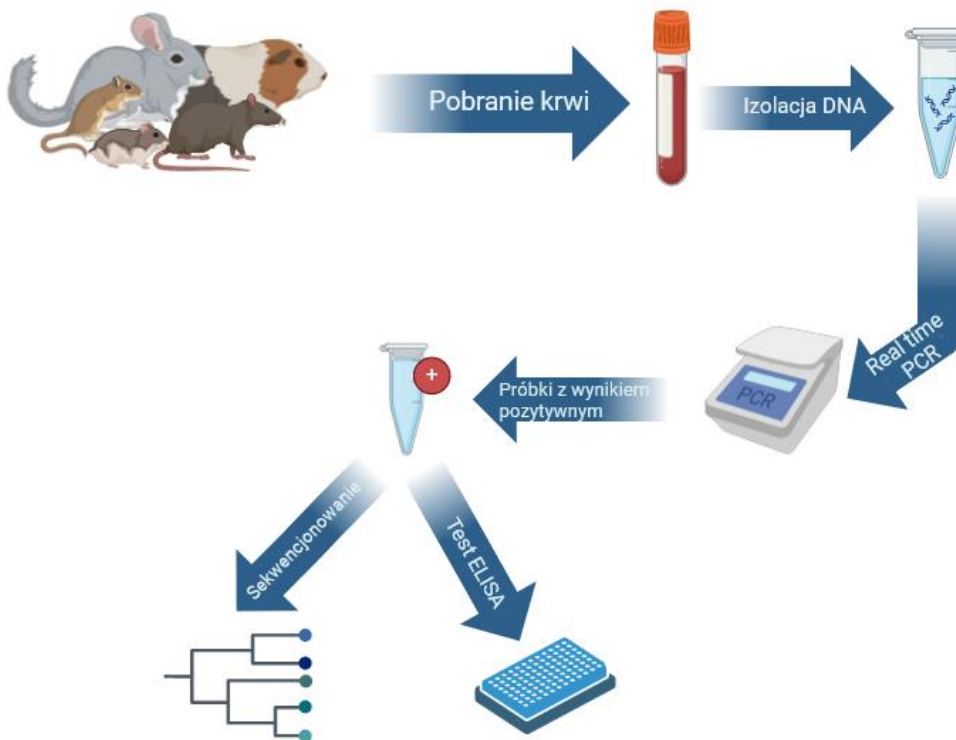
Wykres 1. Procentowy udział poszczególnych gatunków gryzoni objętych badaniem.

Pochodzenie

■ sklep ■ adopcja ■ interwencja ■ nieznane ■ hodowla



Wykres 2. Pochodzenie zwierząt użytych w badaniach.



Ryc. 2 Schemat przedstawiający etapy badania w kierunku encefalitozoonozy.

Lp.	Gatunek	Wiek	Płeć	Pochodzenie
1	Kawia domowa	1 rok	samica	sklep zoologiczny
2	Kawia domowa	2 lata	samica	sklep zoologiczny
3	Kawia domowa	2 lata	samiec	sklep zoologiczny
4	Kawia domowa	2 lata	samiec	sklep zoologiczny
5	Kawia domowa	3 lata	samica	sklep zoologiczny
6	Kawia domowa	3 lata	samica	sklep zoologiczny
7	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
8	Kawia domowa	2 lata	samiec	sklep zoologiczny
9	Kawia domowa	5 lat	samica	sklep zoologiczny
10	Kawia domowa	3 lata	samiec	sklep zoologiczny
11	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
12	Kawia domowa	5 lat	samiec	sklep zoologiczny
13	Kawia domowa	5 lat	samiec	sklep zoologiczny
14	Kawia domowa	7 lat	samica	sklep zoologiczny
15	Kawia domowa	5 lat	samica	sklep zoologiczny
16	Kawia domowa	6 lat	samiec	sklep zoologiczny
17	Kawia domowa	2 lata	samiec	sklep zoologiczny
18	Kawia domowa	2 lata	samica	sklep zoologiczny
19	Kawia domowa	2,5 roku	samiec	sklep zoologiczny
20	Kawia domowa	2 lata	samica	sklep zoologiczny
21	Kawia domowa	3 lata	samica	sklep zoologiczny
22	Kawia domowa	4 lata	samica	sklep zoologiczny
23	Kawia domowa	6 lat	samica	adopcja
24	Kawia domowa	5 lat	samiec	sklep zoologiczny
25	Kawia domowa	4 lata	samica	sklep zoologiczny
26	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
27	Kawia domowa	2 lata	samica	hodowla
28	Kawia domowa	3 lata	samica	adopcja
29	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
30	Kawia domowa	1 rok	samica	sklep zoologiczny
31	Kawia domowa	2 lata	samiec	sklep zoologiczny
32	Kawia domowa	1 rok	samica	sklep zoologiczny
33	Kawia domowa	6 lat	samica	sklep zoologiczny
34	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
35	Kawia domowa	6 lat	samica	sklep zoologiczny
36	Kawia domowa	5 lat	samiec	sklep zoologiczny
37	Kawia domowa	1,5 roku	samica	sklep zoologiczny
38	Szynszyla	1 rok	samiec	sklep zoologiczny
39	Szynszyla	1 rok	samiec	hodowla
40	Kawia domowa	4 lata	samica	sklep zoologiczny
41	Kawia domowa	2,5 roku	samica	interwencja
42	Kawia domowa	2,5 roku	samica	interwencja
43	Kawia domowa	2 lata	samiec	nieznane
44	Kawia domowa	2 lata	samica	nieznane
45	Szynszyla	4 lata	samica	sklep zoologiczny
46	Kawia domowa	3 lata	samica	sklep zoologiczny
47	Kawia domowa	5 lat	samica	sklep zoologiczny
48	Kawia domowa	3 lata	samica	sklep zoologiczny
49	Kawia domowa	3 lata	samiec	sklep zoologiczny
50	Kawia domowa	3 lata	samica	sklep zoologiczny
51	Kawia domowa	6 miesięcy	samiec	interwencja
52	Kawia domowa	4 miesięcy	samica	interwencja

53	Kawia domowa	6 miesięcy	samiec	interwencja
54	Kawia domowa	6 miesięcy	samica	interwencja
55	Szynszyla	1 rok	samiec	sklep zoologiczny
56	Szynszyla	1 rok	samiec	sklep zoologiczny
57	Kawia domowa	1 rok	samiec	nieznane
58	Kawia domowa	2 lata	samica	nieznane
59	Kawia domowa	6 lat	samiec	sklep zoologiczny
60	Kozatniczka	2 lata	samica	sklep zoologiczny
61	Kozatniczka	3 lata	samica	sklep zoologiczny
62	Kozatniczka	6 lat	samica	sklep zoologiczny
63	Kawia domowa	6 lat	samiec	sklep zoologiczny
64	Szczur	2,5 roku	samiec	adopcja
65	Szczur	2 lata	samica	adopcja
66	Szynszyla	1,5 roku	samica	sklep zoologiczny
67	Kawia domowa	4 lata	samica	sklep zoologiczny
68	Kawia domowa	5 lat	samiec	sklep zoologiczny
69	Kawia domowa	2 lata	samica	sklep zoologiczny
70	Kawia domowa	1 rok	samiec	sklep zoologiczny
71	Szynszyla	1,5 roku	samica	sklep zoologiczny
72	Kawia domowa	1,5 roku	samica	nieznane
73	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
74	Kawia domowa	4 lata	samica	sklep zoologiczny
75	Kawia domowa	5 lat	samica	sklep zoologiczny
76	Kawia domowa	3 lata	samica	nieznane
77	Kawia domowa	3 lata	samica	nieznane
78	Kawia domowa	5 lat	samica	nieznane
79	Kawia domowa	4 lata	samica	sklep zoologiczny
80	Kawia domowa	3 lata	samiec	sklep zoologiczny
81	Kawia domowa	5 lat	samica	sklep zoologiczny
82	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
83	Kawia domowa	6 tygodni	samiec	nieznane
84	Kawia domowa	6 tygodni	samiec	nieznane
85	Kawia domowa	4 lata	samiec	nieznane
86	Kawia domowa	8 lat	samica	sklep zoologiczny
87	Szynszyla	1,5 roku	samica	hodowla
88	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
89	Kawia domowa	2 lata	samica	nieznane
90	Kawia domowa	2 lata	samiec	sklep zoologiczny
91	Chomik	2,5 roku	samiec	interwencja
92	Kawia domowa	5 lat	samica	sklep zoologiczny
93	Kawia domowa	1 rok	samiec	adopcja
94	Kawia domowa	5 lat	samica	sklep zoologiczny
95	Szczur	1,5 roku	samiec	sklep zoologiczny
96	Szynszyla	1 rok	samiec	hodowla
97	Chomik	1 rok	samica	sklep zoologiczny
98	Mysz	2 lata	samica	hodowla
99	Mysz	2 lata	samica	sklep zoologiczny
100	Szczur	2,5 roku	samiec	sklep zoologiczny
101	Chomik	1,5 roku	samiec	sklep zoologiczny
102	Kawia domowa	1 rok	samica	sklep zoologiczny
103	Szczur	2 lata	samica	adopcja
104	Chomik	1,5 roku	samica	sklep zoologiczny
105	Szczur	2 lata	samiec	sklep zoologiczny

106	Szczur	2,5 roku	samica	sklep zoologiczny
107	Szczur	2 lata	samica	sklep zoologiczny
108	Koszatniczka	2 lata	samica	sklep zoologiczny
109	Szczur	1,5 roku	samica	sklep zoologiczny
110	Chomik	6 miesięcy	samica	sklep zoologiczny
111	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
112	Kawia domowa	5 lat	samiec	sklep zoologiczny
113	Szczur	2 lata	samica	sklep zoologiczny
114	Szczur	1,5 roku	samiec	sklep zoologiczny
115	Szynszyla	2 lata	samiec	hodowla
116	Kawia domowa	2 lata	samica	sklep zoologiczny
117	Szczur	2,5 roku	samica	sklep zoologiczny
118	Kawia domowa	7 lat	samiec	sklep zoologiczny
119	Kawia domowa	5 lat	samiec	sklep zoologiczny
120	Szczur	2 lata	samica	sklep zoologiczny
121	Szczur	1,5 roku	samiec	adopcja
122	Szczur	2 lata	samica	adopcja
123	Szczur	1 rok	samica	adopcja
124	Kawia domowa	1 rok	samiec	sklep zoologiczny
125	Kawia domowa	3 lata	samica	adopcja
126	Szczur	1,5 roku	samiec	sklep zoologiczny
127	Szynszyla	10 lat	samica	nieznane
128	Szczur	1,5 roku	samiec	sklep zoologiczny
129	Kawia domowa	4 lata	samica	sklep zoologiczny
130	Kawia domowa	5 lat	samiec	sklep zoologiczny
131	Chomik	2 lata	samiec	adopcja
132	Szczur	2 lata	samica	adopcja
133	Kawia domowa	5 lat	samiec	adopcja
134	Mysz	1 rok	samica	sklep zoologiczny
135	Chomik	1,5 roku	samica	sklep zoologiczny
136	Chomik	2 lata	samica	sklep zoologiczny
137	Chomik	2,5 roku	samiec	adopcja
138	Kawia domowa	1 rok	samica	sklep zoologiczny
139	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
140	Kawia domowa	3 lata	samica	sklep zoologiczny
141	Szczur	1,5 roku	samica	nieznane
142	Szczur	1 rok	samiec	sklep zoologiczny
143	Szczur	2 lata	samica	sklep zoologiczny
144	Szczur	2,5 roku	samiec	nieznane
145	Szczur	2 lata	samica	sklep zoologiczny
146	Szczur	1,5 roku	samica	sklep zoologiczny
147	Szczur	2 lata	samiec	nieznane
148	Szczur	2 lata	samiec	nieznane
149	Kawia domowa	3 lata	samiec	sklep zoologiczny
150	Chomik	2 lata	samiec	adopcja
151	Chomik	2,5 roku	samiec	adopcja
152	Kawia domowa	3 lata	samica	sklep zoologiczny
153	Kawia domowa	4 lata	samica	sklep zoologiczny
154	Szczur	2 lata	samiec	sklep zoologiczny
155	Kawia domowa	4 lata	samiec	sklep zoologiczny
156	Kawia domowa	3 lata	samica	sklep zoologiczny
157	Kawia domowa	2 lata	samica	sklep zoologiczny

Tabela 2. Zestawienie zwierząt wykorzystanych w badaniu.

Najczęstszymi powodami zgłoszenia zwierząt objętych badaniami do kliniki były:

1. problemy ze strony układu wydalniczego: przewlekła niewydolność nerek, zapalenie pęcherza moczowego, nadmiernie gromadzący się osad w pęcherzu moczowym, któremu towarzyszyło zapalenie, kamica moczowa.
2. problemy ze strony układu nerwowego: kręcz szyi (*torticolis*), oczopląs, otępienie, drgawki, niezdolność ruchowa.
3. problemy okulistyczne: zmętnienie rogówki (wykluczono by było ono efektem urazu lub obecnością blizny pourazowej), zaćma, małowocze, kostnienie heterotropowe.
4. problemy z funkcjonowaniem gruczołu tarczowego - niedoczynność/nadczynność tarczycy.
5. problemy ze strony układu pokarmowego: wzdęcia, zaburzenia perystaltyki, biegunki, problemy stomatologiczne.
6. problemy w układzie ruchu: zwyrodnienia stawów kończyn, zwyrodnienia kręgosłupa, *pododermatitis*.
7. problemy ze strony układu oddechowego: zapalenie górnych dróg oddechowych, zapalenia oskrzeli, mykoplazmowe zapalenie płuc.
8. zwierzęta zdrowe poddawane zabiegom profilaktycznym (Tabela 3).

Układy objęte procesem chorobowym – przyczyny konsultacji lekarsko-weterynaryjnych	Liczba zwierząt
KAWIE DOMOWE	
Układ nerwowy	21
Układ moczowy	29
Układ wzroku	14
Układ pokarmowy	7
Układ oddechowy	4
Tarczycza	11
Inne	12
Zdrowe (wizyty profilaktyczne)	35
SZCZURY	
Układ nerwowy	7
Układ moczowy	1
Inne	17
Zdrowe (wizyty profilaktyczne)	3
CHOMIKI	
Układ nerwowy	1

Układ moczowy	2
Inne	8
SZYNSZYLE	
Układ nerwowy	2
Układ moczowy	1
Układ wzroku	1
Inne	2
Zdrowe (wizyty profilaktyczne)	6
KOSZATNICZKI	
Zdrowe (wizyty profilaktyczne)	3
Układ pokarmowy	1
MYSZY	
Układ pokarmowy	1
Inne	2

Tabela 3. Przyczyny zgłaszania zwierząt objętych badaniami do kliniki.

3.2. Ludzie objęci badaniem

Badaniami objęto również 28 ludzi (grupa 1), którzy zawodowo lub prywatnie mieli kontakt z królikami/gryzonami od minimum 2 lat (2 do 20 lat) oraz 20 osób niemających takiego kontaktu, formujących grupę kontrolną. Grupę pierwszą tworzyli: lekarze weterynarii (n=21), technicy weterynarii (n=1), studenci (n=1) (pracujący w zakładach leczniczych o profilu ogólnym (n=5) oraz w placówkach specjalizujących się wyłącznie w leczeniu zwierząt egzotycznych i drobnych ssaków (n=15)) oraz właściciele gryzoni (n=5). Każda z osób objętych badaniem, została poproszona o określenie jak często ma styczność ze zwierzętami chorymi (Tabela 4) i czy występują u nich jakiegokolwiek objawy chorobowe. U wszystkich osób zarówno grupy 1, jak i 2 wykonano badanie hematologiczne i biochemiczne. Badania te wykonywano w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Jednostka ta uzyskała zgodę odpowiedniej Komisji Etycznej na pobieranie i przeprowadzenie analizy krwi. Próbkę krwi podano także badaniu molekularnemu i serologicznemu w kierunku encefalitozoonozy.

Lp	Powiązanie	Staż pracy (lata)	Rodzaj placówki	Częstość kontaktu z nosicielami E.C zwierzętami	Częstość kontaktu z chorymi na E.C zwierzętami
Grupa 1					
1	ZLZ	8	LW	CZĘSTO	CZĘSTO
2	-	2	W	BARDZO CZĘSTO	UMIARKOWANIE
3	PS	6	TW	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
4	PS	20	LW	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
5	-	5	W	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
6	ZLZ	10	LW	UMIARKOWANIE	UMIARKOWANIE
7	ZLZ	10	LW	UMIARKOWANIE	UMIARKOWANIE
8	PS	11	LW	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
9	PS	2	SW	BARDZO CZĘSTO	UMIARKOWANIE
10	PS	4	LW	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO
11	ZLZ	10	LW	UMIARKOWANIE	NIE
12	PS	9	LW	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
13	PS	6	LW	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
14	-	4	W	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
15	PS	5	LW	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
16	PS	10	LW	CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
17	PS	10	LW	UMIARKOWANIE	UMIARKOWANIE
18	PS	10	LW	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
19	ZLZ	4	LW	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO
20	PS	6	LW	UMIARKOWANIE	UMIARKOWANIE
21	ZLZ	4	LW	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO
22	PS	8	LW	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO
23	PS	5	LW	BARDZO CZĘSTO	UMIARKOWANIE
24	PS	4	LW	BARDZO CZĘSTO	UMIARKOWANIE
25	ZLZ	8	LW	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO
26	ZLZ	3	LW	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO
27	-	2	W	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO
28	-	2	W	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO

Tabela 4. Zestawienie osób które wzięły udział w badaniu. (PS) placówki specjalistyczne zajmujące się zwierzętami egzotycznymi w tym głównie drobnymi ssakami i (ZLZ) zakłady lecznicze dla zwierząt o praktyce mieszanej. (LW) lekarz weterynarii, (TW) technik weterynarii, (ST) student weterynarii, (W) właściciel. Bardzo często – ponad 3 razy w tygodniu, Często – ponad 3 razy w miesiącu, Umiarkowanie – 1-2 przypadki na miesiąc.

3.3. Badania molekularne

3.3.1. Izolacja DNA

Od wszystkich zwierząt oraz ludzi objętych badaniami pobierano krew do próbek z EDTA, z której izolowano DNA do badań molekularnych.

Izolację DNA z krwi pełnej przeprowadzono przy użyciu zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z procedurą podaną przez producenta

1. Do próbki o pojemności 1,5 ml typu eppendorf wprowadzano 100 μ l osocza.
2. Do osocza dodawano 100 μ l uniwersalnego buforu lizującego LT, zawartego w zestawie oraz 20 μ l proteinazy K. Całość mieszano i inkubowano przez 20 min w łaźni wodnej w temp. 37°C.
3. Próbkę intensywnie mieszano przez 20 s, a następnie nanoszono na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA, którą wirowano przez 1 min przy prędkości 13 tys./obr./min w wirówce Sigma 1-13.
4. Następnie do minikolumny wprowadzano 500 μ l roztworu płuczającego A1 i wirowano 1 min. przy prędkości 13 tys./obr./min.
5. Minikolumnę przenoszono do nowej próbki 2 ml i płukano 400 μ l roztworu płuczającego A1, po czym całość wirowano przez 2 min. przy prędkości 13 tys./obr./min.
6. Osuszoną minikolumnę umieszczano w nowej próbce 1,5 ml i dodawano do niej 100 μ l buforu elucyjnego Tris (10 mM TRIS, HCl 8,5), inkubowano przez 5 min w temp. pokojowej, a następnie wirowano przez 1 min przy prędkości 13 tys./obr./min.
7. Minikolumnę usuwano, a eluat na dnie próbki zawierający oczyszczone DNA przechowywano w temp. -20°C do czasu dalszych analiz.

3.3.2. Startery do reakcji PCR

W badaniach wykorzystano zestaw starterów msp3, msp4a i msp4b komplementarnych do genu ITS (internal transcribed spacer) (ITS) *Encephalitozoon* spp. o sekwencjach:

msp3 (5'GGAATTCACACCGCCCGTCACTAT3'),

msp4a (5'CCAAGCTTATGCTTAAG-TCCAAGGGGT 3')

msp4b (5'CCAAG-CTTATGCTTAAGTCCAGGGAG 3'). [183]

Umożliwiały one amplifikację odcinka DNA o długości ok. 300 par zasad. Startery do reakcji PCR dla *Encephalitozoon cuniculi* zsyntetyzowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

3.3.3. Warunki PCR

Reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym z barwnikiem SYBR Green 1 przeprowadzono w cienkościennych probówkach o pojemności 100 μ l, z wykorzystaniem zestawu DyNAmo HS SYBR Green qPCR (Finnzymes), pozwalającym na uzyskanie reakcji o wysokiej specyficzności. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 22,4 μ l wchodziły następujące składniki:

- 10 μ l Master Mix zawierającego modyfikowaną polimerazę Tbr o gorącym startcie (*Thermus brockianus*), bufor dla polimerazy Tbr, dNTP, MgCl₂ i interkalującego barwnika SYBR Green 1,
- 5 μ l woda dejonizowana,
- 0,8 μ l starter mps3 (końcowe stężenie 25 pM/ μ l),
- 0,8 μ l starter mps4a (końcowe stężenie 25 pM/ μ l),
- 0,8 μ l starter mps4b (końcowe stężenie 25 pM/ μ l),
- 5 μ l DNA

Zoptymalizowana reakcja PCR w czasie rzeczywistym obejmowała 41 cykli, każdy składający się z trzech etapów: denaturacji w temperaturze 95°C przez 180 sekund, dołączenia starterów w temperaturze 95°C przez 5 sekund i wydłużanie nici w temperaturze 60°C przez 15 sekund. Reakcje prowadzono przy użyciu termocyklera Rotor-Gene3000, Corbett Research (Australia). Dla każdej reakcji określano wartość Ct produktów PCR (liczba cykli amplifikacji, po których natężenie fluorescencji powstającego produktu przewyższy fluorescencję tła) uzyskanych w czasie rzeczywistym, powstałych na matrycy cDNA. W celu potwierdzenia swoistości amplifikacji, określano temperaturę topnienia produktów PCR przez stopniowe podnoszenie temperatury mieszaniny reakcyjnej z 50 do 95°C przy ciągłym pomiarze natężenia fluorescencji. Kontrolę dodatnią, w reakcji PCR, stanowiło DNA *E. cuniculi* pozyskane z wcześniejszych badań [184].

3.3.4. Elektroforeza

Uzyskane produkty reakcji PCR analizowane były metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, w buforze TBE przy napięciu 10 V/cm przez 50 min. Po wybarwieniu produktów amplifikacji bromkiem etydyny określano ich wielkość w odniesieniu do wzorca masowego DNA ladder 100 bp (Gibco BRL).

3.3.5. Przygotowanie produktu PCR do sekwencjonowania

Uzyskane w wyniku reakcji PCR produkty amplifikacji DNA *E. cuniculi* przed sekwencjonowaniem poddawano oczyszczaniu na kolumnkach za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen nr kat. 28104) według następującej procedury:

1. Do 1 objętości próbki DNA dodawano 5 objętości buforu PB i mieszano na wstrząsarce (Heidolph reax 2000).
2. Tak przygotowane próbki nanoszono na kolumny do oczyszczania DNA, które umieszczano w probówkach o objętości 2 ml i wirowano przez 60 s przy 13 tys./obr./min.
3. Eluat usuwano, a kolumny przemywano 750 µl buforu PE i wirowano przez 60 sekund z prędkością 13 tys./obr./min.
4. Eluat ponownie usuwano, a kolumny wirowano „na sucho” przez kolejne 60 s.
5. Następnie kolumny przenoszono do czystych probówek typu eppendorf 1,5 ml, na środek membrany nanoszono 50 µl buforu EB (10 mM TRIS, HCl 8,5) i pozostawiano w temp. pokojowej przez 60 s.
6. Całość wirowano przez 60 sekund z prędkością 13 tys./obr./min.
7. Oczyszczony produkt zawarty w końcowym eluacie analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, a następnie wysyłano w suchym lodzie do sekwencjonowania.

3.3.6. Sekwencjonowanie

Do sekwencjonowania wysyłano losowo wybrane 32 próbki (19 od kawii domowych, 4 od szczurów, 2 od chomików, 2 od koszatniczek, 2 od myszy, i 3 od ludzi).

Produkty PCR zostały przesłane do oczyszczenia i sekwencjonowania w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk

w Warszawie. Wyniki sekwencjonowania odbierano poprzez pocztę elektroniczną, po czym opracowywano je za pomocą programu komputerowego Lasergene DNA Star.

Wykorzystując ten sam program, analizowano sekwencje izolatów własnych *Encephalitozoon cuniculi* i porównywano je z sekwencjami *Encephalitozoon* spp. dostępnymi w bazie danych PubMed.

3.4. Wykrywanie przeciwciał swoistych dla *Encephalitozoon cuniculi* metodą ELISA

Krew do badań serologicznych pobierano do probówek z przyspieszaczem wykrzepiania od 38 zwierząt (3 chomiki, 2 myszy, 3 szczury i 30 kawii domowych), u których badaniem molekularnym wykryto obecność DNA *E. cuniculi* oraz od wszystkich osób gr 1 i 2 zakwalifikowanych do badania. Krew odwirowywano, a uzyskaną surowicę mrożono (-70°C) do dalszych analiz. Badanie serologiczne w kierunku wykazania przeciwciał dla *E. cuniculi* przeprowadzono przy użyciu komercyjnych testów firmy Medicago.

Próbki surowic rozcieńczono w stosunku 1:40 za pomocą PBS-T i nanoszono na płytki pokryte antygenem (kontrolę pozytywną i negatywną rozcieńczono PBS-T w stosunku 1:100).

Przed użyciem płytkę płukano trzy razy. Następnie do dołków odmierzone po 100 µl rozcieńczonej kontroli ujemnej, 100 µl rozcieńczonej kontroli pozytywnej, oraz po 100 µl rozcieńczonych, badanych próbek. Układ inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej (20-25°C).

Następnie dołki płytki opróżniano i przemywano trzykrotnie 350 µl PBS – Tween. Do każdego dołka dodawano 100 µl rozcieńczonego przeciwciała drugorzędowego skoniugowanego z HR, po czym całość inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej 20-25°C. Po kolejnym, trzykrotnym płukaniu płytki roztworem PBS-Tween, do każdej studzienki dodano 100 µl płynnego substratu TMB i całość inkubowano przez 15 min, w temp. pokojowej. 20-25°C. Następnie do każdego dołka dodano 50 µl roztworu zatrzymującego. Absorbancję próbek odczytywano przy długości fali 450 nm. Próg odcięcia (cut off) wynosił 2,1.

3.5. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań poddawano analizie przy użyciu dokładnego testu Fishera pozwalającej ocenić czy istnieje statystycznie istotna różnica między proporcjami w poszczególnych grupach zwierząt a wszystkimi zwierzętami uwzględnionymi w badaniach. W analizie porównano występowanie dodatniego wyniku PCR potwierdzającego zakażenie *E. cuniculi* w zależności od gatunku zwierząt użytych w badaniu. Za statystycznie istotne przyjmowano wartości przy prawdopodobieństwie $p < 0,05$. Korelacje pomiędzy dodatnim wynikiem PCR a występowaniem objawów klinicznych obliczono metodą Spearmana.

W ocenie prevalencji zakażeń *E. cuniculi* u ludzi, analiza statystyczna przeprowadzona przy użyciu dokładnego testu Fishera oraz metody Spearmana, umożliwiła określenie zależności pomiędzy występowaniem kontaktu stałego (właściciele zwierząt, $n=5$) lub okazjonalnego (lekarze weterynarii biorący jedynie udział w badaniu klinicznym zwierząt, $n=23$) ludzi ze zwierzętami lub brakiem takiego kontaktu ($n=20$) a dodatnim wynikiem PCR potwierdzającym zakażenie *E. cuniculi* u ludzi.

4. Omówienie wyników badań i dyskusja

4.1. Wyniki

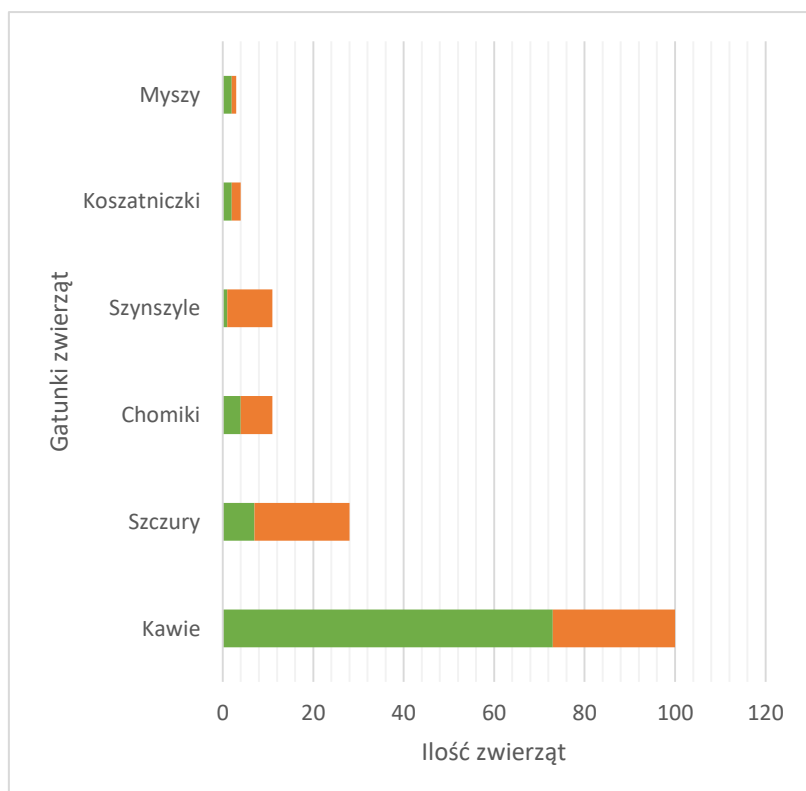
4.1.1. Prewalencja zakażeń *E. cuniculi* u zwierząt vs objawy kliniczne

Materiał kliniczny był zbierany przez okres 2 lat. Spośród 157 przebadanych gryzoni u 89 (57%) osobników uzyskano wynik dodatni PCR potwierdzający zakażenie *Encephalitozoon cuniculi*. Wśród nich największy odsetek dodatnich wyników odnotowano u kawii domowych 73%. (Tabela 5)

Wynik reakcji PCR	Liczba zwierząt	Odsetek zwierząt (%)
dodatnie	89	57%
ujemne	68	43%
całkowita liczba badanych zwierząt	157	

Tabela 5. Wyniki badania PCR u badanych zwierząt w kierunku *Encephalitozoon cuniculi*

Wśród szynszyli (9%), chomików (36%), szczurów (25%) i koszatniczek (50%) dominowały osobniki z ujemnym wynikiem badania PCR (Wykres 3).



Wykres 3. Rozkład wyników dodatnich i ujemnych u poszczególnych gatunków zwierząt. Kolor zielony – zwierzęta z wynikiem dodatnim w badaniu PCR, Kolor czerwony – zwierzęta z wynikiem ujemnym PCR.

<i>Lp.</i>	<i>Gatunek</i>	<i>PCR</i>	<i>Sekwencje</i>
1	Kawia domowa	+	nb
2	Kawia domowa	+	nb
3	Kawia domowa	+	nb
4	Kawia domowa	+	nb
6	Kawia domowa	+	nb
7	Kawia domowa	+	nb
8	Kawia domowa	+	+
9	Kawia domowa	+	nb
10	Kawia domowa	+	nb
11	Kawia domowa	+	nb
12	Kawia domowa	+	nb
13	Kawia domowa	+	nb
14	Kawia domowa	+	nb
15	Kawia domowa	+	nb
16	Kawia domowa	+	+
17	Kawia domowa	+	nb
18	Kawia domowa	+	nb
19	Kawia domowa	+	nb
20	Kawia domowa	+	nb
21	Kawia domowa	+	nb
22	Kawia domowa	+	nb
23	Kawia domowa	+	nb
24	Kawia domowa	+	nb
25	Kawia domowa	+	nb
26	Kawia domowa	+	nb
27	Kawia domowa	+	nb
28	Kawia domowa	+	nb
29	Kawia domowa	+	nb
30	Kawia domowa	+	nb
31	Kawia domowa	+	nb
32	Kawia domowa	+	nb
33	Kawia domowa	+	nb
34	Kawia domowa	+	nb
35	Kawia domowa	+	nb
36	Kawia domowa	+	nb
37	Kawia domowa	+	nb
38	Kawia domowa	+	nb
41	Kawia domowa	+	nb
43	Kawia domowa	+	nb
47	Kawia domowa	+	+
48	Kawia domowa	+	nb
50	Kawia domowa	+	nb
51	Kawia domowa	+	+
52	Kawia domowa	+	nb
53	Kawia domowa	+	nb
54	Kawia domowa	+	+
55	Kawia domowa	+	+
59	Kawia domowa	+	nb
62	Koszatniczka	+	+
63	Koszatniczka	+	+
64	Kawia domowa	+	nb
65	Szczur	+	+
69	Kawia domowa	+	nb
70	Kawia domowa	+	nb
71	Kawia domowa	+	nb
72	Szynszyla	+	nb
73	Kawia domowa	+	+
74	Kawia domowa	+	+
84	Kawia domowa	+	+
85	Kawia domowa	+	+
86	Kawia domowa	+	nb
87	Kawia domowa	+	nb
89	Kawia domowa	+	+
90	Kawia domowa	+	nb
91	Kawia domowa	+	+
92	Chomik	+	nb
94	Kawia domowa	+	+
98	Chomik	+	nb
99	Mysz	+	+
100	Mysz	+	+
101	Szczur	+	+
107	Szczur	+	nb
117	Kawia domowa	+	+
120	Kawia domowa	+	nb
125	Kawia domowa	+	nb
126	Kawia domowa	+	nb
129	Szczur	+	-
130	Kawia domowa	+	-
134	Kawia domowa	+	nb
136	Chomik	+	+
139	Kawia domowa	+	+
141	Kawia domowa	+	+
145	Szczur	+	nb
146	Szczur	+	nb
149	Szczur	+	+
150	Kawia domowa	+	-
152	Chomik	+	+
153	Kawia domowa	+	+
156	Kawia domowa	+	nb

Tabela 6. Zestawienie zwierząt z dodatnim wynikiem PCR w kierunku *E. cuniculi*. „+”- próbki dodatnie „-”, próbki ujemne „nb” – próbki niebadane.

4.1.1.1. Kawia domowa

Spośród 100 przebadanych kawii domowych u 73% uzyskano wynik dodatni PCR potwierdzający zakażenie *E. cuniculi*. Do sekwencjonowania przekazano 19 losowo wybranych produktów amplifikacji, spośród których w przypadku 17 otrzymano czytelne sekwencje fragmentu genu ITS (Tabele 6 i 7).

Kawie domowe		
Wynik reakcji PCR	Liczba zwierząt	Odsetek zwierząt (%)
dodatnie	73	73%
ujemne	27	27%
całkowita liczba badanych zwierząt		100

Tabela 7. Wyniki badania PCR dla *E. cuniculi* u kawii domowych.

U zwierząt z dodatnim wynikiem PCR najczęściej obserwowano zaburzenia ze strony układu moczowego (19 przypadków) takie jak: przewlekła niewydolność nerek, której często towarzyszyła obecność osadu w pęcherzu moczowym i/lub kamica moczowa. Równie często przewlekłej niewydolności nerek towarzyszyło nawracające przewlekłe zapalenie pęcherza moczowego.

Zaburzenia ze strony układu nerwowego obserwowano u 12 osobników, u których badaniem PCR potwierdzono infekcję. Obejmowały one: porażenia czterokończynowe, niezdolność ruchową, oczopląs, kręcz szyi, a pojedynczych przypadkach otępienie.

U 9 zwierząt pozytywnych w badaniu PCR wystąpiły objawy okulistyczne takie jak: zmętnienie rogówki, zaćma i kostnienie heterotropowe. U 2 młodych zwierząt około 4 tygodniowych notowano małocze. W tym przypadku wynik pozytywny PCR uzyskano także dla ich matki.

Innymi stwierdzanymi nieprawidłowościami u kawii dodatnich w badaniu PCR była nadczynność i niedoczynność tarczycy.

U zwierząt wykazujących zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego DNA mikrosporydiów wykryto w organizmie 3 kawii z objawami biegunek oraz u 1 pacjenta z zapaleniem wątroby.

Ponadto dodatnie wyniki PCR w kierunku *E. cuniculi* notowano u 3 zwierząt z objawami zapalenia górnych dróg oddechowych, u dwóch samic ze stwierdzoną torbielowatością jajników oraz dwóch kawii z zapaleniem ucha zewnętrznego.

Dotadni wynik PCR dla *E. cuniculi* uzyskano również u 24 spośród 35 zdrowych osobników niewykazujących żadnych objawów klinicznych (Tabela 8).

KAWIA DOMOWA			
Układy	Wyniki dodatnie	Wyniki ujemne	Ogółem
Układ nerwowy			
Tetraplegia	3	0	3
Niezborność ruchowa	1	2	3
Oczopląs	1	0	1
Torticolis	4	2	6
Otępienie	0	1	1
Drgawki	3	1	4
SUMA	12	6	18
Układ moczowy			
Kamica moczowa	4	1	5
Nadmiar osadu w pęcherzu moczowym	3	0	3
Przewlekłe zapalenie pęcherza	2	0	2
Przewlekła niewydolność nerek	10	2	12
SUMA	19	3	22
Oczy			
Zmętnienie rogówki	4	0	4
Zaćma	0	2	2
Kostnienie hetrotropowe	3	1	4
Małoocze	2	0	2
SUMA	9	3	12
Tarczycza			
Nadczynność	3	1	4
Niedoczynność	1	1	2
SUMA	3	2	6
Układ pokarmowy			
Biegunka	1	0	1
Zapalenie wątroby	1	0	1
SUMA	2	0	2
Inne			
Guz śledziony	0	1	1
Zaburzenia stomatologiczne	0	1	1
Zapalenie GDO	2	0	2
Torbiele jajnikowe	1	0	1
SUMA	3	2	5
Zdrowe	24	11	35

Tabela 8. Wyniki badania PCR zestawione z obserwowanymi objawami klinicznymi u kawii domowych objętych obserwacjami własnymi.

4.1.1.2. Szczury

Spośród przebadanych 28 zwierząt u 25% uzyskano wynik dodatni PCR w kierunku *E. cuniculi*. Czytelne sekwencje analizowanego fragmentu genu ITS uzyskano dla 3 spośród 4 produktów PCR poddawanych sekwencjonowaniu (Tabela 9).

Szczury		
Wynik reakcji PCR	Liczba zwierząt	Odsetek zwierząt w (%)
dodatnie	7	25%
ujemne	21	75%
całkowita liczba badanych zwierząt	28	

Tabela 9. Wyniki badania PCR dla *E. cuniculi* u szczurów.

W przypadku zwierząt zdradzających objawy kliniczne dodatnie wyniki PCR dla *E. cuniculi* uzyskano u 2 szczurów ze zdiagnozowanym guzem przysadki i 2 szczurów ze zmianami nowotworowymi (guz jądra i rozsiały proces nowotworowy w jamie brzusznej), jednego z mykoplazmowym zapaleniem płuc oraz jednego ze zwyrodnieniem kręgosłupa. Wśród przebadanych 3 zdrowych szczurów jeden był nosicielem *E. cuniculi* (Tabela 10).

SZCZURY			
Układy	Wyniki dodatnie	Wyniki ujemne	Ogółem
Układ nerwowy			
Guz przysadki	2	5	7
Układ moczowy			
Kamica moczowa	0	1	1
Inne			
Guz płuca	0	3	3
Mykoplazmoza płuc	1	1	2
Zwyrodnienie kręgosłupa	1	3	4
Nowotwory	2	6	8
SUMA	4	13	17
Zdrowe	1	2	3

Tabela 10. Wyniki badania PCR zestawione z obserwowanymi objawami klinicznymi u szczurów.

4.1.1.3. Chomiki

Spośród 11 chomików objętych obserwacjami u 36% uzyskano dodatnie wyniki PCR w kierunku *E. cuniculi*. Dla dwóch losowych próbek amplikonów przekazanych do sekwencjonowania otrzymano czytelne sekwencje fragmentu genu ITS (Tabela 11).

Chomiki

Wynik reakcji PCR	Liczba zwierząt	Odsetek zwierząt (%)
dodatnie	4	36%
ujemne	7	64%
całkowita liczba bada zwierząt	11	

Tabela 11. Wyniki badania PCR dla *E. cuniculi* u chomików.

Dodatnie w PCR zwierzęta (n=4) wykazywały takie zaburzenia jak: ropomacicze (1 osobnik), zwyrodnienie kręgosłupa (1 osobnik), przewlekła niewydolność nerek (1 osobnik), zmiana nowotworowa w obrębie łopatki (1 osobnik) (Tabela 12).

CHOMIK			
Układy	Wyniki dodatnie	Wyniki ujemne	Ogółem
Układ nerwowy			
Objawy przedcionkowe	0	1	1
Układ moczowy			
Kamica moczowa	0	1	1
Przewlekła niewydolność nerek	1	0	1
SUMA	1	1	2
Inne			
układ ruchu	1	1	2
zmiany nowotworowe	1	2	3
Ropomacicze	1	1	2
Zapalenie ucha	0	1	1
SUMA	3	5	8

Tabela 12. Wyniki badania PCR zestawione z obserwowanymi objawami klinicznymi u chomików.

4.1.1.4. Szynszyle

Dodatni wynik PCR dla *E. cuniculi* uzyskano w przypadku jednego spośród 11 badanych w tym kierunku szynszyli. U pacjenta obserwowano silne napady padaczkowe które doprowadziły do jego zgonu (Tabele 13 i 14).

Szynszyle		
Wynik reakcji PCR	Liczba zwierząt	Odsetek zwierząt (5)
dodatnie	1	9%
ujemne	10	91%
całkowita liczba badanych zwierząt	11	

Tabela 13. Wyniki badania PCR dla *E. cuniculi* u szynszyli.

SZYNSZYLE			
Układy	Wyniki dodatnie	Wyniki ujemne	Ogółem
Układ nerwowy			
Drgawki	1	1	2
Układ moczowy			
Ostra niewydolność nerek	0	1	1
Inne			
Ropomacicze	0	1	1
Choroba stomatologiczna	0	1	1
SUMA	0	2	2
Zdrowe	0	6	6

Tabela 14. Wyniki badania PCR zestawione z obserwowanymi objawami klinicznymi u szynszyli.

4.1.1.5. Koszatniczki

U dwóch spośród 4 przebadanych koszatniczek badaniem molekularnym wykazano obecność w ich organizmie DNA *E. cuniculi*. U żadnego z tych zwierząt nie obserwowano objawów chorobowych Czytelne sekwencje uzyskano dla obu produktów PCR (Tabele 15 i 16).

Koszatniczki		
Wynik reakcji PCR	Liczba zwierząt	Odsetek zwierząt w (%)
dodatnie	2	50%
ujemne	2	50%
całkowita liczba badanych zwierząt	4	

Tabela 15. Wyniki badania PCR dla *E. cuniculi* u koszatniczek.

KOSZATNICZKA			
Układy	Wyniki dodatnie	Wyniki ujemne	Ogółem
Choroba stomatologiczna	0	1	1
Zdrowe	2	1	3

Tabela 16. Wyniki badania PCR zestawione z obserwowanymi objawami klinicznymi u koszatniczeki.

4.1.1.6. Myszy

U 2 z 3 objętych obserwacjami myszy uzyskano dodatni wynik PCR dla *E. cuniculi* - u jednej myszy obserwowano biegunkę u drugiej zmianę guzowatą w okolicy pachy. W obu przypadkach uzyskano czytelne sekwencje amplikonów (Tabele 17 i 18).

Myszy		
Wynik reakcji PCR	Liczba zwierząt	Odsetek zwierząt (%)
dodatnie	2	67%
ujemne	1	33%
całkowita liczba badanych zwierząt	3	

Tabela 17. Wyniki badania PCR dla *E. cuniculi* u myszy.

MYSZ			
Układy	Wyniki dodatnie	Wyniki ujemne	Ilość odnotowanych objawów
Biegunka	1	0	1
Nowotwory	1	1	2

Tabela 18. Wyniki badania PCR zestawione z obserwowanymi objawami klinicznymi u myszy.

4.1.2. Prewalencja zakażeń *E. cuniculi* u ludzi.

Badaniami objęto 28 osób (grupa 1), którzy zawodowo lub prywatnie mieli kontakt z gryzoniami oraz 20 osób nie mających takiego kontaktu, formujących grupę kontrolną nr 2

W grupie 1 u 3 osób uzyskano dodatni wynik PCR dla *E. cuniculi*. W przypadku wszystkich trzech amplikonów uzyskano czytelne sekwencje analizowanego fragmentu genu ITS (2, 5, 28). Wszystkie osoby pozytywne dla *E. cuniculi* miały w przeszłości kontakt ze zwierzętami chorymi na encefalitozoonozę. (Tabela 19).

Lp	Częstość kontaktu z nosicielami E.C zwierzętami	Częstość kontaktu z chorymi na E.C zwierzętami	Układ moczowy	Układ nerwowy	Układ oddechowy	Wzrok
1	CZĘSTO	CZĘSTO	N	N	N	N
2	BARDZO CZĘSTO	UMIARKOWA NIE	N	N	N	N
3	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	N	N
4	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	Sezonowe przeziębienia	N
5	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	Częste zapalenia oskrzeli	N
6	UMIARKOWA NIE	UMIARKOWA NIE	N	N	N	N
7	UMIARKOWA NIE	UMIARKOWA NIE	N	N	N	N
8	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	N	N
9	BARDZO CZĘSTO	UMIARKOWA NIE	N	N	N	N
10	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO	N	N	N	N
11	UMIARKOWA NIE	NIE	N	N	N	N
12	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO		N	N	N
13	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	N	N
14	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	N	N
15	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	Zap. dróg moczowych	N	N	N
16	CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	N	N
17	UMIARKOWA NIE	UMIARKOWA NIE	Zap. dróg moczowych	Bóle głowy, męczliwość, bóle mięśni i drętwienie	Częste zapalenia oskrzeli	N
18	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	Astma oskrzelowa	N
19	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO	N	N	N	N
20	UMIARKOWA NIE	UMIARKOWA NIE	N	N	N	N
21	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO	N	N	N	N
22	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO	N	N	N	N
23	BARDZO CZĘSTO	UMIARKOWA NIE	N	Migreny	N	N
24	BARDZO CZĘSTO	UMIARKOWA NIE	N	N	N	N

25	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO	Inf. Układu moczowego	N	N	Zmiany w oku
26	BARDZO CZĘSTO	CZĘSTO	N	N	N	N
27	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	N	N
28	BARDZO CZĘSTO	BARDZO CZĘSTO	N	N	N	N

Tabela 19. Wyniki ankiety przeprowadzonej wśród osób zakwalifikowanych do badań własnych.

Jedna z osób grupy 1, u której wynik badania molekularnego w kierunku *E. cuniculi* był dodatni zgłaszała częste zapalenie oskrzeli, u pozostałych nie stwierdzono problemów zdrowotnych. (Tabela 20). Wyniki badań biochemicznych i hematologicznych nie wykazywały u żadnej z osób wykorzystanych w badaniach własnych (zarówno z grupy 1, jak i 2) odstępstw od normy fizjologicznej (Tabele 21, 22, 23, 24).

<i>Lp.</i>	<i>PCR</i>	<i>SEKWENCJONOWANIE</i>			
			15	-	nb
1	-	nb	16	-	nb
2	+	+	17	-	nb
3	-	nb	18	-	nb
4	-	nb	19	-	nb
5	+	+	20	-	nb
6	-	nb	21	-	nb
7	-	nb	22	-	nb
8	-	nb	23	-	nb
9	-	nb	24	-	nb
10	-	nb	25	-	nb
11	-	nb	26	-	nb
12	-	nb	27	-	nb
13	-	nb	28	+	+
14	-	nb			

Tabela 20. Zestawienie wyników badania molekularnego w grupie badanych ludzi. „+”- próbki dodatnie „-”, próbki ujemne „nb” – próbki niebadane.

NR		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
URIC	mg/dL	3,91	5,06	6,03	4,17	3,28	6,4	6,15	3,72	3,64	4,54	7,91	4,33	5,73	4,21
UREA	mg/dL	19,8	23,2	35,2	19,0	24,1	24,7	16,9	24,7	25,5	18,3	25,2	29,5	27,5	24,7
TRIGLY	mg/dL	85,1	75,6	58,8	104,3	44,9	71,9	164,7	70,6	102,2	53,4	150,9	41,9	69,6	116,4
PROTEI	g/L	72,5	81,5	72,5	73,6	65,0	69,3	74,4	68,2	71,5	77,0	69,7	59,7	67,2	69,2
PHOSPH	mg/dL	3,65	4,06	3,95	3,70	3,99	2,73	3,20	3,32	3,87	3,15	2,90	3,81	2,81	3,91
MAGNE	mg/dL	2,05	2,08	2,18	2,16	2,04	2,22	1,91	1,66	1,88	1,98	2,56	2,03	2,26	1,83
IRON	ug/dL	117,9	107,4	65,8	175,2	85,8	89,3	49,9	52,1	94,9	151,3	62,5	67,9	45,4	115,8
GLUCO	mg/dL	78	88	92	100	94	95	90	77	85	84	80	140	87	75
g - GT	U/L	9	23	10	12	10	22	34	16	10	16	42	7	9	13
CRP- hs	mg/dL	2,8	1,6	0,4	0,4	1	0,5	0,7	4,8	0,3	0,4	0,5	0,7	0,7	0,9
CREATI	mg/dL	0,63	0,66	0,71	0,70	0,66	0,65	0,35	0,46	0,57	0,61	1,00	0,70	0,70	0,70
CHOLE	mg/dL	187,0	137,1	168,	193,2	177,4	236,0	199,1	159,4	249,3	133,8	228,9	171,2	167,3	207,7
CHOL	mg/dL	72,0	62,3	53,9	56,8	64,2	94,6	99,3	59,9	102,6	29,5	116,4	59,8	66,5	70,0
CHOL	mg/dL	102,0	47,4	80,1	103,9	85,0	94,5	56,5	77,1	86,4	90,5	58,0	86,8	60,3	104,9
CALCIU	mg/dL	13,49	14,29	13,4	13,79	13,35	13,83	13,51	13,4	13,94	14,13	13,73	13,59	13,77	13,41
BILIRU	mg/dL	0,65	0,63	0,58	0,92	0,72	0,51	0,22	0,31	0,40	0,80	0,30	0,40	0,42	0,58
AST	U/L	15	16	18	17	13	18	25	19	18	21	19	13	17	14
ALT	U/L	15	16	18	20	15	20	38	15	14	19	24	21	14	17
ALP-	U/L	63	76	61	58	50	67	123	75	61	50	88	43	50	62
ALBUMI	g/L	46,1	57,1	48,8	51,7	45,4	50,0	48,0	42,8	50,1	55,0	49,1	42,0	45,6	47,8

NR		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
URIC	mg/dL	3,89	5,85	8,14	4,24	4,92	4,43	5,67	6,03	5,12	4,23	5,42	6,48	5,02	6,46
UREA	mg/dL	21,2	30,1	27,5	26,4	22,2	35,6	33,8	36,6	26,9	27,5	23,8	24,8	25,8	32,3
TRIGLY	mg/dL	76,3	85,7	127	42,7	71,1	64,9	132,3	171,2	102,4	115,1	54,5	101,9	70,2	54,6
PROTEI	g/L	67,9	73,0	71,9	68,9	72,3	68,0	72,9	75,1	68,0	58,6	63,5	79,1	73,4	72,0
PHOSPH	mg/dL	3,86	4,24	3,14	3,72	3,03	4,30	4,95	3,48	4,32	3,07	3,71	2,77	3,63	4,41
MAGNE	mg/dL	2,10	2,22	2,07	2,26	2,20	2,27	2,44	2,34	2,33	2,30	2,37	2,58	2,78	2,53
IRON	ug/dL	208,1	146,0	96,1	173,0	60,1	57,2	134,2	100,1	133,2	69,0	48,5	131,2	111,0	20,5
GLUCO	mg/dL	74	85	124	88	74	91	67	83	76	71	91	95	75	99
g - GT	U/L	16	20	67	17	10	8	16	47	11	11	28	10	12	10
CRP- hs	mg/dL	1,7	0,5	2,9	0,7	brak	0,3	2,3	1,3	0,3	2	0,2	0,5	0,4	1,1
CREATI	mg/dL	0,59	0,51	0,98	0,72	0,74	0,63	0,76	1,11	0,74	0,64	0,74	0,78	0,76	0,88
CHOLE	mg/dL	214,5	151,7	263,4	165,9	160,7	192,7	232,6	250,8	198,2	218,8	160,7	199,2	210,0	231,
CHOL	mg/dL	84,8	53,6	119,8	51,2	41,3	81,9	88,6	114,5	57,8	69,3	44,8	80,2	78,6	83,2
CHOL	mg/dL	93,7	86,4	98,4	95,1	98,9	75,7	93,6	58,8	94,2	90,5	91,5	77,0	76,5	93,2
CALCIU	mg/dL	13,47	14,58	14,19	13,78	13,35	13,42	14,64	14,4	13,9	12,97	13,88	14,91	14,2	14,5
BILIRU	mg/dL	0,86	0,56	0,53	0,75	0,18	0,32	0,45	0,46	0,23	0,15	0,51	0,97	0,52	0,25
AST	U/L	15	15	24	16	11	13	15	19	16	13	13	19	11	15
ALT	U/L	15	20	29	12	13	9	15	23	11	14	13	14	12	14
ALP-	U/L	79	68	67	63	62	55	46	55	77	44	42	74	49	75
ALBUMI	g/L	45,3	49,6	50,2	47,5	41,5	44,9	46,6	48,7	46,5	39,5	45,3	55,9	49,6	47,3

Tabela 21. Wyniki badań biochemicznych krwi ludzi z grupy 1 objętych badaniami własnymi.

NR		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BASO %	%	0,4	1,2	0,9	0,8	1,4	0,7	0,5	0,7	0,8	0,8	0,7	0,5	0,3	0,5
BASO	10 ³ /uL	0,4	0,05	0,05	0,04	0,11	0,06	0,02	0,07	0,07	0,05	0,04	0,05	0,02	0,03
EO %	%	3,6	4,1	1,2	4,3	2,5	0,6	0,7	1,2	1,4	6,7	10,6	0,8	1,3	1,4
EO	10 ³ /uL	0,27	0,17	0,07	0,22	0,19	0,05	0,03	0,12	0,13	0,42	0,65	0,08	0,09	0,09
MONO⁰⁷	%	6,6	8,3	6	4,3	7,3	7,9	10	5,9	7,5	7,1	9,1	7,8	9,2	7,3
MONO	10 ³ /uL	0,5	0,34	0,34	0,47	0,56	0,67	0,44	0,61	0,69	0,45	0,56	0,78	0,62	0,46
LYPH %	%	32,1	46,3	22,8	34	36,1	30,7	28,9	23,5	19,5	20,9	24,1	22,3	40,9	37,6
LYPH	10 ³ /uL	2,42	1,9	1,3	1,75	2,76	2,62	1,27	2,43	1,8	1,32	1,48	2,23	2,77	2,36
NEUT %	%	57,3	40,1	69,1	51,8	52,7	60,1	59,9	68,7	70,8	64,5	55,5	68,6	48,3	53,2
NEUT	10 ³ /uL	4,33	1,64	3,94	2,66	4,03	5,13	2,63	7,09	6,52	4,07	3,42	6,86	3,27	3,33
PLT	10 ³ /uL	293	201	252	286	197	210	178	394	259	156	185	324	277	183
MCV	fL	83,6	86,3	87	89,3	86,9	90,6	87	83,4	87,8	85,2	86,1	85,4	87,1	91,4
HCT	%	39,3	36,4	46,1	46	43,7	39,5	40,8	44,8	42,5	39,3	38,9	39,7	39,8	43,7
HGB	g/dL	12,9	12,0	15,8	15,9	14,5	13,4	14,5	15,6	14,3	13,5	13,2	13,4	13,3	14,9
RBC	10 ⁶ /uL	4,7	4,22	5,3	5,15	5,03	4,36	4,69	5,37	4,84	4,61	4,52	4,65	4,57	4,78
WBC	10 ³ /uL	7,55	4,10	5,70	5,55	7,65	8,53	4,39	10,32	9,21	6,31	6,15	10,00	6,77	6,27

Nr	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
BASO %	0,5	1,1	1,3	0,7	0,8	1,2	0,9	1,1	0,8	0,01	0,7	1,3	0,5	1,7
BASO	10 ³ /uL	0,04	0,09	0,07	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04	0,05	0,07	0,03	0,09
EO %	1,2	7,7	3	3,7	4,3	4,3	3,6	5,6	1,5	1,1	1	2,7	2,5	8,6
EO	10 ³ /uL	0,09	0,64	0,17	0,22	0,22	0,12	0,21	0,06	0,06	0,07	0,15	0,15	0,45
MONO⁰⁷	%	10,5	6,7	9,5	8,6	4,3	11,2	7,4	8,6	6,5	8,2	8,2	7,2	10
MONO	10 ³ /uL	0,77	0,56	0,53	0,51	0,47	0,25	0,37	0,34	0,36	0,56	0,45	0,43	0,52
LYPH %	37,2	25,5	32	42,1	34	27,1	44	42,8	39,1	41,4	35,2	34,8	36,1	43,7
LYPH	10 ³ /uL	2,73	2,1	1,8	2,49	1,75	1,5	1,6	1,6	2,3	2,4	1,9	2,2	2,3
NEUT %	50,6	58,6	54	44,9	51,8	56,2	43,8	40,6	50	50,1	54,6	52,8	53,5	35,8
NEUT	10 ³ /uL	3,7	4,89	3,03	2,67	2,66	1,47	1,52	1,98	2,78	3,7	2,9	3,22	1,87
PLT	10 ³ /uL	245	288	258	277	208	226	206	201	286	260	310	329	298
MCV	fL	86,2	89,2	90,4	93	86,3	96,6	92,1	93,8	89,3	93	87,7	95,3	93
HCT	%	37,6	39,5	48,1	38,8	36,6	36,5	37,4	42,6	46	41,9	35,7	38,1	39,9
HGB	g/dL	12,8	12,8	15,9	12,9	12,1	12,0	12,3	13,3	15,9	14,0	11,1	12,8	12,8
RBC	10 ⁶ /uL	4,36	4,43	5,32	4,19	4,24	3,78	4,06	4,54	5,15	4,46	4,07	4	4,29
WBC	10 ³ /uL	7,33	8,34	5,60	5,93	5,19	6,95	3,74	3,96	5,55	6,79	5,49	6,01	5,22

Tabela 22. Wyniki badań morfologicznych krwi u ludzi z grupy 1objętych badaniami własnymi.

NR		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
URIC	mg/dL	5,85	6,48	4,24	5,67	4,17	5,73	3,91	4,33	6,15	4,23
UREA	mg/dL	30,1	24,8	26,4	33,8	19,0	27,5	19,8	29,5	16,9	27,5
TRIGLY	mg/dL	85,7	101,9	42,7	132,3	104,3	69,6	85,1	41,9	164,7	115,1
PROTEI	g/L	73,0	79,1	68,9	72,9	73,6	67,2	72,5	59,7	74,4	58,6
PHOSPH	mg/dL	4,24	2,77	3,72	4,95	3,70	2,81	3,65	3,81	3,20	3,07
MAGNE	mg/dL	2,22	2,58	2,26	2,44	2,16	2,26	2,05	2,03	1,91	2,30
IRON	ug/dL	146,0	131,2	173,0	134,2	175,2	45,4	117,9	67,9	49,9	69,0
GLUCCO	mg/dL	85	95	88	67	100	87	78	140	90	71
g - GT	U/L	20	10	17	16	12	9	9	7	34	11
CRP- hs	mg/dL	0,5	0,5	0,7	2,3	0,4	0,7	2,8	0,7	0,7	2
CREATI	mg/dL	0,51	0,78	0,72	0,76	0,70	0,70	0,63	0,70	0,35	0,64
CHOLE	mg/dL	151,7	199,2	165,9	232,6	193,2	167,3	187,0	171,2	199,1	218,8
CHOL	mg/dL	53,6	80,2	51,2	88,6	56,8	66,5	72,0	59,8	99,3	69,3
CHOL	mg/dL	86,4	77,0	95,1	93,6	103,9	60,3	102,0	86,8	56,5	90,5
CALCIU	mg/dL	14,58	14,91	13,78	14,64	13,79	13,77	13,49	13,59	13,51	12,97
BILIRU	mg/dL	0,56	0,97	0,75	0,45	0,92	0,42	0,65	0,40	0,22	0,15
AST	U/L	15	19	16	15	17	17	15	13	25	13
ALT	U/L	20	14	12	15	20	14	15	21	38	14
ALP-	U/L	68	74	63	46	58	50	63	43	123	44
ALBUMI	g/L	49,6	55,9	47,5	46,6	51,7	45,6	46,1	42,0	48,0	39,5

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3,28	6,03	5,67	3,89	8,14	3,64	4,92	4,54	7,91	4,43
24,1	36,6	33,8	21,2	27,5	25,5	22,2	18,3	25,2	35,6
44,9	171,2	132,3	76,3	127	102,2	71,1	53,4	150,9	64,9
65,0	75,1	72,9	67,9	71,9	71,5	72,3	77,0	69,7	68,0
3,99	3,48	4,95	3,86	3,14	3,87	3,03	3,15	2,90	4,30
2,04	2,34	2,44	2,10	2,07	1,88	2,20	1,98	2,56	2,27
85,8	100,1	134,2	208,1	96,1	94,9	60,1	151,3	62,5	57,2
94	83	67	74	124	85	74	84	80	91
10	47	16	16	67	10	10	16	42	8
1	1,3	2,3	1,7	2,9	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3
0,66	1,11	0,76	0,59	0,98	0,57	0,74	0,61	1,00	0,63
177,4	250,8	232,6	214,5	263,4	249,3	160,7	133,8	228,9	192,7
64,2	114,5	88,6	84,8	119,8	102,6	41,3	29,5	116,4	81,9
85,0	58,8	93,6	93,7	98,4	86,4	98,9	90,5	58,0	75,7
13,35	14,4	14,64	13,47	14,19	13,94	13,35	14,13	13,73	13,42
0,72	0,46	0,45	0,86	0,53	0,40	0,18	0,80	0,30	0,32
13	19	15	15	24	18	11	21	19	13
15	23	15	15	29	14	13	19	24	9
50	55	46	79	67	61	62	50	88	55
45,4	48,7	46,6	45,3	50,2	50,1	41,5	55,0	49,1	44,9

Tabela 23. Wyniki badań biochemicznych krwi ludzi z grupy 2 objętych badaniami własnymi.

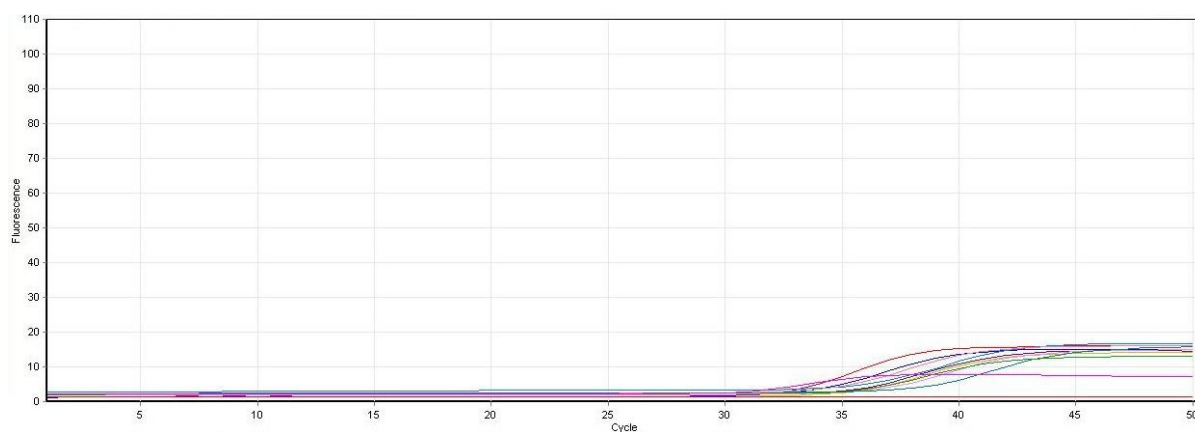
NR		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BASO %	%	1,3	0,7	0,5	0,8	0,8	0,7	0,9	0,8	1,1	0,5
BASO	10 ^{^3} /uL	0,07	0,04	0,04	0,03	0,04	0,05	0,03	0,07	0,09	0,03
EO %	%	3	3,7	1,2	1,5	4,3	1	3,6	1,4	7,7	1,4
EO	10 ^{^3} /uL	0,17	0,22	0,09	0,06	0,22	0,07	0,12	0,13	0,64	0,09
MONO	%	9,5	8,6	10,5	8,6	4,3	8,2	7,4	7,5	6,7	7,3
MONO	10 ^{^3} /uL	0,53	0,51	0,77	0,34	0,47	0,56	0,25	0,69	0,56	0,46
LYPH %	%	32	42,1	37,2	39,1	34	35,2	44	19,5	25,5	37,6
LYPH	10 ^{^3} /uL	1,8	2,49	2,73	1,6	1,75	2,4	1,5	1,8	2,1	2,36
NEUT %	%	54	44,9	50,6	50	51,8	54,6	43,8	70,8	58,6	53,2
NEUT	10 ^{^3} /uL	3,03	2,67	3,7	1,98	2,66	3,7	1,47	6,52	4,89	3,33
PLT	10 ^{^3} /uL	258	277	245	201	208	260	226	259	288	183
MCV	fL	90,4	93	86,2	93,8	86,3	93	96,6	87,8	89,2	91,4
HCT	%	48,1	38,8	37,6	42,6	36,6	41,9	36,5	42,5	39,5	43,7
HGB	g/dL	15,9	12,9	12,8	13,3	12,1	14,0	12,0	14,3	12,8	14,9
RBC	10 ^{^6} /uL	5,32	4,19	4,36	4,54	4,24	4,46	3,78	4,84	4,43	4,78
WBC	10 ^{^3} /uL	5,60	5,93	7,33	3,96	5,19	6,79	3,36	9,21	8,34	6,27

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0,7	1,2	1,1	0,5	0,5	0,9	1,3	0,8	0,3	0,01
0,04	0,08	0,04	0,03	0,02	0,05	0,07	0,05	0,02	0,04
10,6	4,3	5,6	2,5	0,7	1,2	2,7	6,7	1,3	1,1
0,65	0,3	0,21	0,15	0,03	0,07	0,15	0,42	0,09	0,06
9,1	11,2	9,9	7,2	10	6	8,2	7,1	9,2	6,5
0,56	0,78	0,37	0,43	0,44	0,34	0,45	0,45	0,62	0,36
24,1	27,1	42,8	36,1	28,9	22,8	34,8	20,9	40,9	41,4
1,48	1,88	1,6	2,2	1,27	1,3	1,9	1,32	2,77	2,3
55,5	56,2	40,6	53,5	59,9	69,1	52,8	64,5	48,3	50,1
3,42	3,91	1,52	3,22	2,63	3,94	2,9	4,07	3,27	2,78
185	235	206	329	178	252	310	156	277	286
86,1	87,6	92,1	95,3	87	87	87,7	85,2	87,1	89,3
38,9	47,2	37,4	38,1	40,8	46,1	35,7	39,3	39,8	46
13,2	16,2	12,3	12,8	14,5	15,8	11,1	13,5	13,3	15,9
4,52	5,39	4,06	4	4,69	5,3	4,07	4,61	4,57	5,15
6,15	6,95	3,74	6,01	4,39	5,70	5,49	6,31	6,77	5,55

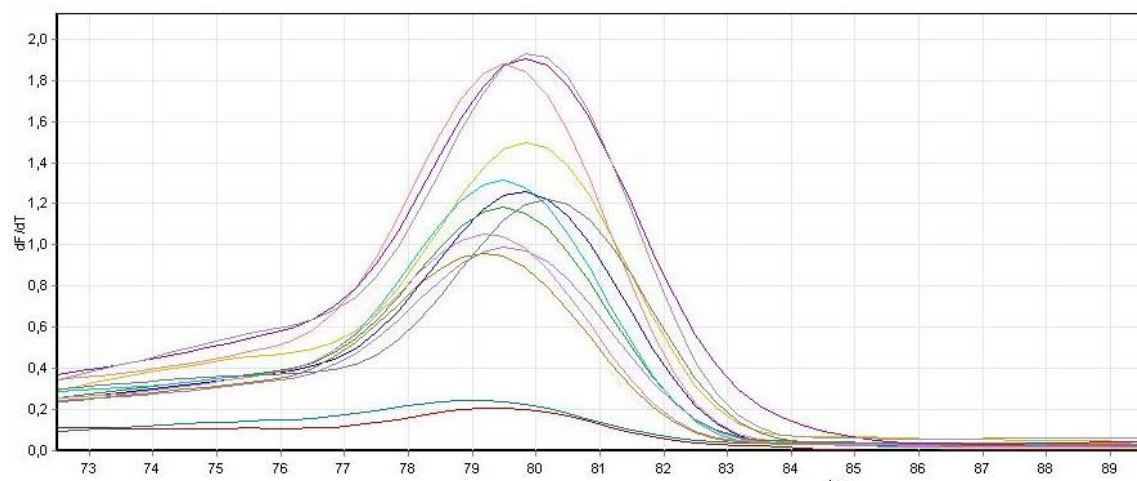
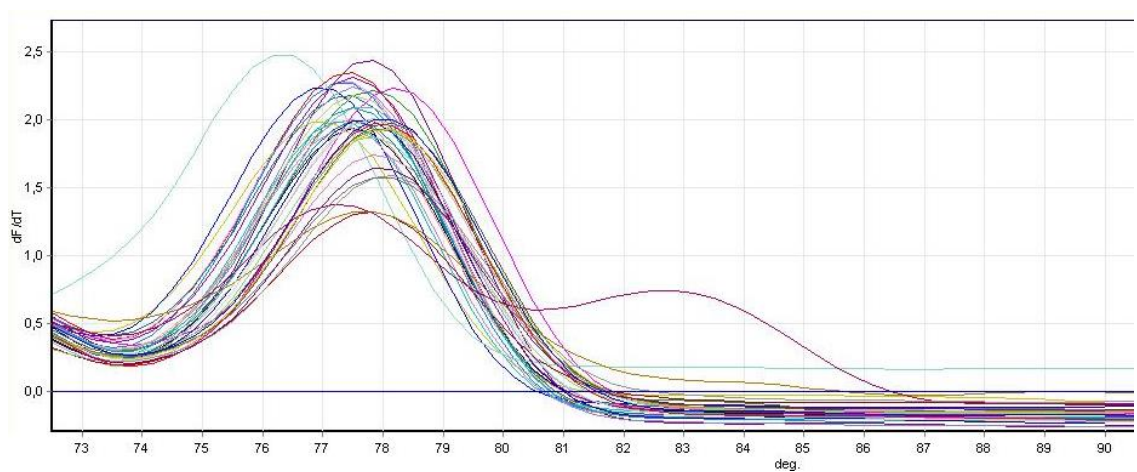
Tabela 24. Wyniki badań morfologicznych krwi u ludzi z grupy 2 objętych badaniami własnymi.

4.1.3. Wyniki badań molekularnych

Techniką Real-Time HRM PCR z zastosowaniem barwnika SYBR Green I, DNA *E. cuniculi* wykryto w próbkach krwi uzyskanych od 89 gryzoni i 3 osób. Wartości Ct wahały się w granicach 28-38 (Ryc. 3). Analiza krzywej topnienia amplikonów wykazała, iż temperatura topnienia (T_m) uzyskanych produktów mieści się w przedziale od 78,5°C do 80,5°C (Ryc. 4).

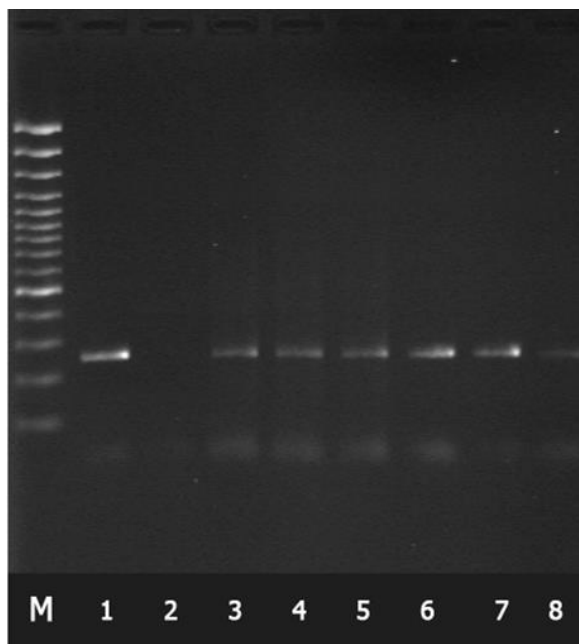


Ryc. 3. Krzywa amplifikacji uzyskana Real-Time Sybr Green PCR, (wartość Ct w granicach 34-35).



Ryc. 4. Krzywa topnienia amplikonów *E. cuniculi* uzyskana w HRM Sybr-Green Real-Time PCR.

Obecność wszystkich produktów reakcji Real-Time PCR została dodatkowo potwierdzona metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Wielkość produktów odnoszonych do wzorca masowego szacowano na około 300 pz (Ryc 5).



Ryc.5 Elektroforeza produktów PCR fragmentu genu ITS *E. cuniculi* (wielkości produktu 300 par zasad) Ścieżki: M-marker masowy Gibco BRL DNA Ladder 100bp.; 1-kontrola pozytywna; 2-kontrola negatywna; 3-8 produkty PCR uzyskane w badaniach własnych.

Przeprowadzono analizę sekwencji 29 losowo wybranych próbek dodatnich dla *E. cuniculi*, uzyskanych od zwierząt (PL 8, PL 16, PL 47, PL 48, PL 50, PL 51, PL 54, PL 55, PL 62, PL 63, PL 65, PL 73, PL 74, PL 84, PL 85, PL 89, PL 91, PL 94, PL 99, PL 100, PL 101, PL 117, PL 129, PL 130, PL 136, PL 139, PL 141, PL 145, PL 150, PL 152, PL 153) oraz 3 pozytywne próbki pozyskanych od ludzi (PL 2 - człowiek, PL 5 - człowiek, PL 28 - człowiek).

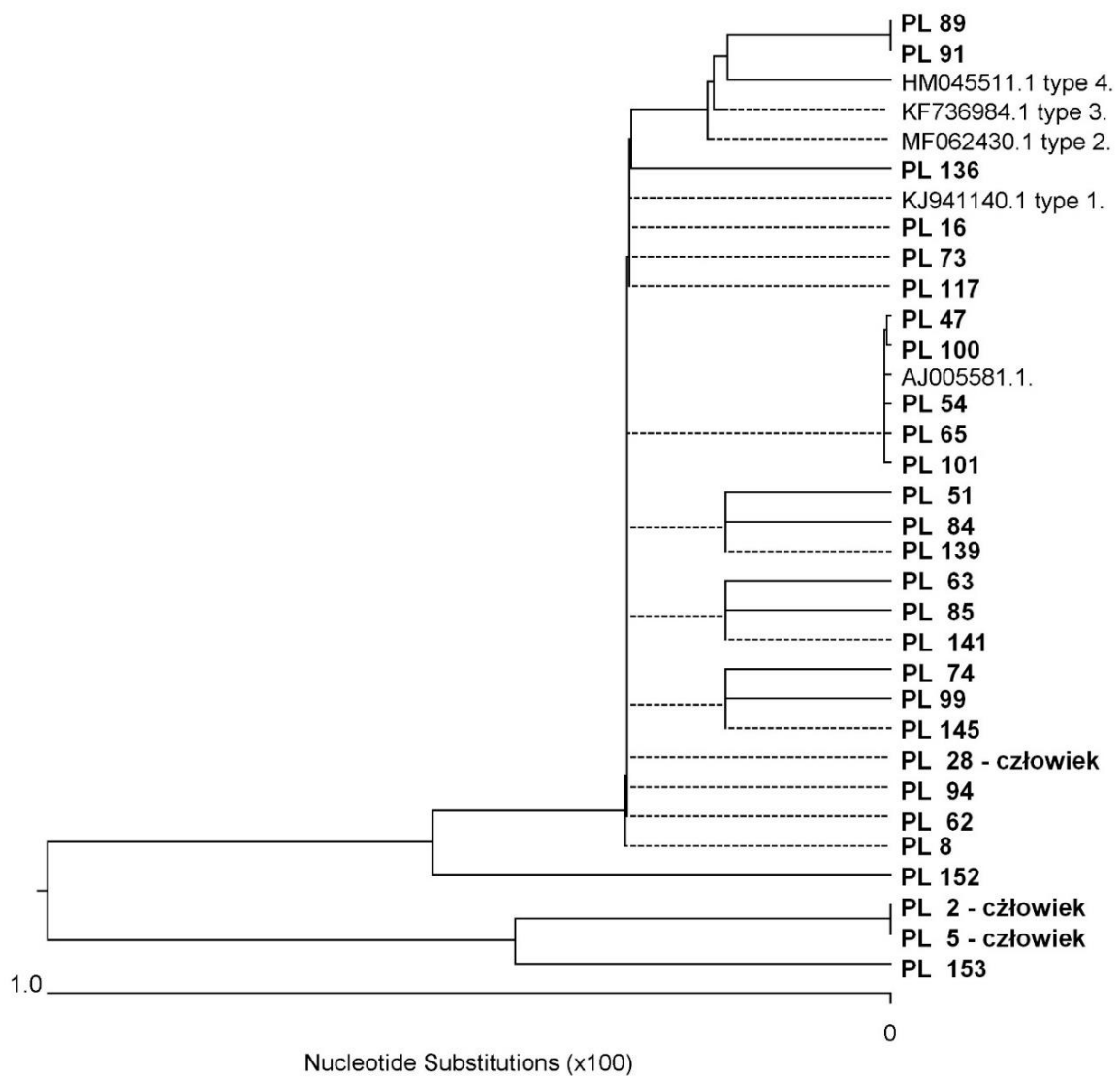
Porównanie uzyskanych sekwencji nukleotydowych izolatów uzyskanych w badaniach własnych ze wzorcowymi sekwencjami *E. cuniculi* AJ005581.1, KJ941140.1 typ 1, MF062430, typ 2, KF736984.1 typ 3, HM045511 typ 4 z banku genów (GenBank) przy pomocy programu DNA Star MegAligne pozwoliło ustalić stopień ich podobieństwa w przedziale 91,2-100,0%. (Ryc 6). Największą odmienność wykazywała sekwencja fragmentu genu ITS pozyskana od ludzi (próbki PL 5 człowiek, PL 28 człowiek), której podobieństwo do sekwencji wzorcowych wynosiło jedynie 91,2%.

Analiza filogenetyczna wykazała obecność dwóch grup, które określono numerami 1 i 2. Grupa 1 utworzona została przez sekwencje izolatów PL 8, PL 16, PL 47, PL 48, PL

50, PL 51, PL 54, PL 55, PL 62, PL 63, PL 65, PL 73, PL 74, PL 84, PL 85, PL 89, PL 91, PL 94, PL 99, PL 100, PL 101, PL 117, PL 129, PL 130, PL 136, PL 139, PL 141, PL 145, PL 150, PL 152, PL 28 – człowiek, natomiast grupa 2 przez 3 sekwencje: PL 2 – człowiek, PL 5 – człowiek, PL153 nie wykazujące istotnego podobieństwa z pozostałymi sekwencjami uzyskanymi w badaniach własnych, jak i z wzorcowymi sekwencjami *E. cuniculi* dostępnymi w banku genów GeneBank.

Szczegółowa analiza sekwencji tworzących grupę 1 pozwoliła na wyróżnienie w jej obrębie sześciu podgrup monofiletycznych oznaczonych literami A-F. W podgrupie A: znalazły się sekwencje izolatów PL89 i PL91 wykazujących najwyższe podobieństwo z sekwencją izolatu *E. cuniculi* typu 4 HM045511; podgrupę B utworzyła sekwencja szczepu KF736984.1 typ 3; podgrupę C sekwencja szczepu MF062430 typ 2, podgrupę D sekwencja izolatu PL136 wykazująca podobnego stopnia homologię z sekwencjami szczepów KJ941140.1 typ 1 i MF062430, typ 2. W podgrupie E znalazły się sekwencje izolatów własnych (PL 16, PL 73, PL 117) wykazujące najwyższe podobieństwo ze szczepem KJ941140 typ 1, natomiast w najliczniejszej podgrupie F umieszczono sekwencje izolatów własnych PL 47, PL 100, PL 54, PL 65, PL 101, PL 51, PL 84, PL 139, PL 63, PL 85, PL 141, PL 74, PL 99, PL 145, PL 28-człowiek, PL 94, PL 62, PL 8, PL 152 wykazujących najwyższe podobieństwo z szczepem *E. cuniculi* AJ005581.1 typ 1. (Ryc 7)

Na Rycinie 8 przedstawiono podstawienia nukleotydowe w badanych sekwencjach fragmentu genu ITS *E. cuniculi* ampliconów pozyskanych w badaniach własnych.



Ryc 7. Drzewo filogenetyczne przedstawiające podobieństwo sekwencji nukleotydowych fragmentu genu ITS *E. cuniculi*, pozyskanych w badaniach własnych

															C	Majority			
															50	60			
1	AJ005581.1.		
41	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	G	T	C	G	HM045511.1 type 4.
1	KF736984.1 type 3.
1	KJ941140.1 type 1.
1	MF062430.1 type 2.
1	PL 47
1	PL 8
1	PL 51
1	PL 54
1	PL 16
1	PL 62
1	PL 63
1	PL 65
1	PL 73
1	PL 74
1	PL 84
1	PL 85
1	PL 89
1	PL 91
1	PL 94
1	PL 99
9	PL 100
1	PL 101
1	PL 117
1	PL 136
1	PL 139
1	PL 141
1	PL 145
1	PL 153
1	PL 152
1	PL 2- człowiek
1	PL 5- człowiek
1	PL 28- człowiek

															T	A	T	C	T	A	A	G	A	T	G	A	C	G	C	A	C	T	G	G	Majority
															70					80															
2	AJ005581.1.														
61	HM045511.1 type 4.														
2	KF736984.1 type 3.														
2	KJ941140.1 type 1.														
2	MF062430.1 type 2.														
2	PL 47														
2	PL 8														
2	PL 51														
2	PL 54														
2	PL 16														
2	PL 62														
2	PL 63														
2	PL 65														
2	PL 73														
2	PL 74														
2	PL 84														
2	PL 85														
2	PL 89														
2	PL 91														
2	PL 94														
2	PL 99														
9	PL 100														
2	PL 101														
2	PL 117														
2	PL 136														
2	PL 139														
2	PL 141														
2	PL 145														
2	PL 153														
2	PL 152														
2	PL 2- człowiek														
2	PL 5- człowiek														
2	PL 28- człowiek														

	T	A	T	A	A	G	T	C	G	T	A	A	C	A	T	G	G	C	T	G	Majority
	130										140										
62	AJ005581.1.
121	HM045511.1 type 4.
62	KF736984.1 type 3.
62	KJ941140.1 type 1.
62	MF062430.1 type 2.
61	PL 47
62	PL 8
62	PL 51
62	PL 54
62	PL 16
62	PL 62
62	PL 63
62	PL 65
62	PL 73
62	PL 74
62	PL 84
62	PL 85
61	PL 89
61	PL 91
62	PL 94
62	PL 99
63	PL 100
62	PL 101
62	PL 117
62	PL 136
62	PL 139
62	PL 141
62	PL 145
62	PL 153
62	PL 152
62	PL 2- człowiek
62	PL 5- człowiek
62	PL 28- człowiek

	C	T	G	T	T	G	G	A	G	A	A	-	-	-	C	C	A	G	C	A	Majority	
	150										160											
82	AJ005581.1.
141	HM045511.1 type 4.
82	KF736984.1 type 3.
82	KJ941140.1 type 1.
82	MF062430.1 type 2.
81	PL 47
82	PL 8
82	.	.	.	T	PL 51
82	PL 54
82	PL 16
82	PL 62
82	PL 63
82	PL 65
82	PL 73
82	PL 74
82	PL 84
82	PL 85
81	PL 89
81	PL 91
82	PL 94
82	PL 99
83	PL 100
82	PL 101
82	PL 117
82	A	A	A	PL 136
82	PL 139
82	PL 141
82	PL 145
82	PL 153
82	PL 152
82	PL 2- człowiek
82	PL 5- człowiek
82	PL 28- człowiek

	G	C	A	G	G	A	T	C	A	G	T	A	T	G	T	T	G	T	T	G	Majority
	170										180										
99	AJ005581.1.
158	HM045511.1 type 4.
99	KF736984.1 type 3.
99	KJ941140.1 type 1.
99	MF062430.1 type 2.
98	PL 47
99	PL 8
99	PL 51
99	PL 54
99	PL 16
99	PL 62
99	PL 63
99	PL 65
99	PL 73
99	PL 74
99	PL 84
99	PL 85
98	PL 89
98	PL 91
99	PL 94
99	PL 99
100	PL 100
99	PL 101
99	PL 117
102	PL 136
99	PL 139
99	PL 141
99	PL 145
99	PL 153
99	PL 152
99	PL 2- człowiek
99	PL 5- człowiek
99	PL 28- człowiek

	T	G	T	T	T	G	A	T	G	G	A	T	G	T	T	T	G	T	T	Majority	
	190										200										
119	AJ005581.1.
178	HM045511.1 type 4.
119	KF736984.1 type 3.
119	KJ941140.1 type 1.
119	MF062430.1 type 2.
118	PL 47
119	PL 8
119	PL 51
119	PL 54
119	PL 16
119	PL 62
119	PL 63
119	PL 65
119	PL 73
119	PL 74
119	PL 84
119	PL 85
118	PL 89
118	PL 91
119	PL 94
119	PL 99
120	PL 100
119	PL 101
119	PL 117
122	PL 136
119	PL 139
119	PL 141
119	PL 145
119	PL 153
119	PL 152
119	PL 2- człowiek
119	PL 5- człowiek
119	PL 28- człowiek

	T	G	T	T	G	T	-	-	-	-	-	-	-	G	G	T	T	T	Majority
	210													220					
139	AJ005581.1.
198	T	T	G	T	T	T	G	T	HM045511.1 type 4.
139	T	T	G	T	-	-	-	-	KF736984.1 type 3.
139	KJ941140.1 type 1.
138	T	T	G	T	MF062430.1 type 2.
138	T	T	G	T	PL 47
139	PL 8
139	PL 51
139	PL 54
139	PL 16
139	PL 62
139	PL 63
139	PL 65
139	PL 73
139	PL 74
139	PL 84
139	PL 85
134	T	T	G	T	T	T	G	T	PL 89
134	T	T	G	T	T	T	G	T	PL 91
139	PL 94
139	PL 99
140	T	T	G	T	PL 100
139	PL 101
139	PL 117
142	T	T	G	T	PL 136
139	PL 139
139	PL 141
139	PL 145
139	PL 153
139	PL 152
139	G	T	G	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	PL 2- człowiek
139	G	T	G	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	PL 5- człowiek
139	PL 28- człowiek
	C	T	C	T	G	T	T	C	A	C	G	G	A	T	T	G	A	T	Majority
	230													240					
151	AJ005581.1.
218	HM045511.1 type 4.
155	KF736984.1 type 3.
151	KJ941140.1 type 1.
147	MF062430.1 type 2.
150	PL 47
151	PL 8
151	PL 51
151	PL 54
151	PL 16
151	PL 62
151	PL 63
151	PL 65
151	PL 73
151	PL 74
151	PL 84
151	PL 85
149	PL 89
149	PL 91
151	PL 94
151	PL 99
152	PL 100
151	PL 101
151	PL 117
154	PL 136
151	PL 139
151	PL 141
151	PL 145
151	A	.	A	G	PL 153
151	C	.	A	PL 152
152	A	.	A	G	PL 2- człowiek
152	A	.	A	G	PL 5- człowiek
151	PL 28- człowiek

	C A C G G G A C C C X X X X X X X X X	Majority
	330	340
250	.	AJ005581.1.
317	.	HM045511.1 type 4.
254	.	KF736984.1 type 3.
250	.	KJ941140.1 type 1.
246	.	MF062430.1 type 2.
249	.	PL 47
250	.	PL 8
250	.	PL 51
250	.	PL 54
250	.	PL 16
250	.	PL 62
250	.	PL 63
250	.	PL 65
250	.	PL 73
250	.	PL 74
250	.	PL 84
250	.	PL 85
248	.	PL 89
248	.	PL 91
250	.	PL 94
250	.	PL 99
251	.	PL 100
250	.	PL 101
250	.	PL 117
254	.	PL 136
250	.	PL 139
250	.	PL 141
250	.	PL 145
250	.	PL 153
250	.	PL 152
251	.	PL 2- człowiek
251	.	PL 5- człowiek
250	.	PL 28- człowiek

	X X X X X X X X X X X X X X X X X X X	Majority
	350	360
260	.	AJ005581.1.
337	A A G C A T A T C A G T A A A G G G A G	HM045511.1 type 4.
264	.	KF736984.1 type 3.
260	.	KJ941140.1 type 1.
256	.	MF062430.1 type 2.
259	.	PL 47
260	.	PL 8
260	.	PL 51
260	.	PL 54
260	.	PL 16
260	.	PL 62
260	.	PL 63
260	.	PL 65
260	.	PL 73
260	.	PL 74
260	.	PL 84
260	.	PL 85
258	.	PL 89
258	.	PL 91
260	.	PL 94
260	.	PL 99
261	.	PL 100
260	.	PL 101
260	.	PL 117
264	.	PL 136
260	.	PL 139
260	.	PL 141
260	.	PL 145
260	.	PL 153
260	.	PL 152
261	.	PL 2- człowiek
261	.	PL 5- człowiek
260	.	PL 28- człowiek

	X X X X X X X X X X X X X X X X X X X	Majority
	370	380
260		AJ005581.1.
357	G A G A A G A A A C C A A A T G G G A T	HM045511.1 type 4.
264		KF736984.1 type 3.
260		KJ941140.1 type 1.
256		MF062430.1 type 2.
259		PL 47
260		PL 8
260		PL 51
260		PL 54
260		PL 16
260		PL 62
260		PL 63
260		PL 65
260		PL 73
260		PL 74
260		PL 84
260		PL 85
258		PL 89
258		PL 91
260		PL 94
260		PL 99
261		PL 100
260		PL 101
260		PL 117
264		PL 136
260		PL 139
260		PL 141
260		PL 145
260		PL 153
260		PL 152
261		PL 2- człowiek
261		PL 5- człowiek
260		PL 28- człowiek

	X X X X X X X X X X X X X X X X X	Majority
	390	
260		AJ005581.1.
377	T G C C T G A G T A G C G G C G A	HM045511.1 type 4.
264		KF736984.1 type 3.
260		KJ941140.1 type 1.
256		MF062430.1 type 2.
259		PL 47
260		PL 8
260		PL 51
260		PL 54
260		PL 16
260		PL 62
260		PL 63
260		PL 65
260		PL 73
260		PL 74
260		PL 84
260		PL 85
258		PL 89
258		PL 91
260		PL 94
260		PL 99
261		PL 100
260		PL 101
260		PL 117
264		PL 136
260		PL 139
260		PL 141
260		PL 145
260		PL 153
260		PL 152
261		PL 2- człowiek
261		PL 5- człowiek
260		PL 28- człowiek

Ryc.8 Podstawienia nukleotydydowe w sekwencjach fragmentu genu ITS *E. cuniculi* amplikonów pozyskanych w badaniach własnych.

4.1.4. Wyniki badań serologicznych w kierunku *E. cuniculi*

Badaniu serologicznemu zostało poddanych losowo wybranych 38 zwierząt (3 chomiki, 2 myszy, 3 szczury i 30 kawii domowych) z dodatnimi wynikami PCR w kierunku *E. cuniculi*. Obecność przeciwciał stwierdzono u 13 kawii domowych (4, 8, 10, 48, 50, 52, 54, 55, 59, 73, 84, 85, 89), 3 chomików (98, 136, 152), jednego szczura (145), absorbancja próbek wynosiła w granicach (2,098 – 2,383) (Tabela 25).

Wśród seropozytywnych zwierząt u dwóch (4, 59) notowano zaburzenia ze strony układu wydalniczego (zapalenie pęcherza, przewlekła niewydolność nerek i nadmiar osadu w pęcherzu moczowym), u dwóch (52, 55) zaburzenia okulistyczne, także u dwóch (73, 54) zaburzenia neurologiczne, u siedmiu (10, 48, 98, 136, 145, 152) zaburzenia ze strony: układ rozrodczego, układu pokarmowego, układu ruchu, lub tarczycy, natomiast pięć osobników (8, 50, 84, 85, 89) nie wykazywało żadnych objawów klinicznych, a do Kliniki trafiły w celach profilaktycznych.

U zwierząt które manifestowały objawy ze strony układu nerwowego i moczowego w terapii został wdrożony fenbendazol w dawce 10 - 20 mg/kg m.c. Osobniki z zaburzeniami neurologicznymi padały z reguły w ciągu 1-2 dni od wystąpienia pierwszych objawów natomiast wszystkie zwierzęta wykazujące problemy związane z układem wydalniczym, w następstwie podjętego leczenia wróciły do zdrowia.

Lp.	ELISA	Absroban cja	PC R	Sekw e.	Lp.	ELISA	Absroban cja	PCR	Sekw e.
2	-	1,068	+	nb	84	+	2,485	+	+
4	+	2,175	+	nb	85	+	2,149	+	+
8	+	2,213	+	+	86	-	0,904	+	nb
9	-	0,792	+	nb	87	-	1,015	+	nb
10	+	2,155	+	nb	89	+	2,286	+	+
15	-	0,393	+	nb	90	-	1,067	+	nb
16	-	1,098	+	+	91	nb	-	+	+
17	-	1,000	+	nb	94	-	1,085	+	+
37	-	0,139	+	nb	98	+	2,319	+	nb
47	-	0,903	+	+	99	-	1,063	+	+
48	+	2,304	+	nb	100	-	1,000	+	+
50	+	2,157	+	nb	101	nb	-	+	+
51	nb	-	+	+	117	nb	-	+	+
52	+	2,206	+	nb	120	-	0,375	+	nb
54	+	2,267	+	+	126	-	0,889	+	nb
55	+	2,298	+	+	129	-	1,000	+	-
59	+	2,117	+	nb	130	-	0,632	+	-
62	nb	-	+	+	136	+	1,262	+	+
63	nb	-	+	+	139	nb	-	+	+
64	-	0,972	+	nb	141	nb	-	+	+
65	nb	-	+	+	145	+	2,098	+	+
73	+	2,383	+	+	150	-	1,159	+	-
74	-	1,000	+	+	152	+	2,297	+	+
					153	-	1,091	+	+

Tabela 25 Wyniki otrzymane od badanych gryzoni.

W grupie ludzi badaniu serologicznemu poddano 48 próbek surowic (28 z grupy 1 i 20 z grupy 2). Obecność przeciwciał dla *E. cuniculi* wykazano w próbkach 4 surowic pobranych od osób z grupy 1 (1, 3, 6, 7). (Tabela 26). Absorbancja tych próbek wynosiła kolejno 2,213, 2,351, 5,676, 2,075. U żadnego z dodatnich seroreagentów nie notowano objawów chorobowych.

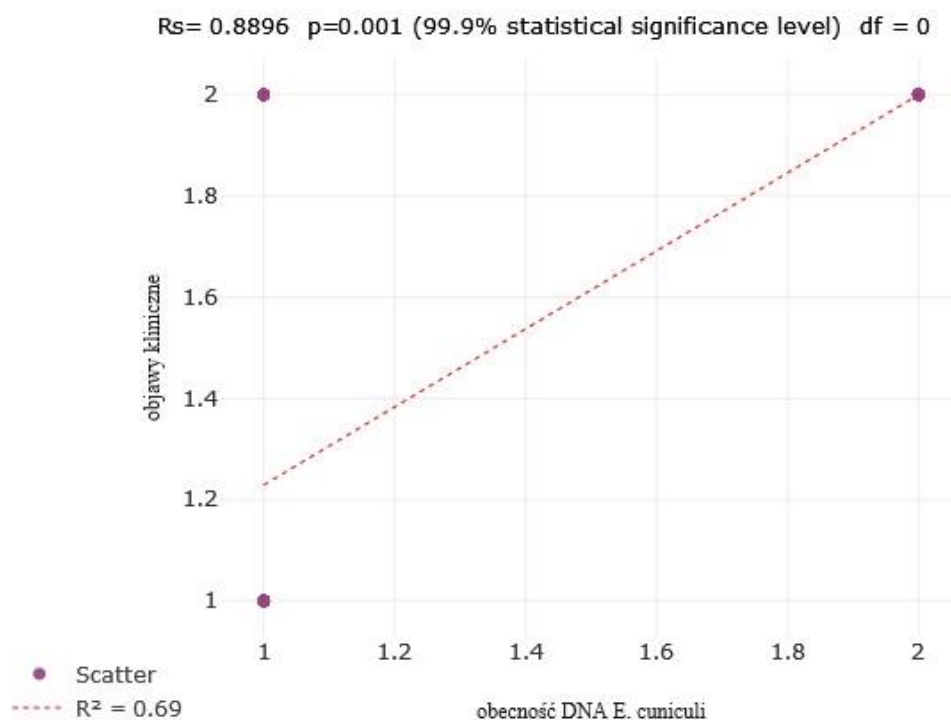
Lp.	ELISA	Absorbancja	PCR	Sekwe.	Lp.	ELISA	Absorbancja	PCR	Sekwe.
1	+	2,213	-	nb	15	-	0,840	-	nb
2	-	1,063	+	+	16	-	1,595	-	nb
3	+	2,351	-	nb	17	-	1,110	-	nb
4	-	1,127	-	nb	18	-	1,000	-	nb
5	-	1,383	+	+	19	-	0,826	-	nb
6	+	5,676	-	nb	20	-	0,886	-	nb
7	+	2,075	-	nb	21	-	0,794	-	nb
8	-	1,328	-	nb	22	-	1,127	-	nb
9	-	1,048	-	nb	23	-	1,000	-	nb
10	-	1,010	-	nb	24	-	0,887	-	nb
11	-	0,062	-	nb	25	-	0,919	-	nb
12	-	0,079	-	nb	26	-	0,716	-	nb
13	-	0,070	-	nb	27	-	0,962	-	nb
14	-	1,220	-	nb	28	-	1,069	+	+

Tabela 26 Wyniki własne otrzymane od ludzi grupy 1.

4.1.5. Analiza statystyczna wyników uzyskanych u zwierząt

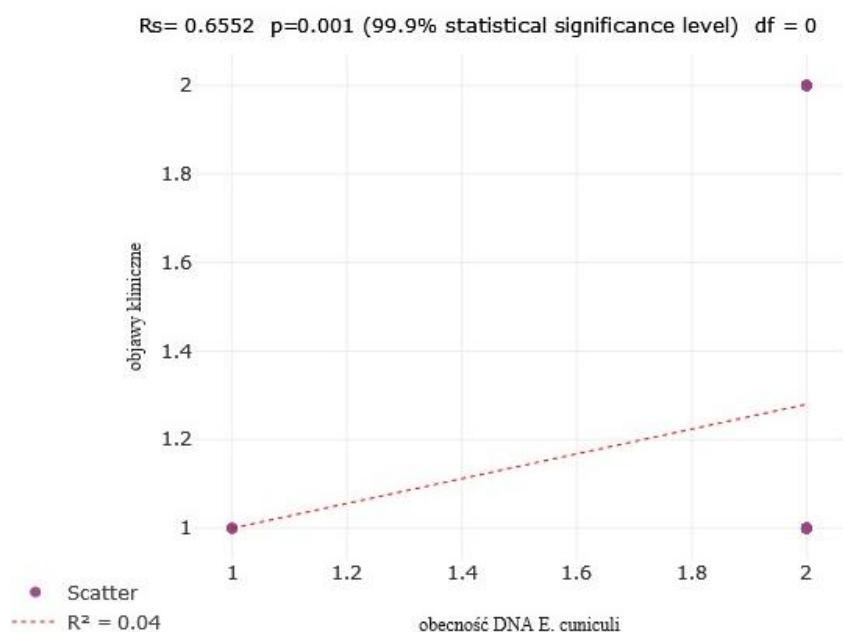
Analiza statystyczna przeprowadzona w poszczególnych grupach zwierząt (kawie, szczury, chomiki, szynszyle, koszatniczki i myszy) wykazała statystycznie istotne proporcje wyników dodatnich badania PCR u kawii ($p=0,0084$), natomiast ujemnych u szczurów ($p=0,0035$) i szynszyli ($p=0,003$). U chomików nie wykazano statystycznie istotnych proporcji wyników badania PCR ($p=0,2213$), natomiast koszatniczki i myszy stanowiły zbyt małą grupę do analizy statystycznej.

Ponadto u kawii, jako najbardziej licznej grupie przebadanych zwierząt, wykazano wysoką dodatnią korelację pomiędzy dodatnim wynikiem PCR a występowaniem objawów klinicznych ($r=0,8896$), które mogły być związane z zakażeniem *E. cuniculi* (Ryc. 9).

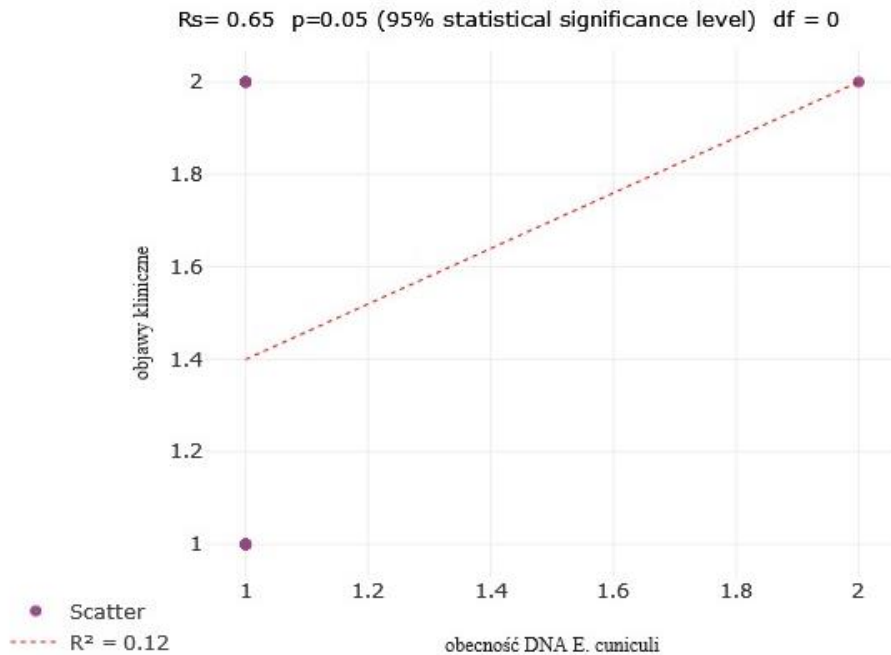


Ryc. 9 Zależność pomiędzy obecnością DNA *E. cuniculi*, a występowaniem objawów klinicznych u kawii,

Umiarkowaną korelację pomiędzy dodatnim wynikiem PCR a występowaniem objawów klinicznych wykazano u szczurów ($r=0,6552$) (Ryc.10) i szynszyli ($r=0,65$) (Ryc. 11).



Ryc. 10 Zależność pomiędzy obecnością DNA *E. cuniculi*, a występowaniem objawów klinicznych u szczurów.



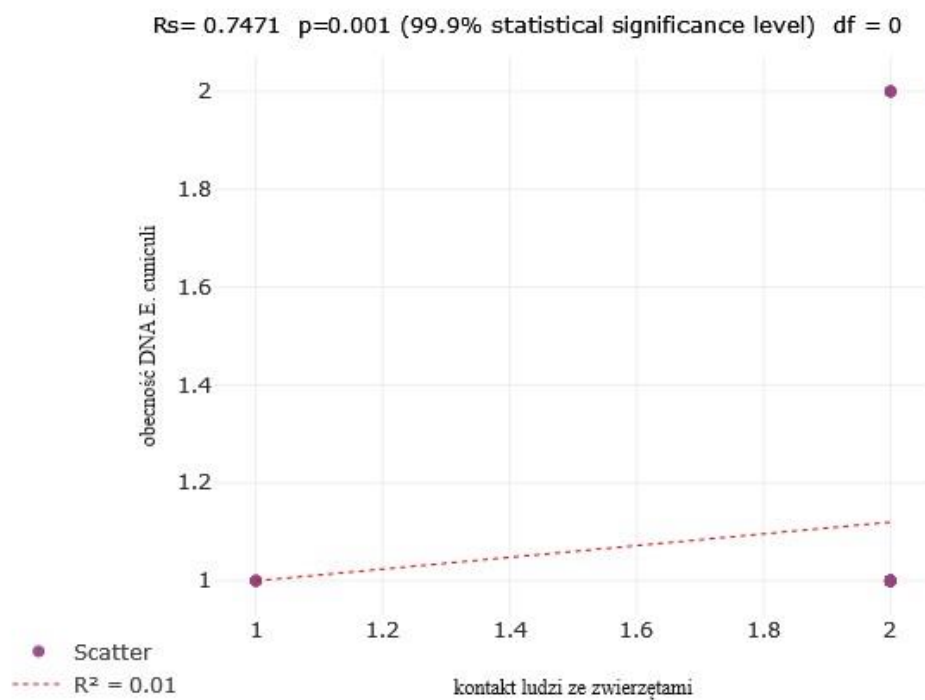
Ryc. 11 Zależność pomiędzy obecnością DNA *E. cuniculi*, a występowaniem objawów klinicznych u szynszyli.

Niemożliwe było określenie korelacji u koszatniczek (n=4) i myszy (n=3) z uwagi na wymaganą liczbę co najmniej 5 zwierząt w badanej grupie.

4.1.6. Analiza statystyczna wyników uzyskanych u ludzi

W przypadku ludzi (grupa I i II) analiza statystyczna wykazała brak istotnej różnicy (p=0,2553) pomiędzy osobami mającymi kontakt ze zwierzętami a występowaniem dodatniego wyniku PCR potwierdzającego zakażenie pasożytem.

Natomiast biorąc pod uwagę tylko grupę ludzi mających kontakt ze zwierzętami (grupa I) analiza statystyczna proporcji uzyskanych wyników dla lekarzy weterynarii (n=23) i stałych właścicieli (n=5) wykazała statystycznie istotną zależność (p=0,0031) pomiędzy rodzajem kontaktu (okazjonalnym u lekarzy weterynarii i stałym u właścicieli zwierząt) a występowaniem dodatniego (u właścicieli zwierząt) lub ujemnego (u lekarzy weterynarii) wyniku PCR w porównywanych grupach. (Ryc.12)



Ryc. 12 Zależność pomiędzy obecnością DNA *E. cuniculi*, a ludźmi mających kontakt ze zwierzętami.

4.2. Dyskusja

Zwierzęta domowe takie jak psy, koty czy gryzonie i króliki mogą stanowić rezerwuar *E. cuniculi* dla ludzi oraz innych zwierząt. Źródłem zakażenia może być także skażona tymi patogenami żywność lub woda. Wykazano, że ich spory są zdolne do przeżycia przez dłuższy czas w mleku pasteryzowanym pochodzącym od krów nosicieli *E. cuniculi*. Produkty pochodzenia zwierzęcego mogą być potencjalnym źródłem zakażenia dla ludzi, ponieważ mikrosporydia są patogenami niepodlegającymi kontroli spożywczej.

Spośród drobnych ssaków utrzymywanych jako zwierzęta towarzyszące, króliki są grupą w której prewalencja zakażeń *E. cuniculi* jest najwyższa, sięgając 71% [57]. Przypadki encefalitozoonozy opisywane są w populacji tych zwierząt na całym świecie zarówno u królików laboratoryjnych, domowych, jak i hodowlanych. Dzikie króliki (*Oryctolagus cuniculus*) są naturalnym gospodarzem *E. cuniculi* [185].

Prewalencja zakażeń na tle omawianych mikrosporydiów wśród gatunków drobnych ssaków różni się w zależności od regionu, z którego pochodzi badana grupa. Przykład królików domowych, które są najszerzej przebadane w tym kierunku wskazuje, że w Europie seroprewalencja w poszczególnych krajach wykazuje znaczne zróżnicowanie i wynosi: w Wielkiej Brytanii 23,1%, na Słowacji 65%, w Finlandii 29,1%, we Włoszech, 31,6% - 75,5% [159, 160, 186, 187, 188, 189]. W innych rejonach świata wskaźniki te są również wysokie

i wynoszą: w Iranie 59,6%, Korei 22,6% natomiast w Chinach 24,07%. [190, 192, 193]

Zakażeniu *E. cuniculi* ulegać mogą także zwierzęta towarzyszące. Monitoring serologiczny przeprowadzony w kierunku kunikulozy w populacji kotów pochodzących ze Stanów Zjednoczonych, wschodniej Słowacji i 3 rejonów Wielkiej Brytanii wykazał, iż seroprewalencja u tych zwierząt waha się w granicach 0 – 26,6% [162, 166, 167, 168, 193].

Badania własne wykazały, że wśród gryzoni domowych objętych obserwacjami (kawie domowe, szynszyle, szczury, koszatniczki, chomiki i myszach) zgłoszonych do Kliniki Chorób Zakaźnych, aż 57% wykazywało objawy kliniczne wskazujące na encefalitozoonozę lub było jej nosicielami. Kawie domowe są drugim gatunkiem zaraz po królikach, u których nosicielstwo *E. cuniculi* jest bardzo powszechne i wynosi nawet 68.5%. Wiele zwierząt w populacji może być bezobjawowymi nosicielami omawianych patogenów. Dla porównania wśród królików zjawisko nosicielstwa zostało określone na poziomie około 75%, co jest wynikiem zbliżonym do zanotowanego u kawii domowych. Tak wysoki poziom

zwierząt zakażonych mikrosporydiami może być spowodowany częstym łączeniem tych gatunków w sklepach zoologicznych i hodowlach. Są to zwierzęta bezwzględnie stadne, co predysponuje do szerzenia się zakażenia. Innym gatunkiem drobnych ssaków wysoce narażonym na infekcje są szynszyle oraz szczury. W badaniach własnych zakażenie potwierdzono u 25% przebadanych w kierunku encefalitozoonozy szczurów. Wskaźnik ten wydaje się być wysokim, tym bardziej, że przedstawiciele tego gatunku nie mają częstego kontaktu z królikami. Ponieważ są to zwierzęta wszystkożerne, wydaje się, że w ich przypadku najbardziej prawdopodobnym źródłem zakażenia jest pożywienie, a fakt, że są one również zwierzętami stadnymi ułatwia rozprzestrzenianie zarodników w grupie.

Zaskakujący wysoki wskaźnik zakażenia, wynoszący 36% uzyskano u chomików. W ich przypadku ciężko określić, jakie było główne źródło zakażenia. Chomiki nie są zwierzętami stadnymi, utrzymywane są wyłącznie w pojedynkę, a ich pożywienie jest inne od spożywanego przez króliki, świnki, szynszyle, czy szczury.

Głównymi zaburzeniami klinicznymi obserwowanymi u zwierząt objętych badaniami własnymi, u których potwierdzono kontakt z *Encephalitozoon* spp. były: objawy ze strony układu moczowego, narządu wzroku i układu nerwowego. Nie stwierdzono, istotnie statystycznego związku pomiędzy zakażeniami na tle *E. cuniculi*, a rozwojem nadczynności oraz niedoczynności tarczycy chorobami układu oddechowego, pokarmowego oraz rozrodczego niemniej, by móc zupełnie wykluczyć taką zależność konieczne są dalsze badania, przeprowadzone na większej grupie zwierząt.

Encefalitozoonoza przebiega najczęściej ostro lub przewlekłe, niemniej jednak możliwe są także zarówno zakażenia subkliniczne, jak i nadostre – kończące się upadkami. Sytuację taką obserwowano u jednej szynszyli, u której rozwinęły się ostre objawy neurologiczne, po czym w krótkim czasie doszło do upadku zwierzęcia. Nadostry przebieg choroby spowodowany może być zwiększoną wrażliwością pewnych gatunków zwierząt na infekcję. Tego typu sytuację opisywano np. u lemingów [149].

Z przeprowadzonych badań wynika, że u kawii domowych w przebiegu encefalitozoonozy rozwinąć się może szereg, niejednokrotnie ciężkich zaburzeń. W przypadku tego gatunku u zakażonych osobników notowano problemy ze strony układu moczowego (najczęściej była to przewlekła niewydolność nerek prowadząca w ciągu kilku miesięcy do śmierci zwierzęcia), rzadziej problemy neurologiczne i okulistyczne.

U pozostałych gryzoni tj. szczurów, chomików, myszy, koszatniczek przebieg choroby określano jako subkliniczny.

Niewątpliwie na przebieg choroby wpływ ma genotyp zarazka, który odpowiedzialny jest zakażenie. W przypadku genotypu III u zwierząt przebieg choroby jest najczęściej ostry, kończący się upadkami [149, 194, 195]. Infekcje genotypami I i II, przybierają z reguły formę subkliniczną [196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204].

To, że *E. cuniculi* jest szeroko rozpowszechniony w populacji gryzoni, ma swoje odzwierciedlenie w wynikach badań własnych. DNA tego patogenu było nagminnie wykrywane także u zwierząt zgłaszanych do Kliniki w celach profilaktycznych.

Większość dostępnych publikacji dotyczących genotypowania *E. cuniculi* odnosi się do patogenów izolowanych od zwierząt dzikich, psów, kotów, królików oraz ludzi. Doniesienia z centralnej Europy skupiają się na zwierzętach dzikich, u których w zdecydowanej przewadze dochodzi do zakażenia genotypem II. Perc-Matysiak i in. badali obecność tego mikrosporydium u dziko żyjących gryzoni z Polski, Czech i Słowacji, identyfikując jako najczęstszy gatunek *E. cuniculi* ten, o genotypie II (92,5%), a następnie *E. cuniculi* o genotypie I (1,5%) i III (6,0%) [206].

Od dzikich szczurów z Wielkiej Brytanii i Japonii Muller-Doblies i in również wyizolowali „mysi szczep” *E. cuniculi* (szczep II) [206, 207]. W przypadku norweskich i finlandzkich lisów u których również wystąpił ten genotyp [206, 208] uznano że potencjalnym źródłem zakażenia dla tych zwierząt były dzikie gryzonie [193] - podobnie jak u kotów w Wielkiej Brytanii. Ciekawym spostrzeżeniem było to, że zwierzęta zakażone tym genotypem wykazywały głównie objawy neurologiczne, takie jak: agresję, kanibalizm i niedowład kończyn miednicznych, a także postępującą utratę wagi oraz ropne zapalenie spojówek.

Dane literaturowe wskazują, że genotyp I *E. cuniculi* atakuje głównie króliki. [209, 210]. W badaniach własnych, większość zakażonych mikrosporydiami gryzoni pochodziła ze sklepów zoologicznych gdzie były narażone na kontakt bezpośredni lub pośredni z królikami (poprzez obsługę sklepu, środki transportu, klatki czy zanieczyszczone pożywienie lub wodę). W tym przypadku można więc uznać, że króliki były źródłem infekcji dla gryzoni, stąd obecność u nich genotypu I *E. cuniculi*, który w warunkach naturalnych znacznie rzadziej atakuje te zwierzęta, niż np. genotyp II. W tym miejscu należy także stwierdzić, że genotyp I *E. cuniculi* uznawany i opisywany jest jako najłatwiej rozprzestrzeniający się [211] i poza gryzoniami izolowano go także od rodzimych psów i kotów [212].

Podobnych obserwacji do przedstawionych w niniejszym opracowaniu dokonali badacze japońscy, którzy badając pod kątem encefalitozoonozy dzikie populacje gryzoni

także wykazali, iż najczęściej izolowanym był genotyp I zarazka. Może to wskazywać, iż na występowanie tego genotypu w populacjach gryzoni wpływ mają nie tylko takie czynniki jak środowisko życia, czy kontakt z królikami i innymi drobnymi ssakami, ale także obszar geograficzny, z którego pochodzą zakażone osobniki [202].

W badaniach własnych przeprowadzono zarówno monitoring molekularny, jak i serologiczny encefalitozoonozy w wybranych grupach drobnych ssaków. Obecność immunoglobulin dla omawianych drobnoustrojów wykryto u 5 kawii domowych zgłoszonych na wizyty profilaktyczne, niewykazujących żadnych objawów klinicznych oraz u 3 chomików, jednego szczura i 8 kawii domowych, z dodatnim wynikiem PCR, u których notowano różnego rodzaju zaburzenia stanu zdrowia. Taka sytuacja z jednej strony może wskazywać, iż patogen jest w stanie wywoływać chorobę o różnym obrazie klinicznym, bądź też zupełnie odwrotnie, występowanie chorób i osłabienie organizmu może być czynnikiem predysponującym do rozwoju encefalitozoonozy.

Encefalitozoonoza jest chorobą odzwierzęcą, w związku z tym identyfikacja gatunków zwierząt domowych będących nosicielami *E. cuniculi* oraz poziom ich narażenia na zakażenie jest bardzo istotny w opracowaniu metod zapobiegania chorobie u ludzi. Dotychczas jako na główne źródło zakażenia dla ludzi wskazywano króliki. Pierwsze przypadki zachorowania na encefalitozoonozę u ludzi zostały opisane w 1959 r. [213] i 1987 r. [214]. Dane literaturowe wskazują, że choroba dotyka głównie osoby z upośledzoną odpornością [215] - pacjentów z chorobami nowotworowymi, osoby po przeszczepach, a także osoby starsze i dzieci [216, 217, 218]. U osób po zabiegu wszczepienie endoprotez bioder lub kolan utrudnione gojenie się ran wiązano z ich zanieczyszczeniem zarodnikami *E. cuniculi*. [219]. Zakażenie osób immunokompletnych najczęściej ma charakter subkliniczny [58]. Z uwagi na potencjalne zagrożenie, jakie stanowi choroba dla zdrowia i życia ludzi, badania nad patogenezą i jej leczeniem wydają się być bardzo istotne. U właścicieli ptaków z dodatnimi wynikami PCR dla *Encephalitozoon* za główny czynnik rozwoju zakażenia uznaje się właśnie kontakt z tymi zwierzętami [220]. I chociaż w ich przypadku infekcje mikrosporydiami tylko w sporadycznych przypadkach mogą kończyć się rozwojem pełnoobjawowej encefalitozoonozy, to mogą one zaostrzać przebieg innych stanów chorobowych, jak np. cukrzyca.

Spośród 28 osób, które wzięły udział w badaniach własnych i które miały kontakt z królikami od co najmniej roku, w organizmie 3 badanie molekularne wykazało obecność DNA grzybów. Analiza sekwencji uzyskanych amplikonów wykazała, że u jednej osoby doszło do zakażenia genotypem I. W przypadku pozostałych dwóch pacjentów nie można

było sklasyfikować genotypu mikrosporydiów odpowiedzialnych za infekcję. Uzyskane sekwencje produktów PCR pozyskanych od tych osób nie wykazywały wysokiego podobieństwa z żadną ze wzorcowych sekwencji wykorzystanych w badaniach własnych. Osoby te są aktualnie właścicielami gryzoni, a w przeszłości posiadały zwierzęta z aktywną formą encefalitozoonozy. Co ciekawe u żadnej z nich nie wykryto w surowicy przeciwciał dla *Encephalitozoon*. Sytuacja taka może być tłumaczona tym, że zakażenie zostało rozpoznane na wczesnym jego etapie, gdy nie doszło jeszcze do pobudzenia układu immunologicznego gospodarza przez patogen i wytworzenia swoistych dla niego przeciwciał, bądź też pewnego rodzaju kamuflażem, do którego zdolne są mikrosporydia, polegającym na pochłonięciu tych drobnoustrojów przez makrofagi i brakiem ich prezentowania układowi immunologicznemu gospodarza.

Badania serologiczne wykazały obecność przeciwciał dla *E. cuniculi* w surowicy 4 lekarzy weterynarii (z ujemnym wynikiem PCR). U żadnego z nich nie notowano objawów klinicznych choroby, co może sugerować zakażenie subkliniczne, lub też krzyżową reakcję w testach serologicznych pomiędzy antygenem *E. cuniculi*, a przeciwciałami dla innych gatunków rodzaju *Encephalitozoon spp.*

Podobne obserwacje poczyniono w Turcji, gdzie przeprowadzono monitoring serologiczny encefalitozoonozy wśród osób pracujących na fermie królików, niezdradzających żadnych objawów klinicznych choroby. Spośród 6 badanych osób badanie serologiczne potwierdziło obecność przeciwciał tylko w surowicy jednej z nich [221].

Człowiek ulega dość łatwo zakażeniu *Encephalitozoon*, a możliwymi drogami infekcji są: droga pokarmowa, kropelkowa oraz wertykalna (poprzez łożysko). W myśl idei „One Medicine, One Health, One World”, wskazane jest prowadzenie stałego monitoringu występowania mikrosporydiów w środowisku oraz identyfikacja bezobjawowych nosicieli tych drobnoustrojów. Choroby wywoływane przez mikrosporydia to wciąż mało zgłębiany temat. Wspomniane mikroorganizmy są powszechnie spotykane w środowisku, co zwiększa potencjalne ryzyko ekspozycji ludzi i zwierząt na ten patogen. Encefalitozoonoza jest chorobą o „wielu twarzach”. Ponieważ jej objawy mogą być bardzo różnorodne, często nie są one wiązane z infekcjami *E. cuniculi* jako ich przyczyną pierwotną. Wiedza na temat możliwego przebiegu klinicznego encefalitozoonozy oraz identyfikacja zwierząt, które mogą stanowić rezerwuar tego patogenu jest istotna dla jej skutecznej diagnostyki, profilaktyki i terapii oraz ochrony zdrowia publicznego.

5. Stwierdzenia i wnioski

Stwierdzenia

1. Wśród gryzoni kawie domowe są zwierzętami o najwyższej prevalencji zakażeń *Encephalitozoon cuniculi* - wynosi ona 73%
2. U pozostałych gatunków zwierząt objętych badaniem prevalencja zakażeń wynosiła: szynszyle 9%, szczury 25%, chomiki 36%, koszatniczki 50%, myszy 67%.
3. Dominującym genotypem *E. cuniculi*, odpowiedzialnym za zakażenie gryzoni objętych badaniami własnymi był genotyp I.
4. Najczęściej u zwierząt zakażonych *E. cuniculi* obserwowano objawy kliniczne ze strony układu moczowego, nerwowego i zmiany okulistyczne.
5. U wszystkich gatunków gryzoni encefalitozoonza może mieć przebieg subkliniczny.
6. Badanie serologiczne 38 surowic gryzoni w kierunku *E. cuniculi* wykazało obecność przeciwciał w 17 przypadkach (44,7%)
7. Spośród 28 ludzi znajdujących się w grupie ryzyka rozwoju encefalitozoonozy, badaniem molekularnym w organizmie 3 z nich (10%) potwierdzono obecność materiału genetycznego mikrosporydiów. W badaniu serologicznym tej samej grupy obecność przeciwciał dla *Encephalitozoon* potwierdzono u 4 osób (14%).

Wnioski

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Gryzonie i króliki stanowią istotny rezerwuar *Encephalitozoon cuniculi*. Prewalencja zakażeń tymi mikrosporydiami u poszczególnych gatunków zwierząt objętych badaniami wyniosła: kawy domowe 73%, chomiki 36%, szczury 25%, szynszyle 9%, koszatniczki 50%, myszy 67%.
- Encefalitozoonozę należy brać pod uwagę w diagnostyce różnicowej chorób gryzoni przebiegających z objawami neurologicznymi, zaburzeniami ze strony narządu wzroku oraz układu wydalniczego
- Genotypem *E. cuniculi* najczęściej stwierdzanym u rodzimych gryzoni był genotyp I wykazujący wysokie podobieństwo z sekwencją AJ005581.1
- Fakt, iż w organizmie 3 osób objętych badaniami, mających kontakt z gryzoniami stwierdzono obecność DNA *E. cuniculi*, a u kolejnych 4 obecność przeciwciał dla tego patogenu wskazuje, iż ludzie, zwłaszcza właściciele gryzoni są narażeni na zakażenie tym patogenem.

6. Bibliografia

1. Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., & Gabaldón, T. (2012). Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC biology*, 10, 47. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-47>
2. Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes, E. J., 3rd, Torres-Martinez, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J., & Heitman, J. (2008). Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Current biology* : CB, 18(21), 1675–1679. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.030>
3. Weiss, L. M., & Vossbrinck, C. R. (1998). Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. *Advances in parasitology*, 40, 351–395. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60127-x](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60127-x)
4. Corsaro, D., Walochnik, J., Venditti, D., Steinmann, J., Müller, K. D., & Michel, R. (2014). Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage Rozellomycota. *Parasitology research*, 113(5), 1909–1918. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3838-4>
5. Keeling, P. J., Burki, F., Wilcox, H. M., Allam, B., Allen, E. E., Amaral-Zettler, L. A., Armbrust, E. V., Archibald, J. M., Bharti, A. K., Bell, C. J., Beszteri, B., Bidle, K. D., Cameron, C. T., Campbell, L., Caron, D. A., Cattolico, R. A., Collier, J. L., Coyne, K., Davy, S. K., Deschamps, P., ... Worden, A. Z. (2014). The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing. *PLoS biology*, 12(6), e1001889. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001889>
6. 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 the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414(6862), 450–453. <https://doi.org/10.1038/35106579>
7. Corradi N. (2015). Microsporidia: Eukaryotic Intracellular Parasites Shaped by Gene Loss and Horizontal Gene Transfers. *Annual review of microbiology*, 69, 167–183. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104136>
8. Corradi, N., Akiyoshi, D. E., Morrison, H. G., Feng, X., Weiss, L. M., Tzipori, S., & Keeling, P. J. (2007). Patterns of genome evolution among the microsporidian parasites *Encephalitozoon cuniculi*, *Antonosporea locustae* and *Enterocytozoon bieneusi*. *PloS one*, 2(12), e1277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001277>
9. Corradi, N., Pombert, J. F., Farinelli, L., Didier, E. S., & Keeling, P. J. (2010). The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature communications*, 1, 77. <https://doi.org/10.1038/ncomms1082>
10. Corradi, N., & Selman, M. (2013). Latest progress in microsporidian genome research. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 60(3), 309–312. <https://doi.org/10.1111/jeu.12030>

11. Corradi, N., & Slamovits, C. H. (2011). The intriguing nature of microsporidian genomes. *Briefings in functional genomics*, 10(3), 115–124. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elq032>
12. Brugère, J. F., Cornillot, E., Méténier, G., Bensimon, A., & Vivarès, C. P. (2000). *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) genome: physical map and evidence for telomere-associated rDNA units on all chromosomes. *Nucleic acids research*, 28(10), 2026–2033. <https://doi.org/10.1093/nar/28.10.2026>
13. Brugère, J. F., Cornillot, E., Méténier, G., & Vivarès, C. P. (2000). Occurrence of subtelomeric rearrangements in the genome of the microsporidian parasite *Encephalitozoon cuniculi*, as revealed by a new fingerprinting procedure based on two-dimensional pulsed field gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 21(12), 2576–2581. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(20000701\)21:12<2576::AID-ELPS2576>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1522-2683(20000701)21:12<2576::AID-ELPS2576>3.0.CO;2-D)
14. Selman, M., Sak, B., Kváč, M., Farinelli, L., Weiss, L. M., & Corradi, N. (2013). Extremely reduced levels of heterozygosity in the vertebrate pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Eukaryotic cell*, 12(4), 496–502. <https://doi.org/10.1128/EC.00307-12>
15. Cuomo, C. A., Desjardins, C. A., Bakowski, M. A., Goldberg, J., Ma, A. T., Becnel, J. J., Didier, E. S., Fan, L., Heiman, D. I., Levin, J. Z., Young, S., Zeng, Q., & Troemel, E. R. (2012). Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. *Genome research*, 22(12), 2478–2488. <https://doi.org/10.1101/gr.142802.112>
16. Didier, E. S., & Weiss, L. M. (2011). Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Current opinion in infectious diseases*, 24(5), 490–495. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834aa152>
17. Didier E. S. (2005). Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta tropica*, 94(1), 61–76. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.01.010>
18. Kicia, M., Szydłowicz, M., Cebulski, K., Jakuszko, K., Piesiak, P., Kowal, A., Sak, B., Krajewska, M., Hendrich, A. B., Kváč, M., & Kopacz, Ž. (2019). Symptomatic respiratory *Encephalitozoon cuniculi* infection in renal transplant recipients. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 79, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.10.016>
19. Mathis, A., Weber, R., & Deplazes, P. (2005). Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical microbiology reviews*, 18(3), 423–445. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.423-445.2005>
20. Shadduck, J. A., Watson, W. T., Pakes, S. P., & Cali, A. (1979). Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *The Journal of parasitology*, 65(1), 123–129
21. Sokolova, O. I., Demyanov, A. V., Bowers, L. C., Didier, E. S., Yakovlev, A. V., Skarlato, S. O., & Sokolova, Y. Y. (2011). Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *Journal of clinical microbiology*, 49(6), 2102–2108. <https://doi.org/10.1128/JCM.02624-10>

22. Bohne, W., Böttcher, K., & Gross, U. (2011). The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 301(5), 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.006>
23. Künzel, F., & Fisher, P. G. (2018). Clinical Signs, Diagnosis, and Treatment of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 21(1), 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2017.08.002>
24. Li, X., Palmer, R., Trout, J. M., & Fayer, R. (2003). Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *The Journal of parasitology*, 89(1), 185–188. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0185:IOMSSI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0185:IOMSSI]2.0.CO;2)
25. 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. *Journal of food protection*, 65(2), 378–382. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.2.378>
26. 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. *Applied and environmental microbiology*, 73(12), 4071–4073. <https://doi.org/10.1128/AEM.00477-07>
27. Wang, S., Yao, Z., Li, L., Pan, Y., Li, P., Nan, X., Xie, Q., & Zhang, Z. (2018). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* among domestic rabbits in central China. *Séroprévalence de Toxoplasma gondii et d'Encephalitozoon cuniculi chez les lapins domestiques en Chine centrale. Parasite (Paris, France)*, 25, 9. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018010>
28. Kváč, M., Tomanová, V., Samková, E., Koubová, J., Kotková, M., Hlásková, L., McEvoy, J., & Sak, B. (2016). *Encephalitozoon cuniculi* in Raw Cow's Milk Remains Infectious After Pasteurization. *Foodborne pathogens and disease*, 13(2), 77–79. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2036>
29. 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 pathogens and disease*, 16(6), 394–398. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2569>
30. Weiss LM, Bechnel JJ. (2014). *Microsporidia: pathogens of opportunity*. Wiley Blackwell, Oxford, United Kingdom
31. Becnel, J.J. and Andreadis, T.G. (1999) *Microsporidia in insects*. In Wittner, M. and Weiss, L.M. Eds., *The Microsporidia and Microsporidiosis*, ASM Press, Washington DC, p. 1–6
32. Fries, I. (1993). *Nosema Apis*—A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World*, 74(1), 5–19. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1993.11099149>

33. Kent, M.L., Elliott, D.G., Groff, J.M., & Hedrick, R.P. (1989). *Loma salmonae* (Protozoa: Microsporida) infections in seawater reared coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 80, 211-222
34. Lom J. (2002). A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Systematic parasitology*, 53(2), 81–99. <https://doi.org/10.1023/a:1020422209539>
35. Overstreet, R.M. (1973). Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts. *Aquaculture*, 2, 105-140
36. Shaw, R. W. (1999). Fish microsporidia. In Wittner, M. and Weiss, L.M. Eds., *Microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C, p. 447-501
37. Cali, A., Becnel, J.J., Takvorian, P.M. (2017). Microsporidia. In: Archibald, J., Simpson, A., Slamovits, C. (eds) *Handbook of the Protists*. Springer, Cham, p 1559–1618 https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0_27
38. Meyers, W.M., Firpo, A., & Wear, D. (2011). Topics on the Pathology of Protozoan and Invasive Arthropod Diseases. In Meyers WM, Firpo A, Wear DJ (ed) 3rd ed. *Armed Forces Institute of Pathology*, Washington, DC, p 61–76.
39. Keohane E, Weiss LM (1999) The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In: Wittner M, Weiss LM (eds) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC, pp 196–224
40. Weidner E. (1976). The microsporidian spore invasion tube. The ultrastructure, isolation, and characterization of the protein comprising the tube. *The Journal of cell biology*, 71(1), 23–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.71.1.23>
41. Docker, M. F., Kent, M. L., Hervio, D. M., Khattra, J. S., Weiss, L. M., Cali, A., & Devlin, R. H. (1997). Ribosomal DNA sequence of *Nucleospora salmonis* Hedrick, Groff and Baxa, 1991 (Microsporea:Enterocytozoonidae): implications for phylogeny and nomenclature. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 44(1), 55–60. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05692.x>
42. Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Longshaw, M., & Feist, S. W. (2007). *Enterospora canceri* n. gen., n. sp., intranuclear within the hepatopancreatocytes of the European edible crab *Cancer pagurus*. *Diseases of aquatic organisms*, 75(1), 61–72. <https://doi.org/10.3354/dao075061>
43. Freeman, M. A., & Sommerville, C. (2009). *Desmozoon lepeophtherii* n. gen., n. sp., (Microsporidia: Enterocytozoonidae) infecting the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Parasites & vectors*, 2(1), 58. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-58>.
44. Palenzuela, O., Redondo, M. J., Cali, A., Takvorian, P. M., Alonso-Naveiro, M., Alvarez-Pellitero, P., & Sitjà-Bobadilla, A. (2014). A new intranuclear microsporidium, *Enterospora nucleophila* n. sp., causing an emaciative syndrome in a piscine host (*Sparus aurata*), prompts the redescription of the family Enterocytozoonidae. *International journal for parasitology*, 44(3-4), 189–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.10.005>

45. Bigliardi, E., & Sacchi, L. (2001). Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and infection*, 3(5), 373–379. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01393-4](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01393-4)
46. Fries, I., Paxton, R.J., Tengö, J., Slemenda, S.B., Silva, A.J., & Pieniżek, N.J. (1999). Morphological and molecular characterization of *Antonosporea scoticae* n. gen., n. sp (Protozoa, Microsporidia) a parasite of the communal bee, *Andrena scotica* Perkins, 1916 (Hymenoptera, Andrenidae). *European Journal of Protistology*, 35, 183-193. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(99\)80036-4](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(99)80036-4).
47. Bohne, W., Ferguson, D. J., Kohler, K., & Gross, U. (2000). Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infection and immunity*, 68(4), 2268–2275. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.2268-2275.2000>.
48. Vavra, J. 1976. Structure of the microsporidia. In: J. Vavra & V. Sprague (ed.), *Biology of the Microsporidia*. Vol. 1, *Comparative Pathobiology*. Plenum Press, New York, NY. p. 1–85. <https://doi.org/10.1128/9781555818227.ch6>
49. Yang, D., Pan, L., Chen, Z., Du, H., Luo, B., Luo, J., & Pan, G. (2018). The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes. *Experimental parasitology*, 187, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.007>
50. Beznoussenko, G. V., Dolgikh, V. V., Seliverstova, E. V., Semenov, P. B., Tokarev, Y. S., Trucco, A., Micaroni, M., Di Giandomenico, D., Auinger, P., Senderskiy, I. V., Skarlato, S. O., Snigirevskaya, E. S., Komissarchik, Y. Y., Pavelka, M., De Matteis, M. A., Luini, A., Sokolova, Y. Y., & Mironov, A. A. (2007). Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function. *Journal of cell science*, 120(Pt 7), 1288–1298. <https://doi.org/10.1242/jcs.03402>
51. Wasson, K., & Peper, R. L. (2000). Mammalian microsporidiosis. *Veterinary pathology*, 37(2), 113–128. <https://doi.org/10.1354/vp.37-2-113>
52. Latney, L. V., Bradley, C. W., & Wyre, N. R. (2014). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: diagnosis and optimal management. *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.)*, 5, 169–180. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S49842>.
53. Dalboni, L. C., Alvares Saraiva, A. M., Konno, F. T. C., Perez, E. C., Codeceira, J. F., Spadacci-Morena, D. D., & Lallo, M. A. (2021). *Encephalitozoon cuniculi* takes advantage of efferocytosis to evade the immune response. *PloS one*, 16(3), e0247658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247658>.
54. Fasshauer, V., Gross, U., & Bohne, W. (2005). The parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. *Eukaryotic cell*, 4(1), 221–224. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.221-224.2005>
55. Wright, J. H., & Craighead, E. M. (1922). Infectious motor paralysis in young rabbits. *The Journal of experimental medicine*, 36(1), 135–140. <https://doi.org/10.1084/jem.36.1.135>.

56. Ozkan, O., Ozkan, A. T., & Zafer, K. (2011). Encephalitozoonosis in New Zealand rabbits and potential transmission risk. *Veterinary parasitology*, 179(1-3), 234–237. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.007>.
57. Valencakova, A., Balent, P., Petrovova, E., Novotny, F., & Luptakova, L. (2008). Encephalitozoonosis in household pet Nederland Dwarf rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary parasitology*, 153(3-4), 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.047>.
58. Ditrich, O., Chrdle, A., Sak, B., Chmelík, V., Kubále, J., Dyková, I., & Kvác, M. (2011). Encephalitozoon cuniculi genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *Journal of clinical microbiology*, 49(7), 2769–2771. <https://doi.org/10.1128/JCM.00620-11>.
59. Levkutová, M., Hípiková, V., Faitelzon, S., Benath, G., Paulík, S., & Levkut, M. (2004). Prevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in horses in the Israel. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 11(2), 265–267
60. Snowden, K., & Logan, K. (1999). Molecular identification of encephalitozoon hellem in an ostrich. *Avian diseases*, 43(4), 779–782
61. Didier, E. S., Visvesvara, G. S., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., De Groote, M. A., & Vossbrinck, C. R. (1996). A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to Encephalitozoon cuniculi III, originally isolated from domestic dogs. *Journal of clinical microbiology*, 34(11), 2835–2837. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.11.2835-2837.1996>
62. 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. *Journal of clinical microbiology*, 39(6), 2248–2253. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2248-2253.2001>
63. Cox, J. C., Hamilton, R. C., & Attwood, H. D. (1979). An investigation of the route and progression of Encephalitozoon cuniculi infection in adult rabbits. *The Journal of protozoology*, 26(2), 260–265. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1979.tb02776.x>
64. Fuentealba, I. C., Mahoney, N. T., Shadduck, J. A., Harvill, J., Wicher, V., & Wicher, K. (1992). Hepatic lesions in rabbits infected with Encephalitozoon cuniculi administered per rectum. *Veterinary pathology*, 29(6), 536–540. <https://doi.org/10.1177/030098589202900608>
65. Harcourt-Brown, F. M. (2004, April). Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. In *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* (Vol. 13, No. 2, pp. 86-93). WB Saunders..
66. Wicher, V., Baughn, R. E., Fuentealba, C., Shadduck, J. A., Abbruscato, F., & Wicher, K. (1991). Enteric infection with an obligate intracellular parasite, Encephalitozoon cuniculi, in an experimental model. *Infection and immunity*, 59(7), 2225–2231. <https://doi.org/10.1128/iai.59.7.2225-2231.1991>

67. Csokai, J., Gruber, A., Künzel, F., Tichy, A., & Joachim, A. (2009). Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitology research*, 104(3), 629–635. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1239-2>
68. Künzel, F., & Joachim, A. (2010). Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology research*, 106(2), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1679-3>
69. Didier, E. S., Visvesvara, G. S., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., De Groote, M. A., & Vossbrinck, C. R. (1996). A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *Journal of clinical microbiology*, 34(11), 2835–2837. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.11.2835-2837.1996>
70. Kucerova, Z., Sokolova, O. I., Demyanov, A. V., Kvac, M., Sak, B., Kvetonova, D., & Secor, W. E. (2011). Microsporidiosis and Cryptosporidiosis in HIV/AIDS Patients in St. Petersburg, Russia: Serological identification of microsporidia and *Cryptosporidium parvum* in sera samples from HIV/AIDS patients. *AIDS research and human retroviruses*, 27(1), 13–15. <https://doi.org/10.1089/aid.2010.0132>
71. Didier, E. S., & Weiss, L. M. (2006). Microsporidiosis: current status. *Current opinion in infectious diseases*, 19(5), 485–492. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244055.46382.23>.
72. Kicia, M., Sędzimirska, M., Sak, B., Kváč, M., Wesołowska, M., Hendrich, A. B., & Kopacz, Ż. (2018). Respiratory microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bienersi* in an HIV-negative hematopoietic stem cell transplant recipient. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 77, 26–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.07.021>.
73. George, B., Coates, T., McDonald, S., Russ, G., Cherian, S., Nolan, J., & Brealey, J. (2012). Disseminated microsporidiosis with *Encephalitozoon* species in a renal transplant recipient. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, 17 Suppl 1, 5–8. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2012.01580.x>
74. Kelkar, R., Sastry, P. S., Kulkarni, S. S., Saikia, T. K., Parikh, P. M., & Advani, S. H. (1997). Pulmonary microsporidial infection in a patient with CML undergoing allogeneic marrow transplant. *Bone marrow transplantation*, 19(2), 179–182. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1700536>
75. Mohindra, A. R., Lee, M. W., Visvesvara, G., Moura, H., Parasuraman, R., Leitch, G. J., Xiao, L., Yee, J., & del Busto, R. (2002). Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*, 4(2), 102–107. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.2002.01011.x>
76. Nagpal, A., Pritt, B. S., Lorenz, E. C., Amer, H., Nasr, S. H., Cornell, L. D., Iqbal, S., & Wilhelm, M. P. (2013). Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient: case report and review of the literature. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*, 15(5), 526–532. <https://doi.org/10.1111/tid.12119>

77. Orenstein, J. M., Russo, P., Didier, E. S., Bowers, C., Bunin, N., & Teachey, D. T. (2005). Fatal pulmonary microsporidiosis due to *encephalitozoon cuniculi* following allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Ultrastructural pathology*, 29(3-4), 269–276. <https://doi.org/10.1080/01913120590951257>.
78. Teachey, D. T., Russo, P., Orenstein, J. M., Didier, E. S., Bowers, C., & Bunin, N. (2004). Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*, 33(3), 299–302. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704327>
79. Özkoç, S., Bayram Delibaş, S., & Akısü, Ç. (2016). Evaluation of pulmonary microsporidiosis in iatrogenically immunosuppressed patients. İyatrojenik immün baskılanmış hastalarda pulmoner mikrosporidiosisin değerlendirilmesi. *Tuberkuloz ve toraks*, 64(1), 9–16. <https://doi.org/10.5578/tt.10207>
80. Valencakova, A., & Halanova, M. (2012). Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.11.004>
81. Magone, K., Luckenbill, D., & Goswami, T. (2015). Metal ions as inflammatory initiators of osteolysis. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 135(5), 683–695. <https://doi.org/10.1007/s00402-015-2196-8>
82. Jämsen, E., Kouri, V. P., Olkkonen, J., Cör, A., Goodman, S. B., Konttinen, Y. T., & Pajarinen, J. (2014). Characterization of macrophage polarizing cytokines in the aseptic loosening of total hip replacements. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 32(9), 1241–1246. <https://doi.org/10.1002/jor.22658>
83. Didier, E. S., Snowden, K. F., & Shaddock, J. A. (1998). Biology of microsporidian species infecting mammals. *Advances in parasitology*, 40, 283–320. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60125-6](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60125-6)
84. Franzen, C., Müller, A., Hegener, P., Salzberger, B., Hartmann, P., Fätkenheuer, G., Diehl, V., & Schrappe, M. (1995). Detection of microsporidia (*Enterocytozoon bienersi*) in intestinal biopsy specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2294–2296. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2294-2296.1995>
85. Gamboa-Dominguez, A., De Anda, J., Donis, J., Ruiz-Maza, F., Visvesvara, G. S., & Diliz, H. (2003). Disseminated *encephalitozoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation*, 75(11), 1898–1900. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000064623.57821.22>.
86. 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. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 10(1), 68–77

87. 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 cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 15(5), 577–583. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880566>
88. Costa, S. F., & Weiss, L. M. (2000). Drug treatment of microsporidiosis. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 3(6), 384–399. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0174>
89. Moura, H., Sodre, F. C., Bornay-Llinares, F. J., Leitch, G. J., Navin, T., Wahlquist, S., Bryan, R., Meseguer, I., & Visvesvara, G. S. (1999). Detection by an immunofluorescence test of *Encephalitozoon intestinalis* spores in routinely formalin-fixed stool samples stored at room temperature. *Journal of clinical microbiology*, 37(7), 2317–2322. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.7.2317-2322.1999>
90. Sheikh, R. A., Prindiville, T. P., Yenamandra, S., Munn, R. J., & Ruebner, B. H. (2000). Microsporidial AIDS cholangiopathy due to *Encephalitozoon intestinalis*: case report and review. *The American journal of gastroenterology*, 95(9), 2364–2371. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.02334.x>
91. Boldorini, R., Monga, G., Tosoni, A., Didier, E. S., Nebuloni, M., Costanzi, G., Mazzucco, G., & Orenstein, J. M. (1998). Renal *Encephalitozoon* (Septata) *intestinalis* infection in a patient with AIDS. Post-mortem identification by means of transmission electron microscopy and PCR. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 432(6), 535–539. <https://doi.org/10.1007/s004280050202>
92. Ferreira, F. M., Bezerra, L., Santos, M. B., Bernardes, R. M., Avelino, I., & Silva, M. L. (2001). Intestinal microsporidiosis: a current infection in HIV-seropositive patients in Portugal. *Microbes and infection*, 3(12), 1015–1019. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01465-4](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01465-4)
93. Franzen, C., Kuppers, R., Muller, A., Salzberger, B., Fatkenheuer, G., Vetten, B., Diehl, V., & Schrappe, M. (1996). Genetic evidence for latent *Septata intestinalis* infection in human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. *The Journal of infectious diseases*, 173(4), 1038–1040. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.4.1038>
94. 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 (London, England)*, 11(6), 723–726. <https://doi.org/10.1097/00002030-199706000-00004>
95. Lippert, U., Schottelius, J., & Manegold, C. (2003). Disseminierte Mikrosporidieninfektion (*Encephalitozoon intestinalis*) bei HIV-Infektion [Disseminated microsporidiosis (*Encephalitozoon intestinalis*) in a patient with HIV infection]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 128(34-35), 1769–1772. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41706>

96. Molina, J. M., Oksenhendler, E., Beauvais, B., Sarfati, C., Jaccard, A., Derouin, F., & Modaï, J. (1995). Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *The Journal of infectious diseases*, 171(1), 245–249. <https://doi.org/10.1093/infdis/171.1.245>.
97. Sobottka, I., Schwartz, D. A., Schottelius, J., Visvesvara, G. S., Pieniazek, N. J., Schmetz, C., Kock, N. P., Laufs, R., & Albrecht, H. (1998). Prevalence and clinical significance of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with and without diarrhea in Germany: a prospective coprodiagnostic study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 26(2), 475–480. <https://doi.org/10.1086/516328>.
98. Svedhem, V., Lebbad, M., Hedkvist, B., Del Aguila, C., Hedman, P., Larsson, R., Navajas, R., & Aust-Kettis, A. (2002). Disseminated infection with *encephalitozoon intestinalis* in AIDS patients: report of 2 cases. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 34(9), 703–705. <https://doi.org/10.1080/00365540210147598>
99. van Gool, T., Canning, E. U., Gilis, H., van den Bergh Weerman, M. A., Eeftinck Schattenkerk, J. K., & Dankert, J. (1994). *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology*, 109 (Pt 3), 281–289. <https://doi.org/10.1017/s0031182000078318>
100. Weber, R., Sauer, B., Spycher, M. A., Deplazes, P., Keller, R., Ammann, R., Briner, J., & Lüthy, R. (1994). Detection of *Septata intestinalis* in stool specimens and coprodiagnostic monitoring of successful treatment with albendazole. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 19(2), 342–345. <https://doi.org/10.1093/clinids/19.2.342>
101. Dore, G. J., Marriott, D. J., Hing, M. C., Harkness, J. L., & Field, A. S. (1995). Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in nine patients infected with the human immunodeficiency virus: response to therapy with albendazole. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 21(1), 70–76. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.1.70>
102. Leder, K., Ryan, N., Spelman, D., & Crowe, S. M. (1998). Microsporidial disease in HIV-infected patients: a report of 42 patients and review of the literature. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 30(4), 331–338. <https://doi.org/10.1080/00365549850160594>
103. Alfa Cisse, O., Ouattara, A., Thellier, M., Accoceberry, I., Biligui, S., Minta, D., Doumbo, O., Desportes-Livage, I., Thera, M. A., Danis, M., & Datry, A. (2002). Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bienewsi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali). *Journal of clinical microbiology*, 40(5), 1715–1718. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1715-1718.2002>
104. Graczyk, T. K., Bosco-Nizeyi, J., da Silva, A. J., Moura, I. N., Pieniazek, N. J., Cranfield, M. R., & Lindquist, H. D. (2002). A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitology research*, 88(10), 926–931. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0693-5>

105. Kelly, P., McPhail, G., Ngwenya, B., Luo, N., Karew, A. H., Pankhurst, C., Drobniewski, F., & Farthing, M. (1994). *Septata intestinalis*: a new microsporidian in Africa. *Lancet* (London, England), 344(8917), 271–272. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)93039-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)93039-2)
106. Coyle, C. M., Wittner, M., Kotler, D. P., Noyer, C., Orenstein, J. M., Tanowitz, H. B., & Weiss, L. M. (1996). Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 23(5), 1002–1006. <https://doi.org/10.1093/clinids/23.5.1002>
107. Weber, R., Ledergerber, B., Zbinden, R., Altwegg, M., Pfyffer, G. E., Spycher, M. A., Briner, J., Kaiser, L., Opravil, M., Meyenberger, C., & Flepp, M. (1999). Enteric infections and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons: prospective community-based cohort study. *Swiss HIV Cohort Study. Archives of internal medicine*, 159(13), 1473–1480. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.13.1473>
108. Malčeková, B., Halánová, M., Sulínová, Z., Molnár, L., Ravaszová, P., Adam, J., Halán, M., Valocký, I., & Baranovič, M. (2010). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis* in humans and animals. *Research in veterinary science*, 89(3), 358–361. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.03.020>
109. Tociłowski, M. E., Cornish, T. E., Loomis, M. R., & Stoskopf, M. K. (1997). Mortality in captive wild-caught horned puffin chicks (*Fratercula corniculata*). *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 28(3), 298–306.
110. Slodkiewicz-Kowalska, A., Graczyk, T. K., Tamang, L., Jedrzejewski, S., Nowosad, A., Zduniak, P., Solarczyk, P., Girouard, A. S., & Majewska, A. C. (2006). Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water?. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 4540–4544. <https://doi.org/10.1128/AEM.02503-05>
111. Snowden, K., Daft, B., & Nordhausen, R. W. (2001). Morphological and molecular characterization of *Encephalitozoon hellem* in hummingbirds. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.*, 30(3), 251–255. <https://doi.org/10.1080/03079450120054500>
112. Haro, M., Izquierdo, F., Henriques-Gil, N., Andrés, I., Alonso, F., Fenoy, S., & del Aguila, C. (2005). First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3153–3157. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3153-3157.2005>
113. Bart, A., Wentink-Bonnema, E. M., Heddema, E. R., Buijs, J., & van Gool, T. (2008). Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in amsterdam, the Netherlands. *Applied and environmental microbiology*, 74(22), 7056–7058. <https://doi.org/10.1128/AEM.01429-08>

114. Barton, C.S., Phalen, D.N., Snowden, K.F., (2003). Prevalence of microsporidian spores shed by asymptomatic lovebirds: evidence for a potential emerging zoonosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 17(4). <https://doi.org/10.1647/2002-011>
115. Black, S. S., Steinohrt, L. A., Bertucci, D. C., Rogers, L. B., & Didier, E. S. (1997). *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary pathology*, 34(3), 189–198. <https://doi.org/10.1177/030098589703400303>
116. Gray, M. L., Puette, M., & Latimer, K. S. (1998). Microsporidiosis in a young ostrich (*Struthio camelus*). *Avian diseases*, 42(4), 832–836
117. Pulparampil, N., Graham, D., Phalen, D., & Snowden, K. (1998). *Encephalitozoon hellem* in two eclectus parrots (*Eclectus roratus*): identification from archival tissues. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 45(6), 651–655. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb04562.x>
118. Phalen, D. N., Logan, K. S., & Snowden, K. F. (2006). *Encephalitozoon hellem* infection as the cause of a unilateral chronic keratoconjunctivitis in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). *Veterinary ophthalmology*, 9(1), 59–63. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.00434.x>
119. Sak, B., Kasicková, D., Kvác, M., Kvetonová, D., & Ditrich, O. (2010). Microsporidia in exotic birds: intermittent spore excretion of *Encephalitozoon* spp. in naturally infected budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary parasitology*, 168(3-4), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.012>
120. Black, S. S., Steinohrt, L. A., Bertucci, D. C., Rogers, L. B., & Didier, E. S. (1997). *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary pathology*, 34(3), 189–198. <https://doi.org/10.1177/030098589703400303>
121. Poonacha, K. B., William, P. D., & Stamper, R. D. (1985). *Encephalitozoonosis* in a parrot. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186(7), 700–702
122. Snowden, K., Daft, B., & Nordhausen, R. W. (2001). Morphological and molecular characterization of *Encephalitozoon hellem* in hummingbirds. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.*, 30(3), 251–255. <https://doi.org/10.1080/03079450120054500>
123. Conners, M. S., Gibler, T. S., & Van Gelder, R. N. (2004). Diagnosis of microsporidia keratitis by polymerase chain reaction. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 122(2), 283–284. <https://doi.org/10.1001/archopht.122.2.283>
124. Didier, E. S., Didier, P. J., Friedberg, D. N., Stenson, S. M., Orenstein, J. M., Yee, R. W., Tio, F. O., Davis, R. M., Vossbrinck, C., & Millichamp, N. (1991). Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *The Journal of infectious diseases*, 163(3), 617–621. <https://doi.org/10.1093/infdis/163.3.617>

125. Didier, E. S., Rogers, L. B., Brush, A. D., Wong, S., Traina-Dorge, V., & Bertucci, D. (1996). Diagnosis of disseminated microsporidian *Encephalitozoon hellem* infection by PCR-Southern analysis and successful treatment with albendazole and fumagillin. *Journal of clinical microbiology*, 34(4), 947–952. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.4.947-952.1996>.
126. Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., Tashjian, L., Pollack, M., Holden, J., & Bryan, R. T. (1993). Pathology of symptomatic microsporidial (*Encephalitozoon hellem*) bronchiolitis in the acquired immunodeficiency syndrome: a new respiratory pathogen diagnosed from lung biopsy, bronchoalveolar lavage, sputum, and tissue culture. *Human pathology*, 24(9), 937–943. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(93\)90106-q](https://doi.org/10.1016/0046-8177(93)90106-q)
127. Schwartz, D. A., Bryan, R. T., Hewan-Lowe, K. O., Visvesvara, G. S., Weber, R., Cali, A., & Angritt, P. (1992). Disseminated microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) and acquired immunodeficiency syndrome. Autopsy evidence for respiratory acquisition. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 116(6), 660–668
128. Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., da Silva, A. J., Croppo, G. P., Moura, H., Wallace, S., Slemenda, S. B., Schwartz, D. A., Moss, D., & Bryan, R. T. (1994). Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *Journal of clinical microbiology*, 32(11), 2760–2768. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2760-2768.1994>
129. Scaglia, M., Sacchi, L., Croppo, G. P., da Silva, A., Gatti, S., Corona, S., Orani, A., Bernuzzi, A. M., Pieniazek, N. J., Slemenda, S. B., Wallace, S., & Visvesvara, G. S. (1997). Pulmonary microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* in a patient with AIDS. *The Journal of infection*, 34(2), 119–126. [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(97\)92414-2](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(97)92414-2)
130. Deplazes, P., Mathis, A., Baumgartner, R., Tanner, I., & Weber, R. (1996). Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 22(3), 557–559. <https://doi.org/10.1093/clinids/22.3.557>
131. Franzen, C., Müller, A., Hartmann, P., Hegener, P., Schrappe, M., Diehl, V., Fätkenheuer, G., & Salzberger, B. (1998). Polymerase chain reaction for diagnosis and species differentiation of microsporidia. *Folia parasitologica*, 45(2), 140–148.
132. Weber, R., Kuster, H., Visvesvara, G. S., Bryan, R. T., Schwartz, D. A., & Lüthy, R. (1993). Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: pulmonary colonization, microhematuria, and mild conjunctivitis in a patient with AIDS. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 17(3), 415–419. <https://doi.org/10.1093/clinids/17.3.415>.
133. Hollister, W. S., Canning, E. U., Colbourn, N. I., Curry, A., & Lacey, C. J. (1993). Characterization of *Encephalitozoon hellem* (*Microspora*) isolated from the nasal mucosa of a patient with AIDS. *Parasitology*, 107 (Pt 4), 351–358. <https://doi.org/10.1017/s003118200006769x>

134. Scaglia, M., C. Bandi, S. Novati, S. Gatti, A. M. Bernuzzi, S. Corona, and L. Sacchi. (1998). Respiratory microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: the first case report in an immunocompetent subject. *Parasitol. Int.* 47:203S.
135. Müller, A., Bialek, R., Kämper, A., Fätkenheuer, G., Salzberger, B., & Franzen, C. (2001). Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *Journal of clinical microbiology*, 39(4), 1630–1632. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1630-1632.2001>.
136. Wilczyńska, A., Komsta, R., Szadkowski, M., Ziętek, J., & Adaszek, Ł. (2023). Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Guinea Pigs (*Cavia porcellus*) in Poland with Different Clinical Disorders-A Pilot Study. *Animals : an open access journal from MDPI*, 13(12), 1992. <https://doi.org/10.3390/ani13121992>
137. Kyo, Y. (1958). *Encephalitozoon* parasitemia: observations on the infestation of *Encephalitozoon* in mice, with special note on its parasitemia. *Nisshin Igaku* 45: 500–504
138. Lainson, R., P. C. C. Garnham, R. Killick-Kendrick, and R. G. Bird. (1964). Nosematosis, a microsporidial infection of rodents and other animals, including man. *British medical journal*, 2(5407), 470–472. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5407.470> *Br. Med. J.* 2: 470–472.
139. Morris, J. A., J. M. C. McCowen, and R. E. Blount. (1956). Ascites and hepatosplenomegaly in mice associated with protozoan-like cytoplasmic structures. *The Journal of infectious diseases*, 98(3), 306–311. <https://doi.org/10.1093/infdis/98.3.306>.
140. Nelson, J. B. (1962). An intracellular parasite resembling a microsporidian associated with ascites in swiss mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109: 714–717
141. Attwood, H. D. and R. D. Sutton. (1965). *Encephalitozoon granulomata* in rats. *The Journal of pathology and bacteriology*, 89, 735–738. <https://doi.org/10.1002/path.1700890235>
142. Majeed, S. K., & Zubaidy, A. J. (1982). Histopathological lesions associated with *Encephalitozoon cuniculi* (nosematosis) infection in a colony of Wistar rats. *Laboratory animals*, 16(3), 244–247. <https://doi.org/10.1258/002367782780891813>
143. Illanes, O. G., Tiffani-Castiglioni, E., Edwards, J. F., & Shaddock, J. A. (1993). Spontaneous encephalitozoonosis in an experimental group of guinea pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 5(4), 649–651. <https://doi.org/10.1177/104063879300500432>
144. Moffatt, R. E., & Schiefer, B. (1973). Microsporidiosis (encephalitozoonosis) in the guinea pig. *Laboratory animal science*, 23(2), 282–284
145. Meiser, J., Kinzel, V., & Jírovec, O. (1971). Nosematosis as an accompanying infection of plasmacytoma ascites in Syrian golden hamsters. *Pathologia et microbiologia*, 37(4), 249–260. <https://doi.org/10.1159/000162326>

146. Chalupský, J., Vávra, J., & Bedrník, P. (1979). Encephalitozoonosis in laboratory animals--a serological survey. *Folia parasitologica*, 26(1), 1–8
147. Gannon J. (1980). A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. *Laboratory animals*, 14(2), 91–94. <https://doi.org/10.1258/002367780780942917>
148. Cutlip, R. C., & Beall, C. W. (1989). Encephalitozoonosis in arctic lemmings. *Laboratory animal science*, 39(4), 331–333
149. 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(1–2):357–360. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.008>
150. Wobester, G., & Schuh, J. C. (1979). Microsporidal encephalitis in muskrats. *Journal of wildlife diseases*, 15(3), 413–417. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-15.3.413>
151. Sak, B., Kváč, M., Květoňová, D., Albrecht, T., & Piálek, J. (2011). The first report on natural *Enterocytozoon bienewisi* 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. *Veterinary parasitology*, 178(3-4), 246–250. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.044>
152. Dammann, P., Hilken, G., Hueber, B., Köhl, W., Bappert, M. T., & Mähler, M. (2011). Infectious microorganisms in mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Germany. *Laboratory animals*, 45(4), 271–275. <https://doi.org/10.1258/la.2011.010183>
153. Plowright, W. (1952). An encephalitis-nephritis syndrome in the dog probably due to congenital *encephalitozoon* infection. *Journal of comparative pathology*, 62(2), 83–92. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(52\)80008-6](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(52)80008-6)
154. Didier, E. S., Visvesvara, G. S., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., De Groot, M. A., & Vossbrinck, C. R. (1996). A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *Journal of clinical microbiology*, 34(11), 2835–2837. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.11.2835-2837.1996>
155. Snowden, K., Logan, K., & Didier, E. S. (1999). *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *The Journal of infectious diseases*, 180(6), 2086–2088. <https://doi.org/10.1086/315154>
156. Snowden, K. F., Lewis, B. C., Hoffman, J., & Mansell, J. (2009). *Encephalitozoon cuniculi* infections in dogs: a case series. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(5), 225–231. <https://doi.org/10.5326/0450225>
157. Jeklova, E., Jekl, V., Kovarcik, K., Hauptman, K., Koudela, B., Neumayerova, H., Knotek, Z., & Faldyna, M. (2010). Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary parasitology*, 170(1-2), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.029>

158. Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik, M., Thalhammer, J. G., & Joachim, A. (2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary parasitology*, 151(2-4), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.005>
159. Santaniello, A., Dipineto, L., Rinaldi, L., Menna, L. F., Cringoli, G., & Fioretti, A. (2009). Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Research in veterinary science*, 87(1), 67–69. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.008>
160. Harcourt-Brown, F. M., & Holloway, H. K. (2003). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *The Veterinary record*, 152(14), 427–431. <https://doi.org/10.1136/vr.152.14.427>
161. Tee, K. Y., Kao, J. P., Chiu, H. Y., Chang, M. H., Wang, J. H., Tung, K. C., Cheng, F. P., & Wu, J. T. (2011). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. *Veterinary parasitology*, 183(1-2), 68–71. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.06.011>
162. Halánová, M., Cisláková, L., Valencáková, A., Bálent, P., Adam, J., & Trávnicek, M. (2003). Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 10(1), 117–120
163. Sasaki, M., Yamazaki, A., Haraguchi, A., Tatsumi, M., Ishida, K., & Ikadai, H. (2011). Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in Japanese dogs. *The Journal of parasitology*, 97(1), 167–169. <https://doi.org/10.1645/GE-2540.1>
164. Lindsay, D. S., Goodwin, D. G., Zajac, A. M., Cortés-Vecino, J. A., Gennari, S. M., Rosypal, A. C., & Dubey, J. P. (2009). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in ownerless dogs from urban areas of Brazil and Colombia. *The Journal of parasitology*, 95(3), 760–763. <https://doi.org/10.1645/GE-1890.1>
165. Jamshidi, S.h, Tabrizi, A. S., Bahrami, M., & Momtaz, H. (2012). Microsporidia in household dogs and cats in Iran; a zoonotic concern. *Veterinary parasitology*, 185(2-4), 121–123. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.002>
166. Hsu, V., Grant, D. C., Zajac, A. M., Witonsky, S. G., & Lindsay, D. S. (2011). Prevalence of IgG antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in cats with and without chronic kidney disease from Virginia. *Veterinary parasitology*, 176(1), 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.022>
167. Tsukada, R., Osaka, Y., Takano, T., Sasaki, M., Inose, M., & Ikadai, H. (2016). Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in cats in Japan. *The Journal of veterinary medical science*, 78(10), 1615–1617. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0545>
168. Kourgelis, C., Reilly, C., Von Roedern, M., & Cray, C. (2017). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cats within the United States. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 9, 122–124. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.06.009>

169. Halánová, M., Letková, V., Macák, V., Stefkovic, M., & Halán, M. (1999). The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Veterinary parasitology*, 82(2), 167–171. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00008-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00008-4)
170. Reetz, J., Nöckler, K., Reckinger, S., Vargas, M. M., Weiske, W., & Broglia, A. (2009). Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitology international*, 58(3), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.03.002>
171. Carlson, J. R., Li, L., Helton, C. L., Munn, R. J., Wasson, K., Perez, R. V., Gallay, B. J., & Finkbeiner, W. E. (2004). Disseminated microsporidiosis in a pancreas/kidney transplant recipient. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 128(3), e41–e43. <https://doi.org/10.5858/2004-128-e41-DMIAKT>
172. Rabodonirina, M., Cotte, L., Radenne, S., Besada, E., & Trepo, C. (2003). Microsporidiosis and transplantation: a retrospective study of 23 cases. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 50 Suppl, 583. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00639.x>
173. Sridhar, M. S., & Sharma, S. (2003). Microsporidial keratoconjunctivitis in a HIV-seronegative patient treated with debridement and oral itraconazole. *American journal of ophthalmology*, 136(4), 745–746. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(03\)00391-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(03)00391-x)
174. Theng, J., Chan, C., Ling, M. L., & Tan, D. (2001). Microsporidial keratoconjunctivitis in a healthy contact lens wearer without human immunodeficiency virus infection. *Ophthalmology*, 108(5), 976–978. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(01\)00542-5](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(01)00542-5)
175. Wesołowska, M., Szetela, B., Kicia, M., Kopacz, Ż., Sak, B., Rymer, W., Kváč, M., & Sałamatın, R. (2019). Dual infection of urinary tract with *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in HIV/AIDS patients. *Annals of parasitology*, 65(1), 77–81. <https://doi.org/10.17420/ap6501.185>
176. Champion, L., Durrbach, A., Lang, P., Delahousse, M., Chauvet, C., Sarfati, C., Glotz, D., & Molina, J. M. (2010). Fumagillin for treatment of intestinal microsporidiosis in renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 10(8), 1925–1930. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03166.x>
177. Audemard, A., Le Bellec, M. L., Carluer, L., Dargère, S., Verdon, R., Castrale, C., Lobbedez, T., & Hurault de Ligny, B. (2012). Fumagillin-induced aseptic meningoencephalitis in a kidney transplant recipient with microsporidiosis. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*, 14(6), E147–E149. <https://doi.org/10.1111/tid.12010>
178. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060941>

179. Molina, J. M., Chastang, C., Goguel, J., Michiels, J. F., Sarfati, C., Desportes-Livage, I., Horton, J., Derouin, F., & Modai, J. (1998). Albendazole for treatment and prophylaxis of microsporidiosis due to *Encephalitozoon intestinalis* in patients with AIDS: a randomized double-blind controlled trial. *The Journal of infectious diseases*, 177(5), 1373–1377. <https://doi.org/10.1086/515268>
180. van Hal, S. J., Muthiah, K., Matthews, G., Harkness, J., Stark, D., Cooper, D., & Marriott, D. (2007). Declining incidence of intestinal microsporidiosis and reduction in AIDS-related mortality following introduction of HAART in Sydney, Australia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(11), 1096–1100. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.06.003>
181. Kicia, M., Wesolowska, M., Jakuszko, K., Kopacz, Z., Sak, B., Květonova, D., Krajewska, M., & Kváč, M. (2014). Concurrent infection of the urinary tract with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in a renal transplant recipient. *Journal of clinical microbiology*, 52(5), 1780–1782. <https://doi.org/10.1128/JCM.03328-13>
182. Galván, A. L., Sánchez, A. M., Valentín, M. A., Henriques-Gil, N., Izquierdo, F., Fenoy, S., & del Aguila, C. (2011). First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *Journal of clinical microbiology*, 49(4), 1301–1306. <https://doi.org/10.1128/JCM.01833-10>
183. Malčeková, B., Valenčáková, A., Molnár, L., & Kočíšová, A. (2013). First detection and genotyping of human-associated microsporidia in wild waterfowl of Slovakia. *Acta parasitologica*, 58(1), 13–17. <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0108-z>
184. Zietek, J., Adaszek, Ł., Dziegiel, B., Kalinowski, M., Bartnicki, M., Kalinowska, A., Jarosz, Ł., & Winiarczyk, S. (2014). Diagnosis of the *Encephalitozoon cuniculi* infections in pet rabbits with neurological symptoms. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(2), 361–363. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0050>
185. Wilson J. M. (1979). *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and a fox. *Research in veterinary science*, 26(1), 114.
186. Škrbec, M., Dovč, A., Hrženjak, N. M., Slavec, B., Žlabravec, Z., Kočar, N., Rojs, O. Z., & Račnik, J. (2023). *Encephalitozoon cuniculi* Infection of Domestic Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Slovenia between 2017 and 2021. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(4), 516. <https://doi.org/10.3390/pathogens12040516>
187. Mäkitaipale, J., Järvenpää, E., Bruce, A., Sankari, S., Virtala, A. M., & Näreaho, A. (2022). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* antibodies and risk-factor assessment for *Encephalitozoon cuniculi* seroprevalence in Finnish pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Acta veterinaria Scandinavica*, 64(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13028-022-00622-5>
188. Santaniello, A., Dipineto, L., Rinaldi, L., Menna, L. F., Cringoli, G., & Fioretti, A. (2009). Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Research in veterinary science*, 87(1), 67–69. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.008>

189. Lonardi, C., Grilli, G., Ferrazzi, V., Dal Cin, M., Rigolin, D., & Piccirillo, A. (2013). Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in commercially reared rabbit does in Northern Italy. *Research in veterinary science*, 94(2), 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.020>
190. Sadeghi-Dehkordi, Z., Norouzi, E., Rezaeian, H., Nourian, A., Noaman, V., & Sazmand, A. (2019). First insight into *Encephalitozoon cuniculi* infection in laboratory and pet rabbits in Iran. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 65, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.04.005>
191. Shin, J. C., Kim, D. G., Kim, S. H., Kim, S., & Song, K. H. (2014). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Korea. *The Korean journal of parasitology*, 52(3), 321–323. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.3.321>
192. Wang, Y., Qin, X., Diao, X., Liu, Y., & Liu, J. (2022). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in pet rabbits in eastern coastal areas of China. *The Journal of veterinary medical science*, 84(6), 777–783. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0660>
193. Meredith, A. L., Cleaveland, S. C., Brown, J., Mahajan, A., & Shaw, D. J. (2015). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in wild rodents, foxes and domestic cats in three sites in the United Kingdom. *Transboundary and emerging diseases*, 62(2), 148–156. <https://doi.org/10.1111/tbed.12091>
194. 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. *Veterinary pathology*, 43(4), 438–446. <https://doi.org/10.1354/vp.43-4-438>
195. Meng, X., Zheng, J., He, X., Jia, H., & Zhang, Y. (2014). First characterization in China of *Encephalitozoon cuniculi* in the blue fox (*Alopex lagopus*). *The Journal of eukaryotic microbiology*, 61(6), 580–585. <https://doi.org/10.1111/jeu.12135>
196. Kasicková, D., Sak, B., Kvác, 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. *Veterinary parasitology*, 165(1-2), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.033>
197. Sak, B., Kvác, M., Petzelková, K., Kvetonová, D., Pomajbíková, K., Mulama, M., Kiyang, J., & Modrý, D. (2011). Diversity of microsporidia (Fungi: Microsporidia) among captive great apes in European zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission?. *Folia parasitologica*, 58(2), 81–86. <https://doi.org/10.14411/fp.2011.008>

198. Sak, B., Petrzalkova, K. J., Kvetonova, D., Mynarova, A., Shutt, K. A., Pomajbikova, K., Kalousova, B., Modry, D., Benavides, J., Todd, A., & Kvac, M. (2013). Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PloS one*, 8(8), e71840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071840>.
199. Sak, B., Petrželková, K. J., Květoňová, D., Mynářová, A., Pomajbíková, K., Modrý, D., Cranfield, M. R., Mudakikwa, A., & Kváč, M. (2014). Diversity of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* in mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Volcanoes National Park, Rwanda. *PloS one*, 9(11), e109751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109751>
200. Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Buňatová, Z., Civišová, H., Maršálek, M., & Kváč, M. (2012). Enterocytozoon bienewsi and Encephalitozoon cuniculi in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Veterinary parasitology*, 190(3-4), 573–577. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.013>
201. Halánová, M., Valenčáková, A., Malčeková, B., Kváč, M., Sak, B., Květoňová, D., Bálent, P., & Čisláková, L. (2013). Occurrence of microsporidia as emerging pathogens in Slovak Roma children and their impact on public health. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 20(4), 695–698
202. Tsukada, R., Tsuchiyama, A., Sasaki, M., Park, C. H., Fujii, Y., Takesue, M., Hatai, H., Kudo, N., & Ikadai, H. (2013). Encephalitozoon infections in Rodentia and Soricomorpha in Japan. *Veterinary parasitology*, 198(1-2), 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.018>.
203. 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. *Veterinary parasitology*, 204(3-4), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.020>
204. Laatamna, A. E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Xiao, L., Rost, M., McEvoy, J., Saadi, A. R., Aissi, M., & Kváč, M. (2015). Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Veterinary parasitology*, 208(3-4), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.007>.
205. Perc-Matysiak, A., Leśniańska, K., Buńkowska-Gawlik, K., Čondlová, Š., Sak, B., Kváč, M., Rajský, D., & Hildebrand, J. (2019). The opportunistic pathogen *Encephalitozoon cuniculi* in wild living Murinae and Arvicolinae in Central Europe. *European journal of protistology*, 69, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2019.02.004>.
206. Canning, E.U.; Lom, J.; Dykova, I. (1986) *The Microsporidia of Vertebrates*; Academic Press: London, UK.; p. 289

207. Müller-Doblies, U. U., Herzog, K., Tanner, I., Mathis, A., & Deplazes, P. (2002). First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Veterinary parasitology*, 107(4), 279–285. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00163-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00163-2)
208. 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*). *Parasitology research*, 82(8), 727–730. <https://doi.org/10.1007/s004360050192>.
209. Baneux, P. J., & Pognan, F. (2003). In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Laboratory animals*, 37(2), 132–138. <https://doi.org/10.1258/00236770360563778>
210. Javadzade, R., Rostami, A., Arabkhazaeli, F., Bahonar, A., Mohammad Rahimi, H., & Mirjalali, H. (2021). Molecular detection and genotype identification of *E. cuniculi* from pet rabbits. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 75, 101616. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101616>
211. Sak, B., Brdíčková, K., Holubová, N., Květoňová, D., Hlásková, L., & Kváč, M. (2021). The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* genotype I in mice possess combination of features reported in genotypes II and III. *Experimental parasitology*, 224, 108101. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108101>
212. Piekarska, J., Kicia, M., Wesołowska, M., Kopacz, Ż., Gorczykowski, M., Szczepankiewicz, B., Kváč, M., & Sak, B. (2017). Zoonotic microsporidia in dogs and cats in Poland. *Veterinary parasitology*, 246, 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.011>
213. MATSUBAYASHI, H., KOIKE, T., MIKATA, I., TAKEI, H., & HAGIWARA, S. (1959). A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *A.M.A. archives of pathology*, 67(2), 181–187.
214. Terada, S., Reddy, K. R., Jeffers, L. J., Cali, A., & Schiff, E. R. (1987). Microsporidan hepatitis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of internal medicine*, 107(1), 61–62. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-107-1-61>
215. Didier E. S. (2005). Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta tropica*, 94(1), 61–76. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.01.010>
216. Didier, E. S., & Weiss, L. M. (2011). Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Current opinion in infectious diseases*, 24(5), 490–495. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834aa152>.
217. 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., ... Microsporidia Transplant Transmission Investigation Team (2014). Microsporidiosis acquired through solid organ transplantation: a public health investigation. *Annals of internal medicine*, 160(4), 213–220. <https://doi.org/10.7326/M13-2226>
218. Kicia, M., Szydłowicz, M., Cebulski, K., Jakuszko, K., Piesiak, P., Kowal, A., Sak, B., Krajewska, M., Hendrich, A. B., Kváč, M., & Kopacz, Ž. (2019). Symptomatic respiratory *Encephalitozoon cuniculi* infection in renal transplant recipients. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 79, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.10.016>
219. Sak, B., Gottliebová, P., Nyčová, E., Holubová, N., Fenclová, J., Kicia, M., Zajączkowska, Ž., & Kváč, M. (2024). Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in Patients with Degenerative Hip and Knee Disease, Czech Republic. *Emerging infectious diseases*, 30(3), 469–477. <https://doi.org/10.3201/eid3003.231263>
220. Kicia, M., Zajączkowska, Ž., Kváč, M., Cebulski, K., Holubová, N., Wencel, P., Mayer, L., Wesołowska, M., & Sak, B. (2022). *Encephalitozoon cuniculi* and Extraintestinal Microsporidiosis in Bird Owners. *Emerging infectious diseases*, 28(3), 705–708. <https://doi.org/10.3201/eid2803.211556>.
221. Carhan, A., Ozkan, O., & Ozkaya, E. (2015). The First Identification of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in an Animal Care Worker in Turkey. *Iranian journal of parasitology*, 10(2), 280–285